

# **Doktori értekezés**

**Vida Barbara**

**Budapest**

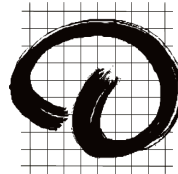
**2011**

# Ösztrogén recepció és funkció a GnRH szekréciót szabályozó idegi hálózatban

**Vida Barbara**

MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet, Endokrin Neurobiológia

Kutatócsoport



Eötvös Loránd Tudományegyetem, Biológia Doktori Iskola

Vezető: Dr. Erdei Anna Ph.D, D.Sc, tanszékvezető egyetemi tanár, az  
MTA levelező tagja

Idegtudomány és humánbiológia program

Vezető: Dr. Détári László D.Sc, tanszékvezető egyetemi tanár, az MTA  
doktora

Témavezető: Dr. Kalló Imre Ph.D., egyetemi docens

Konzulens: Dr. Liposits Zsolt Ph.D, D.Sc., egyetemi tanár

Budapest

2011

## Tartalom

<b>1. Rövidítésjegyzék.....</b>	<b>4</b>
<b>2. Bevezetés .....</b>	<b>5</b>
2.1. A hipotalamo-hipofizeo-gonadális tengely működése egerekben és emberben.....	5
2.2. Az ösztrogén szerepe a GnRH neuronok működésének szabályozásában.....	8
2.3. A GnRH szekréció cirkadián szabályozása.....	14
2.4. A kisszeptin és más neuropeptidek szerepe a reprodukció központi szabályozásában 18	
<b>3. Célkitűzések.....</b>	<b>21</b>
<b>4. Anyagok és módszerek .....</b>	<b>22</b>
4.1. Kísérleti minták.....	22
4.2. Hisztológiai és mérési módszerek.....	25
4.3. Kísérletek .....	30
<b>5. Eredmények.....</b>	<b>37</b>
5.1. GnRH neuronokban ösztrogén receptor agonisták kivédik az oxidatív stressz okozta mitokondriális membránpotenciál – csökkenést in vitro.....	37
5.2. A kisszeptin neuronok közvetíthetik a cirkadián szignált a GnRH neuronok felé.....	39
5.3. Kisszeptin neuronok különböző alpopulációi vesznek részt GnRH idegsejtek beidegzésében .....	42
5.4. Kisszeptin immunreaktív idegsejtek megoszlása és fenotípusa humán hipotalamuszban .....	47
<b>6. Diskusszió.....</b>	<b>55</b>
6.1. Ösztrogén protektív szerepe a GnRH neuronokban .....	55
6.2. Az ösztrogén és a cirkadián szignál konvergenciája a GnRH neuronokat beidegző kisszeptin sejtekben .....	57
6.3. Kisszeptin és GnRH neuronok közötti interakció morfológiai alapjai .....	60
6.4. A humán kisszeptin rendszer a laboratóriumi állatokból nyert vizsgálati eredmények tükrében.....	64
<b>7. Összefoglalás.....</b>	<b>69</b>
<b>8. Summary.....</b>	<b>71</b>
<b>9. Publikációk listája.....</b>	<b>73</b>
<b>10. Köszönetnyilvánítás .....</b>	<b>75</b>
<b>11. Referenciák.....</b>	<b>76</b>

## 1. Rövidítésjegyzék

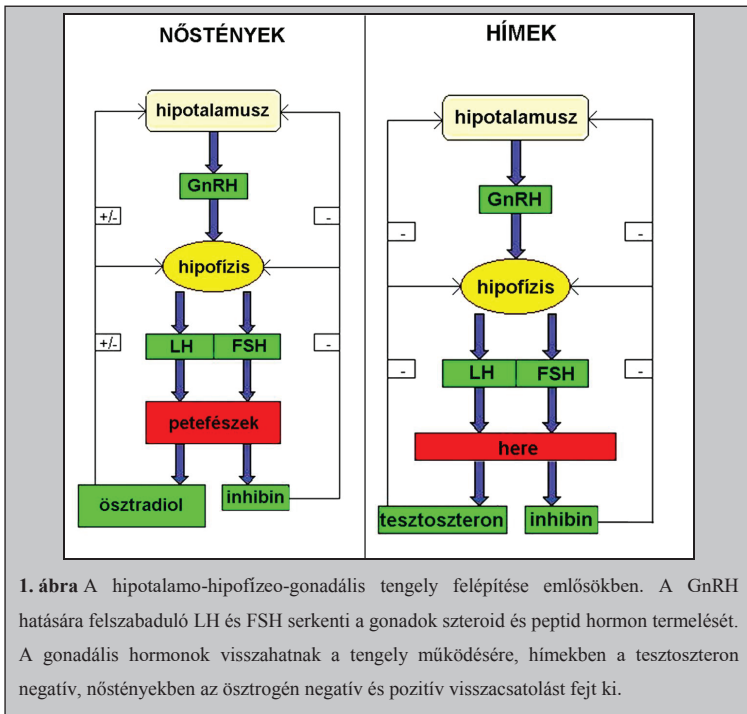
ARC	arcuatus mag	VIP	vazoaktív intesztinális polipeptid
DMH	hipotalamusz dorzomediális magja	VMH	hipotalamusz ventromediális magja
DHA	dorzális hipotalamikus area	VP	vazopresszin
Dyn	dynorphin	VPe	periventrikuláris mag ventrális része
DPN	2,3-bis(4-hydroxyphenyl) proprionitril		
E2	17 $\beta$ - ösztadiol		
ER	ösztrogén receptor		
FSH	follikulus stimuláló hormon		
GnRH	gonadotropin-releasing hormon		
Inf	infundibulum		
InfS	infundibuláris nyél		
IR	immunreaktív		
LSV	laterális szeptális mag ventrális része		
HHG	hipotalamo-hipofizeo-gonád		
HHM	hipotalamo-hipofizeo-mellékvese		
KOR	Kappa opioid receptor		
KP	kisspeptin		
LH	luteinizáló hormon		
LHA	laterális hipotalamikus area		
NK3	neurokinin B receptor		
NKB	neurokinin B		
OHX	orchidektomizált		
OVL	organum vasculosum laminae terminalis		
OVX	ovarietomizált		
Pa	paraventrikuláris mag		
PaAP	paraventrikuláris mag anterior parvicelluláris régiója		
PaMc	paraventrikuláris mag magnocelluláris régiója		
Pe	periventrikuláris mag		
PPT	propylpyrazol triol		
RP3V	harmadik agykamra melletti rostrális periventrikuláris régió		
SCN	szuprakiazmatikus mag		

## 2. Bevezetés

### 2.1. A hipotalamo-hipofízео-gonadális tengely működése egerekben és emberben

A hipotalamo-hipofízео-gonadális (HHG) tengely központi, vezérlő egységét a gonadotropin-releasing hormont termelő (GnRH) neuronok képezik. A GnRH perikarionok főleg a mediális szeptum, a mediális preoptikus area, az organum vasculosum laminae terminalis (OVLT), a diagonal band of Broca területén és az anterior hipotalamikus area területén helyezkednek el (8) (9). A terminálisok zöme a harmadik agykamra alját képező eminentia medianában végződik, melyekből a GnRH a ciklus egészére jellemző frekvenciával - 1 pulzus/50 perc értékkel - pulzatilis módon ürül a portális kapillárisok perikapilláris térségébe (7). A peptid innen a véráramba kerül, eljut a hipofízis elülső lebenyébe, ahol fokozza a gonadotropinok, a luteinizáló hormon (LH) és folliculus stimuláló hormon (FSH) szintézisét és felszabadulását. Az LH és az FSH a szisztémás keringéssel jut el az ivarmirigyekhez, ahol a gametogenezis szabályozása mellett, szteroid- és peptid hormonok termelését is serkentik. E gonád hormonok perifériás hatásaik mellett visszahatnak a hipotalamusz és a hipofízis működésére (1. ábra). A szteroid hormonok közül az ösztrogén visszacsatolásának a hipotalamusz és a hipofízis szintjén is meg kell történnie, ezt bizonyítja, hogy mind a hipofízis gonadotróf- mind a neuron-specifikus ERαKO állatok infertilisek (10, 11). Nőstényekben az ösztrozis ciklus során a vér ösztrogén szintje ingadozik: ösztrozis idején alacsony, a metösztrusz és a diösztrusz fázisában emelkedő tendenciát mutat. Az alacsony szintű ösztrogén negatív visszacsatolással gátolja a GnRH és az LH termelődését. Proösztrusz szakaszban, vagyis a pozitív visszacsatolás idején a vér ösztrogén szintje eléri maximumát, amihez centrálisan a szuprakiazmatikus magból (SCN) származó cirkadián információ társul. Fokozódik a GnRH neuronokra érkező glutamát és GABA neurotranszmisszió (12, 13) és a GnRH neuronok tüzelési frekvenciája körülbelül hatszorosára nő, melynek hatására a GnRH surge-nek nevezett jelenség, a GnRH ürités jelentős mértékű fokozódása figyelhető meg (14, 15). A GnRH felszabadulás fokozódását magyarázza a GnRH szekréción pulzusok amplitúdójának több, mint kétszeresére történő megnövekedése (7) (2. ábra), mivel a paktkányokon végzett vizsgálatok szerint a hormonürités frekvenciája szignifikánsan nem változik a surge alatt (7). A GnRH surge-vel egy időben az adenohipofízis gonadotróp sejtjeinek GnRH-ra mutatott érzékenysége megnő (16, 17). A GnRH neuronok aktivációjának, majd a GnRH ürülésének növekedését időben

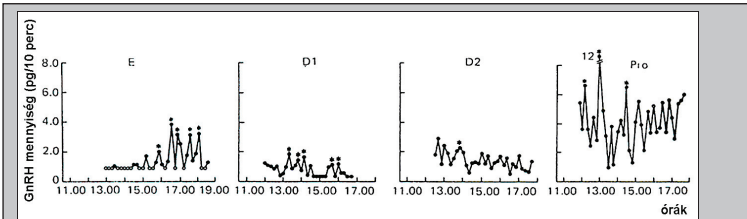
szorosan követi az LH surge létrejöttét, mely az éjszaka kezdetekor következik be. A GnRH felszabaduláshoz hasonlóan az LH ürülés is pulzatilis és a fokozott LH szekrécióért szintén a pulzus amplitudó növekedése a felelős (több mint tízszeresére emelkedik), mivel a surge idején az LH pulzusok frekvenciája inkább csökken (18) (5) (3. ábra). Az LH surge-t követően 6-15 órával bekövetkezik az ovuláció (6) (19, 20).



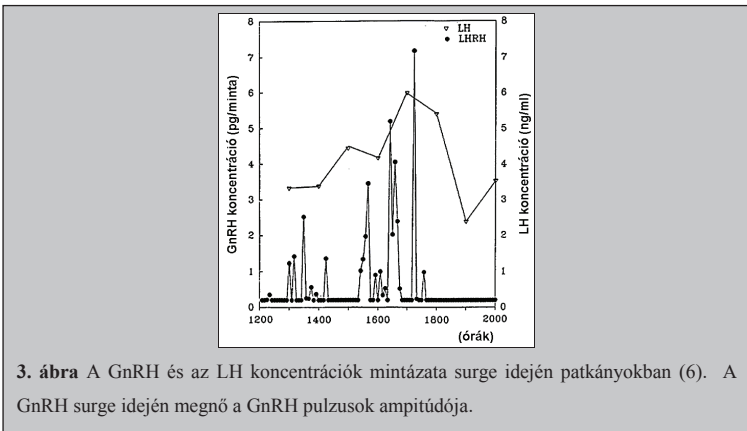
**1. ábra** A hipotalamo-hipofízis-gonádális tengely felépítése emlősökben. A GnRH hatására felszabaduló LH és FSH serkenti a gonádok szteroid és peptid hormon termelését. A gonádális hormonok visszahatnak a tengely működésére, hímekben a tesztoszteron negatív, nőstényekben az ösztrogén negatív és pozitív visszacsatolást fejt ki.

Hímekben a tengely szabályozása a nőstényekétől jelentősen eltér. Bár a GnRH és az LH ürülése hímekben is pulzatilis módon történik (21), a surge release nem figyelhető meg, és egerekben, patkányokban mesterséges körülmények között sem váltható ki (22). Hím állatok orchidektómiája, illetve nőstény állatok tesztoszteron kezelése az ún. kritikus periódusban bizonyította, hogy a szabályozásban mutatkozó eltérésért, a perinatális időszakban bekövetkező tesztoszteron surge a felelős. Ez megváltoztatja a szabályozó központi neuronhálózat kapcsolatrendszerét és működését, pl. csökkenti a GnRH neuronokban a galanin

expressziót (23), növeli a GnRH neuronokon a GABAerg áramok frekvenciáját és nagyságát (24). Következésképp felnőtt rágcsálókban a herék által termelt tesztoszteron és a belőle aromatizációval keletkező ösztrogén az androgén ill. ösztrogén receptorokon keresztül állandó gátló hatást gyakorol a tengely működésére és így a gonad hormonok serkentő, pozitív visszacsatolása ivarérett állatokban nem jön létre. Míg nőstényekben a ciklus során spontán is kialakul illetve gonadektómiát követően proösztrozusz-szintnek megfelelő ösztrogén kezeléssel is kiváltható az LH surge, hímegekben a kasztráció után, nagy dózisu hormonkezeléssel sem várható ki (25, 26).



2. ábra GnRH mennyisége patkány hipofízis perifuzátumában. Nőstény patkányokban a ciklus proösztrozusz fázisában a GnRH szekréció amplitúdója megnő a reprodukciós ciklus többi szakaszához képest, míg a szekréciós pulzusok frekvenciája nem változik szignifikánsan. E: ösztrozusz, D1: diösztrozusz 1, D2: diösztrozusz 2, Pro: proösztrozusz.(7).



3. ábra A GnRH és az LH koncentrációk mintázata surge idején patkányokban (6). A GnRH surge idején megnő a GnRH pulzusok amplitúdója.

Az ember és más vizsgált főemlősök reprodukciós rendszere sok tekintetben hasonlít a rágcsálókéra, azonban jelentős különbségekre is fény derült az elmúlt évek kutatásai során. Az egyik legfontosabb eltérés, hogy míg rágcsálókban az ivari ciklusok 4-5 naponta jelentkeznek, emberben a ciklusok holdhónaponta követik egymást. Emberben a GnRH perikarionok nagy része a rágcsálók arcuatus magjának (ARC) megfelelő infundibuláris magban találhatóak, bár GnRH sejtek a preoptikus area, a bazális hipotalamusz, az eminentia mediána, olfaktorikus areák, a szeptum és a stria terminalis területén is megfigyelhetők (27). Nőkben az LH surge éjjél és reggel nyolc óra közt következik be (28), - tehát rágcsálókhoz hasonlóan szintén az aktív napszak kezdetekor - melyet 24-40 órával követ az ovuláció (29, 30). Az LH pulzusok körülbelül óránként követik egymást (31, 32), azonban az LH surge idején az LH pulzusok frekvenciája (15-20 percenkénti pulzusok) és amplitúdója is megnő. Sokáig elfogadott nézet volt, hogy főemlősökben az ösztrogén pozitív és a negatív visszacsatolása is a hipofízisen keresztül történik (33). Nemrég azonban kimutatták, hogy emberben és rhesus majomban, rágcsálókhoz hasonlóan az ösztrogén és a tesztoszteron a hipotalamuszon keresztül is szabályozza a tengely működését (34-39). Rágcsálókkal ellentétben, egyes majmokban és emberben a reprodukciót szabályozó rendszer, felnőtt korban mindkét nemben alkalmas az LH surge kiváltására, így gonadektomizált hím majmokban (40) (41) (42) és férfiakban ösztrogén kezeléssel előidézhető (43).

## **2.2. Az ösztrogén szerepe a GnRH neuronok működésének szabályozásában**

### **2.2.1 Az ösztrogén általános hatásai**

A GnRH szekrécióra kifejtett negatív és pozitív hatása mellett az ösztrogén a GnRH neuronok működését, hasonlóan más központi idegrendszeri sejtkben előidézett válaszhoz, számos sejtorganellumon és jelátviteli rendszeren keresztül is befolyásolhatja. Az ösztrogén sejtekre kifejtett hatásának mechanizmusa lehet közvetlen genomiális, közvetett genomiális és nem genomiális (44). A közvetlen genomiális útvonal esetében a lipofil ösztrogén diffúzióval átjut a sejtmembránon és nukleáris ösztrogén receptorokhoz (ER) kötődik. Ezek a ligand-aktivált transzkripció faktorok ezután dimer formájában a kromatinhoz kötődnek és módosítják bizonyos gének transzkripcióját (45). Ezen nukleáris ER-ok két ismert altípusa az ER $\alpha$  és az ER $\beta$  (46, 47).



A ligand kötődhet plazma membránban lévő ER-okhoz is (48), melyek a sejten belüli jelátviteli útvonalak módosításán keresztül szintén a génexpresszióra hatnak (44, 49, 50). A plazma membránban lévő ER-ok egy része azonos az ismert nukleáris ER-okkal (51-54), míg más részük (GPR30 és az ER-X) attól eltérő szerkezetű (55, 56). Az ösztrogén ezeken kívül kötődhet NMDA, GABA<sub>A</sub>, 5-HT receptorokhoz (57-59), feszültségfüggő ioncsatornákhöz, K<sup>+</sup>-csatornákhöz megváltoztatva ezzel a működésüket, jelezve az ösztrogén nem genomikus hatásainak széles skáláját. A nem genomiális hatások révén az ösztrogén serkentheti illetve gátolhatja a neuronok működését (60), ligand-függő ioncsatornákat és G fehérjéhez kapcsolt jelátviteli útvonalakat aktiválhat (61), neurotranszmitter transzporterek működését szabályozhatja (62), a sejtek plazmamembránjába épülve növelheti annak fluiditását ezzel fehérjék aktivitását befolyásolva (63), valamint megváltoztathatják a sejtek mitokondriumainak működését (64).

Számos *in vitro* vizsgálat kimutatta, hogy sejtkárosító körülmények közt az ösztrogén széles koncentráció tartományban - 0.1nM-től egészen 50μM-ig - neuroprotektív tulajdonságú (65-70). Magas, 1μM-nál nagyobb koncentrációban az ösztrogén önálló, az ER-októl független antioxidáns hatással bír (71-73), alacsony koncentrációban viszont sejtvédő hatásának genomikus útvonalai ER-okhoz való kapcsolódásával aktiválódnak. Az ERβ neuroprotektív hatását mutatták ki hippokampális (74) és kortikális neuronokban (19). Az ösztrogén sejtvédő hatása mitokondriumokon keresztül is érvényesülhet. *In vitro* kísérletekben bizonyították, hogy az ösztrogén nM-ostól a μM-os tartományig tartó koncentrációban mérsékli a különböző sejtkárosítók által kiváltott membrán potenciál csökkenést, reaktív oxigén gyök termelést, intracelluláris Ca<sup>2+</sup> koncentráció emelkedést (75-77).

### **2.2.2 Az ösztrogén GnRH neuronokra kifejtett hatásai**

Az ösztrogén a GnRH neuronokban is génexpressziós változásokat idéz elő (78-80) (78, 81), megváltoztatja a sejtek tüzelési mintázatát (14), Ca<sup>2+</sup> oszcillációk serkentésével növeli a sejtek aktivitását (82), ioncsatornáinak áteresztőképességét (83). A GnRH neuronok elszórt elhelyezkedése, és ebből következően az egyedi sejtek vizsgálhatóságának nehézségei miatt azonban még nem, vagy alig tisztázott, hogy az ösztrogén egyes hatásai direkt módon, a GnRH neuronokon keresztül és/vagy indirekt módon, a GnRH neuronokkal különböző jelátviteli utakon kapcsolatban álló sejteken keresztül érvényesül (5. ábra) (84, 85). A direkt- és/vagy indirekt hatások

kimutatása a GnRH szekretáló sejtvonalak (86-89) illetve a GnRH-GFP egér törzs (90) létrehozásig nem vagy csak nagyon korlátozottan (91) volt lehetséges.

### **Direkt hatások**

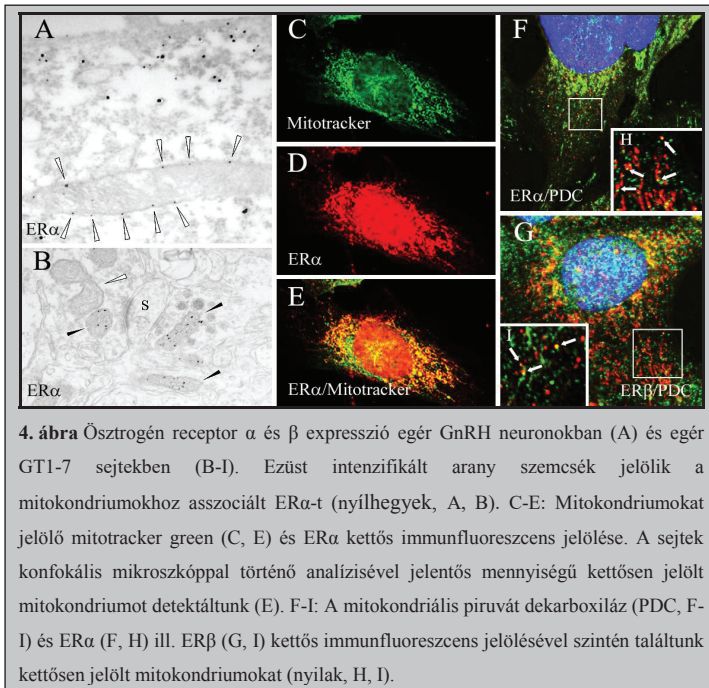
Fiziológiásnak számító ösztrogén vérszintek mellett direkt hatás elsősorban specifikus ER fehérjék közvetítésével jön létre a sejtekben. Egér, patkány és humán GnRH neuronokban a klasszikus ER-ok közül csak az ER $\beta$  mRNS-t és magi lokalizációjú fehérjét tudtak kimutatni (92) (93-95) (96), mely arra enged következtetni, hogy a receptor génextpressziós változásokat indukálhat ezekben a neuronokban is (97). Az ER $\beta$  az ösztrogén nem-genomikus azonnali hatásának közvetítésében is részt vesz pl. a CREB fehérje foszforilációjának megnövelése révén (98). Egerekben kimutatták azt is, hogy rövid idejű ösztrogén expozíció ER $\beta$  közvetítésével megváltoztatja a GnRH neuronok ingerelhetőségét (99). Az egyértelmű közvetítőszerp ellenére a normál reprodukciós szabályozásban fontos GnRH sejtműködésekben valószínűleg nem vesz részt, mivel az ER $\beta$  hiányos egerek infertilitását feltehetőleg a gonádok elégtelen működése okozza (100-103).

A membránkötött ER-ok közül G fehérjéhez kapcsolt ER-t, a GPR30-at kimutatták GnRH sejtvonaltban (55) és rhesus majom GnRH neuronjaiban (104). Későbbi vizsgálatok kimutatták, hogy a GPR30 szerepe a szaporodás szempontjából nem elengedhetetlen, mivel a GPR30 deficiens egerek fertilitések, normál HHG tengely funkciót mutatnak és az állatok reprodukív szerveiben az ösztrogén hatások közvetítése zavartalan (105).

Az immortalizált GnRH neuronokból álló GT1-es sejtvonalt jó modellnek bizonyult a GnRH neuronok sejtbiológiai vizsgálatához (106), így a direkt ösztrogénhatásokra vonatkozó adatok jelentős része a felhasználásukkal végzett *in vitro* vizsgálatokból származik. Munkacsoportunk kimutatta, hogy az immortalizált GnRH neuronokban korábban azonosított ER $\alpha$  (107, 108) és ER $\beta$  (106) (93) a sejtmagban és mitokondriumokhoz asszociáltan is előfordul ezekben a sejtekben (4. ábra), és, hogy az ösztrogén génextpressziós változásokat indukál bennük (80, 109). Az ER-ok mitokondriális jelenléte nemcsak a GnRH neuronokra jellemző, ugyanis primer kortikális és hipokampális neuronok mitokondriumaiban is kimutatták az ER $\beta$ -t (110). Számos tanulmányban igazolták neuroprotektív szerepét (111, 112), ezért nem kizárható, hogy a GnRH neuronokat érő stresszhatások csökkentésével az ER $\beta$  hozzájárul a reprodukciós szabályozó rendszer stabilitásához illetve jelentős

környezeti változások esetén a rendszer túléléséhez. Ezen adatok alapján feltételezzük, hogy az ösztrogének ER-ok közvetítésével a mitokondriumokon keresztül a GnRH neuronokban neuroprotektív funkciót is betöltenek. *In vitro* kísérleteinkben ennek bizonyítását tűztük ki célul.

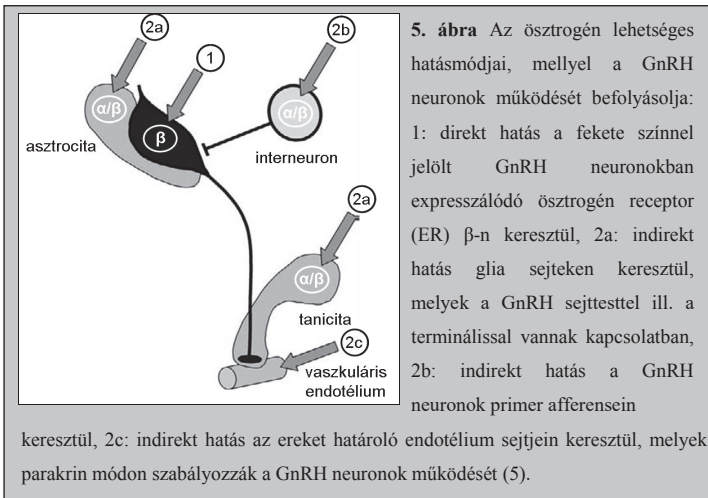
Ismert ugyanis, hogy stressz hatására a reprodukciós működésben is zavar keletkezik. Az eddigi adatok szerint patkányban, juhban és majomban LPS-kezelés (113, 114), hipoglikémia (115) vagy immobilizációs stressz (116, 117) a hipofízео-hipotalamomellékvese (HHM) tengely aktiválása révén csökkenti a GnRH felszabadulást, és következésképpen az LH szekréciót. Rövid illetve a hosszú ideig tartó éhezés emberben, patkányban, egérben, hörcsögben, juhban és majomban (118, 119) (120) (121) (122-126) szintén elnyomja a HHG tengely működését; az LH szekréció csökken, az ösztroz ciklus szabálytalanná válik (127, 128). Kimutatták azt is, hogy az éhezés HHG tengely működésére gyakorolt hatása reverzibilis, mivel újratáplálás után normalizálódik annak működése (122, 129). Epilepszia szintén gyakran társul reprodukciós zavarokkal. Epilepszia pilokarpinos patkány modelljében a GnRH rostok illetve terminálisok száma lecsökken, a kezelés után kialakuló rohamok a GnRH sejtek számában azonban nem okoznak változást (130). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy rohamok következtében a GnRH sejtek tartósan nem károsodnak és a körülmények normalizálódásával a működésük helyreáll. Az epilepsziás rohamokat túlélő GnRH neuronok valószínűsítik, hogy a glutamát-indukálta neurotoxicitással szemben e sejtek ellenállóak (131). A GnRH neuronok NMDA és AMPA/KA receptorokat expresszálnak (132, 133) és glutamáterg beidegzést kapnak, amely szükséges a sejtek működéséhez (134, 135). Patológias körülmények között a magas glutamát koncentráció két úton keresztül is károsíthatja a GnRH sejteket. Excitotoxicitás esetében glutamát receptorokon keresztül felborul a transzmembrán ion-homeosztázis (136, 137), az oxidatív glutamát toxicitás pedig a sejt redox homeosztázisát teszi tönkre (138). Mindkét esetben lecsökken a sejt glutation szintje, és felszaporodnak az intracelluláris szabadgyökök (44), mely végül sejthalált okozhat.



#### Indirekt hatások

Kísérleti adatok igazolják, hogy az ösztrogén pozitív és negatív visszacsatolását is az ER $\alpha$  altípus közvetíti. Ez utóbbit bizonyítja, hogy míg vad típusú nőstényekben ovariektómia LH szint növekedést eredményez az ösztrogén negatív visszacsatolásának hiánya miatt, ez a jelenség nem következik be ER $\alpha$ KO egerekben, tehát a negatív visszacsatolás ER $\alpha$ -függő. Ehhez hasonlóan, míg OVX vad típusú állatok ösztrogén kezelése csökkenti az emelkedett LH szintet, addig ER $\alpha$ KO nőstényekben a kezelés hatástalan (139). Vad típusú OVX egerekben az ER $\alpha$  szelektív vegyület önmagában kiváltja az LH surge-öt (11), vagyis a pozitív visszacsatolást is az ER $\alpha$  közvetíti. Elektrofiziológiai vizsgálatok eredményei szerint a vad típusú OVX egerekben az ösztrogén a negatív feedback alatt csökkenti a GnRH neuronok tüzelési frekvenciáját, a pozitívban pedig növeli, míg az ER $\alpha$ KO-ban nem változtatja meg szignifikánsan (140). Az ER $\alpha$  expresszióját ez idáig *in vivo* nem sikerült igazolni a GnRH neuronokban, vagyis az eddigi eredmények szerint az ösztrogén feedback indirekt módon valósul meg olyan neuronok segítségével, melyek

beidegzik a GnRH neuronokat és ER $\alpha$ -t expresszálnak. Pseudorabies vírussal specifikusan visszajelölve a GnRH neuronok primer afferenseit (11) kimutatták, hogy az afferensek döntő többsége a rostrális periventrikuláris régióból (RP3V) ered, és ezen sejtek kb. 40%-a ER $\alpha$ -immunreaktív (IR). Az RP3V összefoglaló neve a funkcionális egységet alkotó anteroventrális periventrikuláris-(AVPV) és a tőle közvetlenül kaudálisan elhelyezkedő periventrikuláris magnak (Pe) (141). A legújabb kutatási eredmények szerint az ösztrogén pozitív visszacsatolásának helye az RP3V (11, 142-147), a negatív visszacsatolás helye pedig nagy valószínűséggel az ARC (148) (146, 149).



Az ösztrogén indirekt hatásának közvetítésében a klasszikus és a membrán kötött ER-okat expresszáló asztrócita, ependima és endotél sejtek is részt vehetnek. A GnRH terminálisokat asztróciták és taniciták (specializált ependima sejtek) választják el a kapillárisok bazális laminájától az eminentia mediana külső zónájában. Kimutatták, hogy ösztrogén kezelés hatására lecsökken a GnRH terminálisok és a glia sejtek közti kontaktusok száma (150), ami nagyban hozzájárulhat terminális-bazális lamina kontaktusainak gyarapodásához proösztrozusban (151), így azokból elegendő peptid ürülhet közvetlenül a fenesztrált kapillárisokba az LH surge kiváltásához. A taniciták ER $\alpha$ -t expresszálnak, így a keringő ösztrogénszintről informálhatják a GnRH neuronokat. Ezen kívül szinkronizálhatják a terminálisokból való GnRH felszabadulást, mivel prosztaglandin E $_2$ -t, inzulin növekedési faktor I-t termelnek,

melyek serkentik a GnRH felszabadulást. A GnRH terminálisok szomszédságában lévő endotélsejtek nitrogénmonoxidot (NO) termelnek (152) a GnRH szekréció frekvenciájához hasonló pulztilis módon, mindkettő amplitúdójának maximumát proösztusz napján éri el (153). Az ösztrogén stimulálja a NO felszabadulást az endotélsejtek membránkötött ER-ain keresztül (154). A surge kialakulása megakadályozható az endoteliális NO-szintáz ellenes oligonukleotiddal (155). TGF $\beta$  termelő asztrocita sejtek a GnRH perikarionokra hatva befolyásolják a decapeptid expresszióját és terminálisokból való felszabadulását (156, 157).

### **2.3. A GnRH szekréció cirkadián szabályozása**

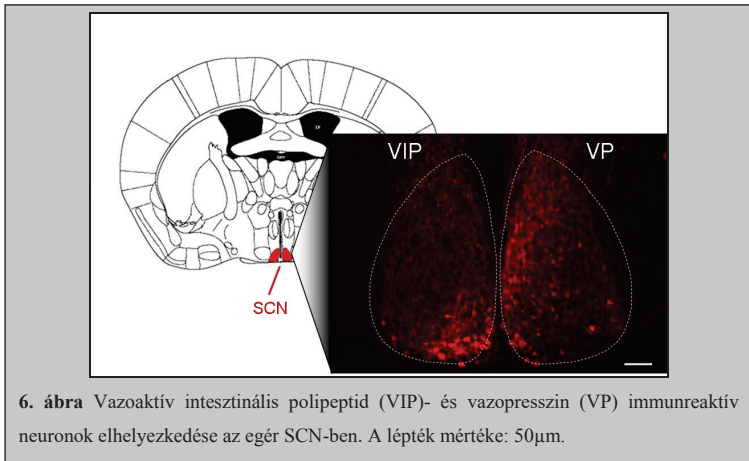
A szervezet fiziológiai folyamatai úgy, mint alvás-ébrenlét, testhőmérséklet, szívverés, vérnyomás, endokrin szekréció, vese- és máj működése a szervezet biológiai órájának köszönhetően napi ritmust mutat (158-164). Ezt a szervezet oszcillátora teszi lehetővé, mely a cirkadián jelet generálja. Különböző léziós és transzplantációs kísérletekkel bizonyították (165-169), hogy emlősökben a szervezet fő cirkadián ritmusszabályozója a hipotalamuszban elhelyezkedő szuprakiazmatikus mag (SCN). Az óra önálló működésének következtében az életteni és viselkedési funkciók az óra endogén ritmusát követik, így ezek a működések nagyjából, de nem pontosan 24 órás periódusidő szerint oszcillálnak. A SCN-ba fény-információ jut a retinából a retinohipotalamikus és a genikulohipotalamikus tractuson keresztül. Így válik lehetővé, hogy a szervezet a környezet nappal-éjszaka váltakozásával szinkron működjön, benne a különböző aktivitások ritmusa pontosan 24 órás periódusidőt kövessen. Végül pedig az oszcillátort elhagyó neuronális és humorális útvonal (170, 171) az, ami biztosítja a cirkadián ritmus megnyilvánulását az életteni működésekben. A SCN endogén ritmikus működésének molekuláris alapja a sejtjeiben lévő önmagát befolyásoló, önmagára visszaható transzkripció-transzlációs kör, melyek résztvevői az úgynevezett óra gének (172-174). Ezek transzkripciójának-transzlációjának ritmusa határozza meg a sejtek metabolikus aktivitásának, neuropeptid expressziójának, elektromos aktivitásának ritmusát (172). Ezek az óra gének minden eddig vizsgált agyi régióban, perifériális szervben, immortalizált sejtvonalban jelen vannak, azonban ritmusuk fennmaradásához és lokális szinkronitásuk megtartásához szükségük van a SCN-ra (158, 175). Így a SCN tulajdonképpen szinkronizálja az extra-szuprachiasmatikus oszcillátorokat, melyek aztán lokálisan szabályozzák a fiziológiai, viselkedési ritmusokat.

A szervezet többi sejtjéhez hasonlóan a GnRH neuronokban is kimutatták az óra gének expresszióját (176, 177). *In vitro* körülmények közt ezek expressziója a többi immortalizált neuronhoz hasonlóan szérum-sokkal történő szinkronizálást követően ritmikus oszcillációt mutat (178, 179). A GnRH neuronokon végzett *in vivo* vizsgálatok azt támasztják alá, hogy a GnRH neuronok ugyancsak cirkadián szabályozás alatt állnak, melynek központja a SCN (180). A cirkadián szabályozás egyik bizonyítéka, hogy ha rágsálókban a proösztrozus délutánján, a nap sötét szakaszának kezdete előtt 5 órával pentobarbitál adásával megakadályozzák a neuronális aktivitást a következő néhány órára, az LH surge ill. ovuláció csak 24 óra múlva alakul ki, mégpedig pontosan abban az időintervallumban, amikor az barbiturát adása nélkül végbement volna (181). Ezzel szemben, ha a sötét napszak kezdete előtt 3 órával kapta az állat a barbiturátot, az nem volt befolyással sem az aznapi sem a másnapi surge illetve ovuláció kialakulására. Tehát az óra-információnak a GnRH neuronokhoz a kritikus időintervallumban kell megérkezni a surge kiváltáshoz. Hogy a szükséges információ forrása a SCN, az bizonyítja, hogy az SCN lézióját követően ösztrogén beadással nem lehet LH surge-öt kiváltani (182). A léziót követően a lokomotor aktivitás napi ritmusa is megszűnik, ami, szemben az ivari ciklussal, a SCN hipotalamuszba ültetésével helyreállítható (183). Ez azt jelenti, hogy míg a lokomotor aktivitás napi ritmusának fennmaradásához elegendők a SCN-ből jövő humorális faktorok (184), a GnRH neuronok cirkadián szabályozásához nem; ez ugyanis neuronális összeköttetéseken keresztül valósul meg (183, 185). További kísérletek is alátámasztották az LH surge cirkadián szabályozását: intakt nőstényekben az LH surge mindig a proösztrozus késő délutánján következik be, sőt ovariectomizált állatokban ösztrogén-kezelést követően is csak naponta egyszer, a sötét napszak kezdetekor jelentkezik (186, 187) hiába a konstans, proösztrozusnak megfelelő vér ösztrogénszint.

Rágsálókkal ellentétben, emberben az LH szint éjszakai emelkedése nem a megvilágítással, hanem a REM nem-REM alvási ciklusokkal van kapcsolatban (188, 189), így nem meglepőek azon eredmények, melyek szerint a hosszantartó éjszakai munkavégzés megzavarja a normál reprodukzív folyamatokat. Ilyen esetekben a ciklus hossza szabálytalanra válik, a menstruációs fájdalmak megnövekszenek (190-192), megnő a follikuláris fázis ideje (193). Főemlősökben a reprodukzív tengely működése nincs olyan szigorú cirkadián szabályozás alatt, mint a rágsálók esetében. Például primátákban az LH surge a nap bármely szakaszában kiváltható a megfelelő dózissal

ösztrogén expozícióval (42), míg rágsálókban csak proösztrozus kora délutánján (181).

Az LH surge cirkadián szabályozásának mechanizmusára vonatkozó információk elsősorban rágsálókon végzett kísérletek eredményeiből származnak. Ezekben az állatokban a SCN szinte minden neuronja GABAerg (194), dorzomediális shell régióját a vazopresszin (VP)-, míg a ventrolaterális core régióját a vazoaktív intesztinális polipeptid (VIP)- ill. a gastrin releasing peptide (GRP)-termelő neuronok jellemzik (194, 195)(6. ábra). A core területére érkezik a fotikus információ a retinohipotalamikus és a genikulohipotalamikus traktuson keresztül, a shell régióba a hipotalamuszból és a limbikus rendszerből érkeznek információk (194, 195).



Mindhárom neuropeptid transzkripcióját óragének szabályozzák, de míg a GRP mRNS szintjére csak cirkadián ritmus jellemző, addig a VP és a VIP mRNS szintjének ritmusa a nappalok-éjszakák váltakozásával is megmarad (2). Mivel a szuprachiazmatikus mag fő efferenseit a VP és a VIP tartalmú rostok biztosítják (196), számos vizsgálat indult annak feltételezéséből, hogy ezek közvetítik az LH surge kiváltásához szükséges cirkadián információt. Ezek eredményei viszont ellentmondások, vannak melyek a VP közvetítő szerepét támasztják alá, mások a VIP szerepét.

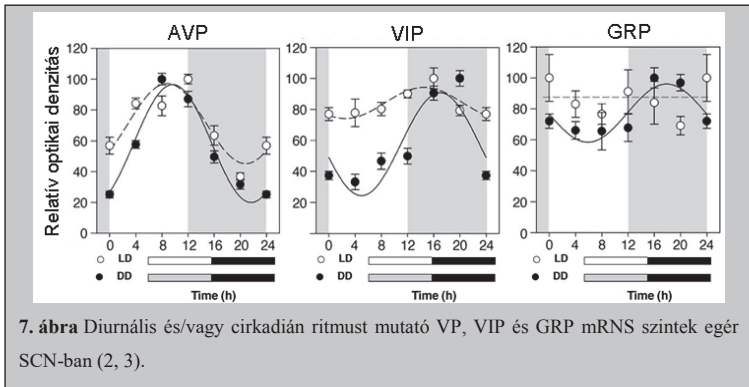
A VP közvetítő szerepére utal, hogy POA-ba történő injektálása LH surge-öt vált ki a SCN-irtott OVX ösztrogén-kezelt patkányban (197). További bizonyíték, hogy a POA-SCN ko-kultúrákon végzett vizsgálatok eredményei szerint (198) a kultúra VP-



nel való kezelése megnöveli ösztrogén jelenlétében a GnRH szekréciót, míg a VIP ugyanezen körülmények között hatástalannak bizonyult. Ebben a ko-kultúrában a GnRH szekréció ösztrogén jelenlétében cirkadián ritmust mutat, melynek periódusideje és fázisának maximuma megegyezik a kultúra médiumában mért VP-szint változásainak hasonló paramétereivel, viszont VIP szint-változások paramétereitől eltért. Ezekből arra lehet következtetni, hogy a szuprakiazmatikus VP neuronok közvetítik az óra információt a GnRH neuronok felé. Ugyancsak a VP közvetítő szerepére utalnak azok az eredmények, melyek szerint a VP mRNS (2) és fehérje (199) mennyisége a SCN-ben akkor a legmagasabb, illetve az SCN-ből való VP felszabadulás is akkor maximális (200), amikor az óra-információnak meg kell érkezni a GnRH neuronokhoz (201, 202).

A VIP közvetítő szerepére utal, hogy egérben VIP a surge kezdetekor megnöveli a GnRH neuronok tüzelési frekvenciáját (201), valamint az, hogy patkányban antiszensz VIP oligonukleotid késlelteti és tompítja az LH surge kialakulását (203). Ezzel szemben a VIP harmadik agykamrába juttatása megakadályozza az LH surge létrejöttét OVX ösztrogén-kezelt patkányban (204). A VIP szuprakiazmatikus mennyiségére vonatkozó vizsgálatok szerint a VIP mRNS oszcilláció maximuma ZT16-kor van (7. ábra), ehhez hasonlóan a VIP immunreaktivitás is éjszaka a legnagyobb az SCN-ben (205, 206), tehát a VIP mennyisége az SCN-ben nem akkor éri el a maximumát a SCN-ben, amikor a cirkadián információ eljut a GnRH neuronokhoz.

Mivel az eddigi adatok alapján továbbra is fennáll annak lehetősége, hogy egerekben a szuprakiazmatikus eredetű VP és/vagy VIP rostok szállítják a cirkadián információt a GnRH neuronok számára, a kérdés az, hogy ez direkt vagy indirekt úton valósul-e meg.



Korábbi vizsgálatok a GnRH neuronok kismértékű SCN-ből eredő VIP-IR rostok általi innervációját már kimutatták patkányban (207, 208) (209) és egérben is (210), azonban GnRH specifikus virális pályatani eredmények azt sugallják, hogy egerekben az SCN-ből nem ered szignifikáns mennyiségű primer GnRH afferens (11). Kísérleti eredmények bizonyítják azt is, hogy a cirkadián információ az RP3V-közvetítésével, vagyis indirekt módon is eléri a GnRH sejteket. Az AVPV-ben munkacsoportunk kimutatta a V1a VP és VPAC2 VIP receptorokat (211, 212), melyek közül csak az előbbieken találtak GnRH expressziót. Ezen kívül a SCN-ből az AVPV területére érkező rostokat ill. az AVPV-ből a GnRH neuronokra érkező terminálisokat is detektáltak (11, 213). Ezek alapján feltételezhető, hogy a cirkadián információ a SCN VP rostjaiból kiindulva közvetve, az AVPV bizonyos neuronjainak közvetítésével éri el a GnRH idegsejteket. Kísérleteinkben arra kerestünk morfológiai bizonyítékot, hogy az RP3V KP neuronjai közvetíthetik-e a cirkadián információt, mintegy integrálva ezzel a GnRH/LH surge kialakulásához szükséges cirkadián és ösztrogén szignált.

#### 2.4. A kisspeptin és más neuropeptidek szerepe a reprodukció központi szabályozásában

A KP gyűjtőneve a KISS1 gén által kódolt fehérjéknek. 145 aminosavból álló fehérjét kódol, ami különböző hosszúságú termékekre, C terminális fragmentumokra hasad (KP-10, -13, -14, -54) (214). A receptorát, a GPR54-et évekig orphan receptorként tartották számon, és új G fehérjéhez kötött receptorok keresése közben írták le 1999-ben (215). 2001-ben két egymástól független csoport is kimutatta, hogy

a KP-ek endogén ligandjai a GPR54-nek (216). Tumor metasztázis szabályozáson kívüli szerepükre csak 2003-ban világítottak rá. Ekkor mutatták ki, hogy a KP-t ill. a GPR54-t kódoló gén egy szakaszának homozigóta deléciója is alacsony szex szteroid és gonadotropin szinttel jellemzett hipogonadotróp hipogonadizmust okoz egérben és emberben (217, 218), funkció nyeréses mutációja pedig emberben korai pubertáshoz vezet (219). A receptor liganddal végzett vizsgálatok során kiderült, hogy a KP centrális beadása GPR54 közvetítésével stimulálja a GnRH, LH és FSH szekrécióját (220). KP-antitest beadása pedig meggátolja az LH surge kialakulását (221). Ezek az eredmények és további mások nyilvánvalóvá tették, hogy a KP irányítja a GnRH pulzatis (222) és surge (147, 223) jellegű felszabadulását.

Az RP3V-ban a KP expresszióját, mely nagyfokú nemek közti különbséget mutat (nőstényekben több mint 10-szer több KP-IR neuron van), gonadektomizált nőstényekben az ösztrogén, hímeekben a tesztoszteron megnöveli (149, 224). Az eddigi adatok szerint az RP3V területén lévő KP-IR populáció az, mely az ösztrogén pozitív visszacsatolását közvetíti ill. részt vesz a GnRH surge kialakításában (141, 147).

Az ARC magbéli KP expresszióra ellenkezőleg hatnak a gonadális szteroidok: az expresszió OVX nőstényekben és orchidektomizált (OHX) hímeekben a legmagasabb (149, 224). Az eddigi adatok szerint az ARC KP-IR neuron populációja (225) közvetíti az ösztrogén negatív visszacsatolását és szabályozza a GnRH pulzatis szekrécióját.

KP-IR axonok és GnRH perikarionok/proximális dendritek közt kontaktusokat mutattak ki, nőstény egerekben a GnRH neuronok 40%-án, hímeekben mindössze a 10%-án (226). A KP neuronok GnRH sejtek felé történő információ átadására utal, hogy a GnRH neuronok egy része GPR54-et expresszál (227-229) és a KP megnöveli a GnRH neuronok tüzelési aktivitását (230). A GPR54 azonban olyan területeken is expresszálódik, melyek a GnRH neuronokra projiciálnak (215, 229), ami felveti annak lehetőségét, hogy a KP indirekt módon hat GnRH neuronokra. Figyelembe véve a GABA és glutamát közvetítette gyors szinaptikus transzmissziót, mely az ösztrogén negatív és pozitív visszacsatolása során egyaránt érvényesül a GnRH neuronokon és ezek fontos szerepét az ösztrogén visszacsatolás módjának átváltásában (231), a KP indirekt befolyása a GnRH neuronok működésére különösen jelentős lehet. A GnRH sejtekre ható GABA és glutamát a KP-t termelő sejtekből is felszabadulhat, hiszen a rostrális KP populáció 75%-a, az ARC-béli 50%-a gabaerg,

míg az előbbi neuron csoport 20%-a az utóbbinak pedig 90%-a glutamáterg (232). Annak megállapítására, hogy a GnRH neuronokat innerváló KP terminálisok melyik populációhoz tartoznak, a KP terminálisok és GnRH neuronok közti szinapszisokat morfológiailag elemeztük.

Az ösztrogén feedback közvetítésében részt vevő régiókban a KP-en kívül más neuropeptidok is termelődnek, melyek GnRH neuronokra kifejtett hatását eddig csak egymástól függetlenül vizsgálták.

A kutatások nemrég terjedtek ki abba az irányba, hogy megállapítsák, miként működhetnek közre egymással ezek a peptidok a GnRH szekréció szabályozásában. Az erre irányuló *in situ* hibridizációs és immuncitokémiai tanulmányok elsősorban az ARC magra fókuszáltak, ahol minden eddig vizsgált fajban kimutatható egy neuronpopuláció, mely KP-t, neurokinin B-t (NKB), dynorphint (Dyn) termel, illetve NKB receptort (NK3) és dynorphin receptort (Kappa opioid receptor, KOR) expresszál (3, 233, 234). Ezen sejtcsoport funkciójára vonatkozó adatokból kiindulva egy olyan modell látszik elfogadottá válni, mely szerint ezek a sejtek egy autoregulációs mechanizmuson keresztül a GnRH terminálisokra hatva szabályozzák a GnRH pulzatilis szekrécióját (3, 4). Eszerint a NKB/NK3 útvonal növeli a KP felszabadulást az ARC-ból, a Dyn/KOR útvonal pedig csökkenti, így a KP pulzatilis módon képest stimulálni a GnRH szekréciót. Ezzel szemben a GnRH perikarionok KP expozíciója hosszantartó GnRH tüzelési frekvencia növekedésével és GnRH felszabadulásával jár (235) (220), de ezt magyarázhatja, hogy míg a GnRH terminálisokra érkező KP az epizódikus GnRH szekrécióért felelős, az RP3V KP neuronjaiból a GnRH sejttestre érkező hatás a GnRH surge kialakításában játszik szerepet. Ez utóbbihoz hozzájárulhat az RP3V-ben is nagy mennyiségben termelődő galanin, melyről kimutatták, hogy magas ösztrogén szint mellett depolarizálja a GnRH neuronokat, és megnöveli a GnRH stimulálta LH szekréciót (236-238). Hatásait a GnRH neuronokban is expresszálódó galanin receptorok közvetítik (236, 239-241).

Ezekből kiindulva munkánk egy része annak vizsgálatára irányult, hogy meghatározzunk, a KP neuronok milyen más neuropeptidet tartalmaznak a perikarionok illetve terminálisok szintjén, hogy közelebb jussunk a kétféle alpopuláció funkcionális eltérésének megértéséhez, illetve morfológiai bizonyítékok szolgáltatassunk az egyes neuron populációk GnRH neuronokra gyakorolt hatásában esetleg megnyilvánuló együttműködés megértéséhez.

### 3. Célkitűzések

1. **Nem szelektív és szelektív ösztrogén receptor agonisták oxidatív stresszel szemben megnyilvánuló protektív hatásának *in vitro* vizsgálata GnRH szekretáló (GT1-7) idegsejtekben.**
  
2. **A kisszeptin neuronok cirkadián információt közvetítő szerepének morfológiai vizsgálata.**
  - a. A rostrális periventrikuláris régió kisszeptin immunreaktív neuronjain olyan appozíciók azonosítása egerekben, melyek a szuprakiazmatikus mag efferenseire jellemző neuropeptideket (vazopresszin és vazóaktív intesztinális polipeptid) tartalmaznak
  - b. Az appozíciók ösztrogén általi szabályozottságának és nemek közti különbségének vizsgálata.
  - c. Az appozíciók szuprakiazmatikus eredetének bizonyítása.
  
3. **Kisszeptin immunreaktív neuronok és GnRH idegsejteken lévő terminálisaik fenotípusának vizsgálata**
  
4. **A humán hipotalamusz kisszeptin rendszerének morfológiai jellemzése**
  - a. Humán hipotalamuszban a kisszeptin immunreaktív sejtek és rostok feltérképezése, nemek közti különbségek vizsgálata.
  - b. A kisszeptin rostok GnRH neuronokkal kialakított kontaktusainak azonosítása.
  - c. A kisszeptin neuronok neurokinin B immunreaktivitásának vizsgálata.

## 4. Anyagok és módszerek

### 4.1. Kísérleti minták

#### 4.1.1. *In vitro* vizsgálatok

##### 4.1.1.1. Sejtmodell kiválasztása – GT1-7 sejtek

Vizsgálatainkat T-antigén onkogénnel immortalizált GT1-7 sejtvonalon végeztük, mely egér GnRH-szekretáló tumorsejtekből származik (Dr. P. L. Mellon bocsájtotta a rendelkezésünkre (242)). A tenyészet részletesen jellemzett, glia elemektől mentes, széles körben alkalmazott modell, mely segítségével a GnRH neuronok tanulmányozhatóak (106). Hátránynak tűnhet a sejtek természetes környezetüktől mentes vizsgálata, azonban a választás indokolt, ha egyes beavatkozások, kezelések direkt hatásait szeretnénk megfigyelni a GnRH neuronokon.

A sejteket 75cm<sup>2</sup>-es szövettenyésztő flasksban növesztettük tápfolyadékban (4,5g/l glükóz tartalmú DMEM és F12 HAM 1:1 arányú keveréke, kiegészítve hőinaktivált 10% embrionális borjú szérummal (FCS, Gibco) és 5% ló szérummal (HS, Gibco), penicillinnel (100 U/ml), streptomycinnel (0.1 mg/ml), L-glutaminnal (3mM)) 37°C-on 5%CO<sub>2</sub>/95%O<sub>2</sub>-inkubátorban. A konfluens tenyészetet hetente háromszor passzáztuk 0,1% tripszines kezelést követően. Hús passzáznál idősebb sejteket nem használtunk a kísérletekben.

##### 4.1.1.2. Hormonkezelések – nem-szelektív és szelektív ER agonisták használata

Kísérleteinkben a sejteket nem-szelektív (17- $\beta$ -ösztradiol, E2; Sigma) és szelektív ER agonistákkal (ER $\alpha$  agonista: propylpyrazol triol, PPT; Tocris (243) és szelektív ER $\beta$  agonista: 2,3-bis(4-hydroxyphenyl) propionitril, DPN; Tocris (244)) kezeltük.

Huszonnégy órás kezelési időt választottunk, hogy az agonisták genomális hatásait detektálhassuk. A kezelési koncentrációk kiválasztásához az agonisták 10pM-3 $\mu$ M-ig terjedő koncentráció sorát vettük fel. Protektívnek a pM-os és  $\mu$ M-os koncentrációban bizonyultak, így kezelési koncentrációnak az előbbit választottuk (10pM), mert ebben a koncentrációban már nem érvényesül az ösztrogén szerkezetéből adódó, ER-októl független antioxidáns hatása (245).

##### 4.1.1.3. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés - oxidatív stressz előidézése

A sejteket emelkedő koncentrációjú H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vel kezeltük, mely reaktív oxigén gyök széles körben alkalmazott oxidatív stressz kiváltására. Oxidatív stressz estén a

mitokondriumok belső membránjának permeabilitása megnő, mely a mitokondriális membrán potenciál csökkenéséhez vezet. Ezután csökken a mitokondriumok ATP és nő a reaktív oxigén gyök termelése, mely végül sejthalához vezethet (246).

Az előzetes teszteredmények alapján a 100  $\mu\text{M}$ -os koncentrációt választottuk, mert ennél a sejtek kiterjedt károsodása nélkül csökkent szignifikáns mértékben, reprodukálható módon a DIOC6 intenzitása.

#### **4.1.2. *In vivo* vizsgálatok**

##### **4.1.2.1 Kísérleti állat kiválasztása**

Kísérleteinkhez felnőtt, ivarérett egereket (CD1 törzs, 25-30g súly, MTA KOKI Orvosi Géntechnológiai Részlege) használtunk, elsősorban azért, mert az *in vivo* vizsgálatok jelentős részétkülönösen az elektrofiziológiai mérések zömét egereken végzik, melyhez genetikailag módosított törzsek (pl. a GnRH-GFP egértörzs) nagy számban állnak rendelkezésre. Az állatokat kontrollált fény (12 órás fény ill. sötét szakasz) és hőmérséklet ( $22\pm 2^\circ\text{C}$ ) viszonyok közt tartottunk szabad víz és táplálék hozzáférés mellett.

##### **4.1.2.2. Postmortem humán minták jellemzése**

A hét férfi (26, 28, 28, 31, 52, 53 és 66 évesek) és öt női (27, 32, 46, 49 és 74 évesek) humán hipotalamusz blokkot a Semmelweis Egyetem Igazságügyi és Biztosítás-orvostani Intézetétől kaptuk a Tudományos és Kutatás-éti bizottság által leírt protokollnak megfelelően (49/1999). Hirtelen halállal halt, neurológiai és endokrinológiai betegségek tüneteitől mentes emberekből származó mintákat használtunk fel (96), melyeknél a *post mortem* idő 24 óránál kevesebb volt. A disszekció során az egyik félteke hipotalamuszához jutottunk, melyet dorzálisan a commissura anterior, rostrálisan a kiazma optikum, kaudálisan a mammiláris mag határolt. A blokkokat 4%-os PFA oldatba merítettük (5 perc), majd öt blokkot két napig 4% acroleint 2% PFA-t tartalmazó fixálóban, hét blokkot pedig hét napig 4%-os PFA-ban tartottunk  $4^\circ\text{C}$ -on. A blokkokat ezt követően feldaraboltuk, hogy a metszetek felülete megfeleljen az általánosan használt tárgylemezének. A blokkokat 20%-os cukor oldattal infiltráltuk (5nap,  $4^\circ\text{C}$ ), majd koronális  $30\mu\text{m}$ -es metszeteket készítettünk belőlük fagyasztó mikrotómmal (Leica SM 2000R, Leica Microsystems, Nussloch, Németország). A PFA-val fixált metszeteket az egér

metszetekkel megegyező módon kezeltük elő a primer szérumban való inkubálás előtt, az acroleinnal fixáltakat ezen lépések előtt 0.5%-os Na-borohidridben (Sigma) tartottuk 30 percig.

#### **4.1.2.3. Napszaki ingadozások figyelembevétele**

Tekintettel arra, hogy rágcsálókban a GnRH surge cirkadián szabályozás alatt áll, vagyis kizárólag a proösztrozus napjának késő délutánján alakulhat ki, és a vér ösztrogén/tesztoszteron szintje illetve a neuropeptid és receptoraik expressziója is napi ritmust mutat, a 4.2-es kísérletünk esetében az állatok perfúzióját 14 és 16 óra közt végeztük, hogy a szuprakiazmatikus magból eredő VP expresszió maximumát illetve VIP expresszió közel maximumát detektálhassuk (2).

#### **4.1.2.4. Szexuális dimorfizmus**

Hím és nőstény állatokban illetve férfiakban és nőkben a reprodukció központi szabályozása jelentős eltéréseket mutat, így vizsgálataink egy részét mindkét nemre kiterjesztettük, és a vizsgált paraméterekre vonatkozó összehasonlításokat elvégeztük.

#### **4.1.2.5. Gonadektómia és hormonkezelések**

Mivel kísérleteinkben az ovariális szteroid hormonok közül csak az ösztrogén hatását szerettük volna vizsgálni, nőstény egereinket altatásban (ketamin, xylovet és pipolphen 25, 5, ill. 2.5 mg/kg arányú keverékével) ovariektomizáltuk (OVX), majd fiziológiás vérszintet eredményező ösztrogén dózissal kezeltük őket.

Az ösztrogént a kezelések egy részében a következő képpen pótoltuk: 2.5 $\mu$ g 17 $\beta$ -ösztradiolt (E2, 50 $\mu$ g/ml; Sigma) tartalmazó kapszulát ültettünk a bőr alá. A kontroll állatok olajjal töltött kapszulát kaptak. A kapszulák 2 cm hosszú, polietilénnel (belső átmérő = 1.02 mm; külső átmérő = 1.98 mm; Sims Portex, Hythe, UK) lezárt szilikon csőből (belső átmérő = 1.57 mm; külső átmérő = 3.18 mm; Dow Corning Corp., Midland, MI, USA) álltak. Az E2-t abszolút alkoholban, majd napraforgó olajban oldottuk fel 50 $\mu$ g/ml koncentrációban (247). A kapszulákat 90%-os alkoholban, majd deszt. vízben mostuk, ezt követően egy éjszakán át inkubáltuk 0.1% zselatin tartalmú foszfát-pufferelt sóoldatban (PBS, 0.1M, pH=7.4). Az állatokat hét nap múlva fixáló oldattal átperfundáltuk. Az ösztrogén kezelés a fiziológiás tartományon belül (247) szignifikánsan megnövelte az uterusz súlyokat (42 $\pm$ 1.73mg az OVX állatoknál, 205 $\pm$ 45.78mg az OVX+E2 csoportban).



Az ösztrogén kezelések egy másik csoportjában az egerek OVX után két héttel szubkután E2-nel (10µg/kg állat) kezeltük, mely szintén a fiziológias tartományon belül szignifikáns mértékben emeli a vér ösztrogén szintjét (248). A kontroll állatokat olajjal kezeltük.

Harmadik kezelési protokoll szerint OVX után kilenc nappal 100µg/ml 17β-ösztadiolt vagy olajat tartalmazó kapszulát (Sanitech; Havant, UK; hossz=10 mm; belső átmérő=1.57 mm; külső átmérő=3.08 mm) ültettünk az egerek bőre alá (249). Négy nap múlva az állatokat transzkardiálisan megperfundáltuk.

Az intakt hímekekkel való összehasonlíthatóság kedvéért intakt nőstényeket is felhasználtunk, melyek ciklusát hüvelykenet sejtanalízisével (250) határoztuk meg, a kapott adatokat a hüvely nyálkahártya ellenállásának mérésével (251) validáltuk. Közülük a diösztruszban lévő nőstényeket használtuk fel, mivel ebben a fázisban a legalacsonyabb az ösztrogén szintje.

#### **4.1.2.6. Kolhicin kezelés**

Az ARC kisszeptin immunreaktív sejttestjei csak gonadektomizált és kolhicin kezelt állatokban mutathatóak ki, ezért a kisszeptin sejttestek fenotípusos vizsgálatához az állatok oldalkamrájába sztereotaxikus készülék segítségével 40µg kolhicint adtunk. Közvetlenül a műtét után az állatokat i.p. 0.3ml 6%-os nembutállal kezeltük, hogy csökkentjük a kolhicin miatt fellépő görcs rohamokat. Az állatokat másnap transzkardiálisan átperfundáltuk.

#### **4.1.2.7. Anterográd pályajelölés**

Az anterográd pályajelölő anyagot - Phaseolus vulgaris leucoagglutinin - (PHA-L; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA; L-1110, (252)) üveg mikropipettával injektáltunk (belső átmérő 10µm) sztereotaxikus műtét során (51413 áramforrás, Stoelting, Wood Dale, IL; 3µA pozitív áramot alkalmaztunk 10 percen keresztül, 7 másodperces on – 7 másodperces off ciklusokban) egerek szuprakiazmatikus magjába a következő koordináták szerint: antero-posterior: -0.46 mm; medio-lateralis: -0.25 mm; dorso-ventralis: -5.1 mm (253). Az állatokat a műtét után hét nappal fixáló oldattal átperfundáltuk.

## **4.2. Hisztológiai és mérési módszerek**

### **4.2.1. *In vitro* vizsgálatok**

#### **4.2.1.1. Mitokondriális potenciál változások mérése – kvantitatív immunfluoreszcencia**

A mitokondriális potenciál-változás mérésére dihexyloxycarbocyanine iodide (DIOC6)-ot használtunk (254). A mitokondriális membránpotenciál ( $\Delta\Psi_m$ ) az ATP szintézis hajtó ereje, így nélkülözhetetlen a sejtek életben maradásához (255). A sejtek kationos, lipofil fluorokróm (jelen esetben a DIOC6) felvétele a  $\Delta\Psi_m$  függvénye (256), a Nerst egyenletnek megfelelően a mitokondriumokban halmozódik fel és a  $\Delta\Psi_m$  csökkenésének hatására a citoszólba áramlik. A  $\Delta\Psi_m$  csökkenése jelzi az apoptózis korai stádiumát (257) és ezt a sejtek DIOC6 intenzitásának csökkenéséből láthatjuk. A  $H_2O_2$  kezeléssel az oxidatív stressz esetén bekövetkező reaktív szabad gyökök mennyiségi emelkedését kívántuk modellezni.

A kezelések elvégzését követően a fedőlemezeket, melyek felszínén a sejteket tenyésztettük, tárgylemezre borítottuk, így a sejtek a két üvegfelület közé kerültek. Fedőlemezenként 3-5 látóteret fotóztunk Zeiss Axiophot mikroszkóppal FITC filter szettet (excitáció: 450-490nm, emisszió: 510-520nm) használva 40x-es objektívvel. A képeket Image J szoftverrel elemeztük: az egyes sejtek körülrajzolása után megmértük a DIOC6 fluoreszcencia egységnyi területre eső átlagos intenzitását. Az értékeket látóterenként és fedőlemezenként átlagoltuk (átlag $\pm$ SEM). Kezelési csoportonként kiszámoltuk az intenzitás kontrolléhoz viszonyított százalékát.

#### **4.2.2. *In vivo* vizsgálatok: A reprodukció centrális szabályozásában résztvevő neuronális idegi hálózat morfológiai jellemzése**

##### **4.2.2.1. Hisztológiai vizsgálatok – immunfluoreszcencia:**

###### **a) Metszetek előkészítése immunfluoreszcens vizsgálatokra**

Az állatokat előbb 10ml PBS-sel, majd 90 ml 4%-os paraformaldehiddel (PFA, 19210, Electron Microscopy Sciences, Hattfield, PA, USA) transzkardiálisan átperfundáltuk. Az elektronmikroszkópiára szánt agyakat 90ml 4%acrolein-2%PFA oldattal, majd 30ml 2%-os PFA-val perfundáltuk. Az agyakat kivétel után egy éjszakán keresztül 2%-os PFA-ban 4°C-on posztfixáltuk, majd vibratómmal 25 $\mu$ m-es metszeteket készítettünk belőlük. Felhasználásig a metszeteket fagyálló oldatban tartottuk (glicerin és polietilénlikol PBS-ben) -20°C-on.

Az immuncitokémiai processzálást mindig a vizsgálni kívánt terület minden harmadik metszetén végeztük a következő előkezelést követően: a metszeteket 20 percig inkubáltuk PBS-ben hígított 0.5% Triton-X-100-zal (23,472-9, Sigma), 0.5%-os

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal (3.08027, Spektrum-3D, Debrecen, HU). Ezután 3X5 perces PBS-ben való mosás után 10 perces 2%-os normál ló szérumban való inkubálással csökkentettük az antitestek nonspecifikus kötődését.

### **b) Többes immunfluoreszcens jelölés**

A metszeteket 24-72 órán keresztül 4°C-on elsődleges szérumokban, majd újabb 24órán keresztül különböző fluorokrómmal konjugált, a primer szérumokhoz kötő másodlagos IgG oldatban (1:1000, Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA, USA) inkubáltuk. Amennyiben a detektálható jel nem volt elég intenzív, kétféle jelerősítő protokollt alkalmaztunk.

#### **Biotin-tiramid amplifikáció:**

A biotin-tiramid amplifikálás során a metszeteket a primer szérumban való inkubálást követően a primer szérumhoz kötődő, biotinnal konjugált másodlagos IgG oldatban (1:500, Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA, USA) tartottuk 2 órán át. Ezután avidin-biotin-peroxidáz komplexet tartalmazó oldatban (ABC, 1:1000, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) másfél óráig, majd biotinilált tiramidban (1:1000 Trisben, 0.006%-os H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal) fél órát inkubáltuk őket. A jelet fluorokrómmal konjugált streptavidinnel (1:500, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) tettük láthatóvá, melyben 12 óráig tartottuk a metszeteket 4°C-on.

Erősítés peroxidáz-konjugált másodlagos szérummal (Immpress, Vector Laboratories):

Az impress-szel történő jelerősítéskor a metszeteket a primer szérumhoz kötődő peroxidázzal konjugált másodlagos szérumban (1:2 TBS-ben pH=7.4; Vector Laboratories) inkubáltuk három órát. Az immunreaktivitást fluorokrómmal konjugált tiramiddal (1:1000 Trisben, 0.006%-os H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal, fél óra) tettük láthatóvá.

Amikor ugyanazon metszeten mindkét féle amplifikációra szükség volt, akkor a biotin-tiramid amplifikáció során használt ABC maradék peroxidáz aktivitását fél óras, 0.5%-os H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezeléssel semlegesítettük.

A fluorokrómmal jelölt metszeteket tárgylemezre húztuk, és Vectashield-del (Vector Laboratories) fedtük le.

### **c) Konfokális mikroszkópia**

A fluoreszcensen jelölt metszetekből 0.6µm-es optikai szeleteket szkenneltünk Radiance 2100 konfokális mikroszkóppal (Bio-Rad Laboratories, Hemel Hempstead,

UK). A fluorokrómokat a következő lézerekkel és filterekkel detektáltuk: 488 nm FITC-hez 543 nm CY3-hoz 405 nm AMCA-hoz ill. dikroikus/emissziós filterek 560 nm/500–540 nm FITC-hez, 650 nm/560-610 nm CY3-hoz, 500 nm/420-480 nm AMCA-hoz. Az analízishez a felvételeket 179.04x179.04µm-es területekről 60x objektívvel készítettük. A látóterenként a metszet teljes vastagságát lefedő optikai szeleteket analizáltuk Laser Vox (Bio-Rad) szoftverrel.

#### **4.2.2.2. Beágyazás előtti kettős immuncitokémiai jelölés – fény- és elektronmikroszkópia**

Elektronmikroszkópiára szánt metszeteket 0.5%-os Na-borohidridben (Sigma) tartottuk 30 percig, majd a Triton-X-100-zal való kezelés helyett fagyasztással történő feltárást alkalmaztunk, mely során a 30%-os cukor oldattal átítatott szövetet folyékony nitrogénben fagyasztottuk, majd felolvastottuk, mindezt 3-4 cikluson keresztül ismételtük.

A metszeteket primer szérumok keverékében inkubáltuk 2 napon át 4°C-on. PBS-ben való mosás után (3x10 perc) az egyik szérumhoz kötődő, biotinnal konjugált másodlagos IgG oldatban (1:500, Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA, USA) 2 órán keresztül, majd ismét mosást követően ABC (1:1000, Vector Laboratories) inkubáltuk őket másfél óráig. Az immunreakciót a következő összetételű hívóoldattal tettük láthatóvá: 5% diaminobenzidin (DAB)/0.15% Ni-ammónium-szulfát/0.006% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Tris pufferben. Ezüst intenzifikálást (258) követően a metszeteket a második primer szérumot felismerő biotinált másodlagos IgG-ben inkubáltuk, majd ABC oldatban. Ezt követően a második jelet DAB-bal jelenítettük meg. A fénymikroszkópiára szánt metszeteket tárgylemezre húztuk fel, majd felszálló alkohol sorban illetve xilolban dihidráltuk és delipidáltuk, majd DPX-szel (Fluka Chemie; Buchs, Switzerland) lefedtük őket.

Elektronmikroszkópiára a kettősen jelölt metszeteket 1% ozmium tetroxiddal (1 óra), majd 2% uranil-acetáttal (70%-os alkoholban oldva; 40 perc) kezeltük, felszálló alkoholsorban és propilén oxidral dehidráltuk. A metszeteket ezután TAAB 812 epoxi gyantába ágyaztuk tárgylemez és fedőlemez közé, melyeket a könnyebb szétszedhetőség érdekében Hobbytime-mal előkezeltünk (#70880, Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA). A gyantát 2 napig hagytuk polimerizálódni 56°C-on. Félvékony (1µm) és ultravékony (50-60nm) metszeteket készítettünk Leica UCT ultramikrotómmal (Leica Microsystems, Vienna, Austria). Az

ultrametszetekből álló szalagokat Formvar-hártyával borított egylyukú gridekre gyűjtöttük, 2% ólom citráttal kontrasztoltuk, a felvételeket Jeol-100 C transmíziós elektron mikroszkóppal készítettük.

#### **4.2.2.3. Immunitokémiai kontrollok**

A primer szérumok specificitására vonatkozó irodalmi adatokat az adott kísérlet leírásánál ismertetem.

A módszer specificitását a primer szérumok hígításával ill. teljes elhagyásával teszteltük, mely az immunjel fokozatos csökkenését majd teljes eltűnését eredményezte.

A szekunder antitestek specificitását a primer antitestek elhagyásával történő processzállással ellenőriztük. A primer antitestek elhagyásakor a szekunder antitestek nem eredményeztek detektálható jelet.

#### **4.2.2.4. Kettős *in situ* hibridizáció**

Egy korábban leírt metodika szerint (259) előállított <sup>35</sup>S-UTP-vel jelölt egér galanin (230-631 szakasz az egér preprogalanin mRNS-en, NM\_010253.3) illetve digoxigeninnel jelölt egér KP próbákat (76-486 szakasz az egér KP mRNS-en, AF 472576) használtunk. Galanin és KP mRNS kolokalizációjához a metszeteket acetilálás (0.25% acetanhidrid 0.9% NaCl/0.1M trietanolamin HCl, 10 perc) után 2 percig mostuk 2x SSC oldatban (1xSSC=0.15M NaCl/0.015M Na-citrát, pH=7), majd hibridizációs oldatban (izotópos galanin és digoxigenin-jelölt KP próbák keveréke PCR csőben) inkubáltuk. A poszthibridizációs lépések (20µg/ml RNáz általi emésztés 1 órán át 37°C-on; 30 perc 0.1xSSC-ben való inkubálás 60°C-on) után a metszeteket maleát pufferben (100mM, pH=7.5) mostuk és a nem specifikus kötések csökkentésére 2%-os blokkoló oldatban (Roche) tartottuk 30 percig. Ezután peroxidázzal konjugált anti-digoxigenin antitesttel (anti-digoxigenin-POD; Fab szakasz; 1:100; Roche; egy éjszakán át 4°C-on) jelöltük a próbákat. A metszetek TBS-ben (0.1 M Tris-HCl/0.9% NaCl; pH 7.8) való mosása után biotinilált tiramidban (TSA kit; NEN Life Science Products, Boston, MA) inkubáltuk 30 percig, mostuk TBS-ben és ABC (Vector) oldatban hagytuk 1 órán át. A biotinilált tiramidban való inkubálást megismételtük, majd a jelet végül CY3-mal konjugált avidinnel tettük láthatóvá (Jackson ImmunoResearch; 1:500). Mosás után a metszeteket szilánozott tárgylemezre húztuk és megszáritottuk. Az izotópos jel láthatóvá tételére a

lemezeket Kodak NTB emulzióba mártottuk és száradás után sötétben tartottuk két hétig. A hívást a Kodak előírásainak megfelelően végeztük. Dehidráció (felszálló alkoholsor) és delipidálás (xilol, 2x5 perc) után a metszeteket DPX-szel fedtük le (Fluka Chemie; Buchs, Switzerland).

#### **4.2.2.5. Statisztika**

Az átlagokat egy utas ANOVA-val hasonlítottuk össze, Tukey Kramer többszörös összehasonlító post hoc tesztet használtunk. Statisztikailag szignifikánsnak tekintettük a különbségeket  $p < 0.05$  esetében.

### **4.3. Kísérletek**

#### **4.3.1. Ösztrogén receptor agonisták protektív hatásának vizsgálata oxidatív stresszel szemben GT1-7 sejtenyészetben**

Immortalizált, GnRH-szekretáló GT1-7 sejteken 24 órás  $17\beta$ -ösztradiol illetve szelektív ER agonisták kezelését követően vizsgáltuk, hogy ezek megakadályozzák-e a sejtekben az oxidatív stressz ( $100\mu\text{M H}_2\text{O}_2$  kezelés 50 percig) hatására fellépő mitokondriális membrán potenciál csökkenést. A kísérlet első napján a sejteket friss tápfolyadékban felfuszpendáltuk ( $60,000$  sejt/ml) és 24 lyukú tenyésztő edénybe helyeztünk 12mm átmérőjű üveg fedőlemezekre növesztettük őket. 48 óra után szteroidmentes médiumra (amelyben különbözik a normál médiumtól, hogy fenol-vörös mentes DMEM-et használtunk és aktív szén-dextrán 2:1 arányú keverékével szteroidmentesített szérumokat) cseréltük a tápfolyadékot, melyben 24 óráig tenyésztettük őket. Ezt követően az egyes kezelési csoportokat (3-3 lyuk) a következő ER agonisták oldatával kezeltük. A kontroll csoportok (1-2 csoport) nem kaptak agonista kezelést. Másnap az oldatokat HBSS-re cseréltük, egy óra múlva 50 percig  $100\mu\text{M H}_2\text{O}_2$  -dal (Spektrum) kezeltük őket. Az 1, 3, 5, 7 csoportok HBSS-ben maradtak, nem tettük ki őket oxidatív stressznek. A  $\text{H}_2\text{O}_2$  eltávolítása után a sejteket HBSS-ben mostuk (2x5 perc), majd  $40\text{nM}$ -os 3,3'-dihexyloxycarboyanine iodide (DiCO6)-tal (Dr. Mihalik Rudolf ajándéka) inkubáltuk 30 percig.

A vizsgált kezelési csoportok:

1 kontroll	2 100 $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3 DPN	4 DPN+100 $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
5 PPT	6 PPT+100 $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	7 E2	8 E2+100 $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

Az agonistáknak 10pM koncentrációját alkalmaztuk, a mitokondriális membrán potenciál változását a kationos, lipofil DIOC6 sejtekhez adásával mutattuk ki.

#### **4.3.2. A szuprakiazmatikus mag sejtjei és a kisszeptin neuronok kapcsolatának morfológiai vizsgálata.**

##### *Metszetek*

Diósztrusz fázisában lévő, ovariektomizált (OVX), OVX+2.5 $\mu$ g 17 $\beta$ -ösztradiollal kezelt nőtény egerekből származó metszeteket használtunk fel. Az ösztrogénnel kezelt állatok egy részénél PHA-L-t injektáltunk a SCN-ba.

##### *PHA-L-góc értékelése és axonális transzport kimutatása a célterületeken*

Az SCN-ot és RP3V-t tartalmazó metszeteken a PHA-L-t kecske anti-PHA-L szérumban (Vector Laboratories AS-2224; 0.5 $\mu$ g/ml) felhasználásával NiDAB-bal jelenítettük meg.

##### *PHA-L és VP kolokalizációja a KP sejtek afferenseiben a VP rostok SCN eredetének bizonyítására - hármas immunofluorescens jelölés*

A RP3V régiót tartalmazó metszeteket kecske anti-PHA-L (0.2 $\mu$ g/ml) szérumban inkubáltuk, a jelet biotin-tiramid amplifikálást után Alexa488-konjugált streptavidinnel tettük láthatóvá. A metszeteket ezután nyúl anti-KP szérumban (1:10000, #566, A. Caraty ajándéka, Tours, Franciaország) inkubáltuk, impress-szel való jelerősítést követően KP immunreaktivitást rhodamin tiramiddal tettük láthatóvá. Ezt követően a metszeteket egér anti-vazopresszin szérumban (1:50, PS41, H. Gainer bocsátotta rendelkezésünkre), majd AMCA-val konjugált számár anti-egér szekunder antitestben inkubáltuk.

##### *Galanin és vazopresszin kolokalizációja a KP sejtek afferenseiben a VP rostok SCN eredetének bizonyítására – hármas immunofluorescens jelölés*

A RP3V-t tartalmazó metszeteket a következő primer szérumok keverékében inkubáltuk: nyúl anti-KP (1:10000), egér anti-VP (1:100) és juh anti-galanin (1:20000, I. Merchenthaler ajándéka). Biotin-tiramin amplifikálás után a KP immunreaktivitást AMCA-hoz konjugált avidinnel tettük láthatóvá. Az egér anti-VP-t fluorescein izotiocianáttal (FITC) konjugált kecske anti-egér IgG-vel, a juh anti-galanint pedig CY3-konjugált kecske anti-juh IgG-vel jelöltük.

*Kvantitatív analízis a VP-t és galanint is tartalmazó KP afferensek ösztrogénfüggőségének kimutatására - konfokális mikroszkópia*

Minden agyból az RP3V öt rosztrokaudális szintjéből (Bregma 0.38mm, 0.26mm, 0.14mm, 0.02mm and -0.1) származó metszeteket szkenneltünk. Az optikai szeletek analízise során megszámloltuk a KP-IR neuronokat, meghatároztuk azon KP neuronok arányát, melyeken VP-IR appozíciók találhatóak és az egy KP sejtre jutó VP varikozitások számát (csak a galanin immunnegatív boutonokat vettük figyelembe), melyek a KP-IR sejttel ill. proximális dendrittel szomszédosak, legalább egy optikai szeleten nem látható köztük hézag. Az adatok átlag±SEM formában szerepelnek (Táblázat 1).

*Kisszeptin és vazóaktív intesztinális polipeptid (VIP) együttes kimutatása – VIP afferensek keresése KP sejteken - kettős immunfluoreszcens jelölés*

A metszeteket nyúl anti-KP (1:10000) és tengeri malac anti-VIP (1:200; T5030, Peninsula Laboratories Inc, Belmont, CA, USA) primer szérumban inkubáltuk. A VIP immunreaktivitás vizualizációjához a metszeteket FITC-cel konjugált szamar anti-tengeri malac IgG-vel, a KP immunreaktivitást biotin-tiramin amplifikálás után Alexa594-konjugált streptavidinnel mutattuk ki.

*KP-IR sejtek VP-IR afferenseinek ultrastrukturális vizsgálata – szinaptikus kapcsolat kimutatása*

A metszeteken a VP-t egér anti-VP szérum (PS41, 1:500) felhasználásával detektáltuk, a jelet NiDAB-bal tettük láthatóvá. Ezüst-arany intenzifikálást követően a KP-t DAB-bal jelenítettük meg nyúl anti-KP szérum (1:20000) segítségével.

*Kontrollok*



Az anti-VP, anti-KP, anti-VIP és anti-galanin primer szérumok specificitását már korábban leírták ((260-263)). A gyártó leírása szerint a PHA-L antiszérumot kecske tisztított PHA-L-lel történő hiperimmunizálással állították elő, a specifikus antitesteket affinitás kromatográfiával izolálták PHA-L-agaróz oszlopokon. Mivel a PHA-L nincs jelen az agyban, a PHA-L antitest specifikusságát olyan metszetek processzálásával ellenőriztük, melyek intakt állatból származtak. Ezekben a metszeteken nem detektáltunk immunjelet.

#### **4.3.3. Kisszeptin immunreaktív neuronok és GnRH idegsejteken lévő terminálisuk fenotípusának vizsgálata**

*Metszetek:*

A fenotípusos vizsgálatokhoz 10µg/kg ösztrogénnel illetve olajjal kezelt nőstény egerekből származó metszeteket használtunk fel. Az ösztrogénnel kezelt állatok fele kolhicint is kapott.

*Galanin illetve NKB kolokalizációja kisszeptinnel a RP3V-ben és az ARC-ban lévő kisszeptin neuronok neurokémiai jellemzésére – kettős immunfluoreszcens jelölés*

A RP3V-t (OVX+E2 csoportból származnak) ill. az ARC-t (OVX+olaj csoportból származnak) tartalmazó metszeteket a következő primer szérumok keverékében inkubáltuk: nyúl anti-KP (1:10000) és juh anti-galanin (1:20000) vagy tengeri malac anti-neurokinin B (NKB, 1:500, P. Ciofi ajándéka). Biotin-tiramid amplifikálás után a KP immunreaktivitást Alexa594 streptavidinnel tettük láthatóvá. A juh anti-galanin pedig FITC-konjugált szamar anti-juh IgG-vel, a NKB-t FITC-konjugált szamar anti-tengeri malac IgG-vel mutattuk ki.

*Galanin illetve NKB kolokalizációja KP-nél a GnRH neuronok afferenseiben – hármas immunfluoreszcens jelölés*

Az OVX+E2 és az OVX+olaj csoportokba tartozó egerekből származó GnRH neuronokat tartalmazó metszeteket (1.18-0.26mm Bregma szintekről (253)) a következő primer szérumok keverékében inkubáltuk: monoklonális egér anti-GnRH (A4E1; 1:1000; D. W. Silversides ajándéka), nyúl anti-KP (1:1000) és juh anti-galanin (1:20000) vagy tengeri malac anti-neurokinin B (1:500). Biotin-tiramid amplifikálás után a GnRH immunreaktivitást AMCA avidinnel tettük láthatóvá. A nyúl anti-KP-t CY3-mal konjugált szamar anti-nyúl IgG-nal, a juh anti-galanint FITC-

konjugált számár anti-juh IgG-vel, a NKB-t pedig FITC-konjugált számár anti-tengeri malac IgG-vel jelöltük.

*GnRH-IR sejtek KP-IR afferenseinek ultrastrukturális vizsgálata - szinaptikus kapcsolat kimutatása*

OVX+E2 csoportba tartozó egerek preoptikus régióját tartalmazó metszeteit nyúl anti-KP (1:20000) szérumban inkubáltuk, majd az antigént ezüstözött NiDAB-bal tettük láthatóvá. A második antigént, a GnRH-t tengeri malac anti-GnRH szérum (#1018; E. Hrabovszky; 1:10000) segítségével, DAB-bal mutattuk ki.

*Konfokális mikroszkópia*

A kettős immunjelölt metszetekből az RP3V és az ARC három-három rosztrokaudális szintjéből (RP3V: Bregma 0.26-0.38mm, 0.14mm, -0.1-0.02; ARC -1.46-1.7mm, -1.82-1.94mm, -2.46-2.54mm) végeztük a konfokális elemzést, mely során meghatároztuk azon KP neuronok arányát, melyek galanint ill. NKB-t tartalmaznak. Az adatok átlag±SEM formában szerepelnek (Táblázat 2). A hármas immunjelölt metszeteket három régióra osztottuk (226): 1.18-0.98; 0.86-0.74; 0.62-0.26mm és mindhárom régióból két-két metszetet analizáltunk, mely során meghatároztuk a GnRH perikarionokon és proximális dendritekenen lévő KP appozíciók számát és a KP-IR boutonok arányát, melyekben galanin vagy NKB immunreaktivitást is találtunk.

*Kontrollok*

A 4.2 alfejezet végén leírtak kiegészítéseképp: a tengeri malac anti-NKB primer szérum (264) és az egér anti-GnRH primer szérum (265) specificitását korábban leírták.

*Galanin és KP mRNS detektálása és kolokalizálása az RP3V és az ARC neuronjainak neurokémiai jellemzésére - kvantitatív kettős in situ hibridizáció*

Digoxigeninnel jelölt KP és a <sup>35</sup>S izotóppal jelölt galanin próbák felhasználásával OVX+E2 egerekben az RP3V-ben (n=3), OVX+olaj egerekben pedig az ARC-ban (n=3) vizsgáltuk, hogy a KP neuronok hány százalékában található galanin mRNS. Minden negyedik OVX+E2 egérből származó RP3V-t és OVX+olaj állattól származó ARC-t tartalmazó metszetet processzáltunk. A KP mRNS pozitív sejteket

fluoreszcens mikroszkóp segítségével (excitáció 540-590nm, 595nm-es hullámsáv-szűrő, emisszió 600-660nm), az azonos látóter autoradiográfiás jelét pedig sötét háttér megvilágítás mellett azonosítottuk. Minden metszet minden látóterét azonos paraméterekkel, azonos expozíció mellett fotóztuk 40x objektívvel. Az elemzést Image J szoftverrel végeztük: adott küszöb érték mellett meghatároztuk, hogy egy-egy fluoreszcens sejt területének hány százalékát foglalják el az ezüst szemcsék. Minden metszeten meghatároztuk a háttér százalék értékét is, egy KP sejtet akkor tekintettünk kettősen jelöltnek, ha a jel egységnyi területen a háttér legalább háromszorosát elérte (224). Állatonként meghatároztuk a kettősen jelölt KP sejtek százalékát, az egyes állatokra vonatkozó értékekből átlag $\pm$ SEM értéket kaptunk.

#### **4.3.4. A kisszeptin rendszer morfológiai jellemzése humán hipotalamuszban**

##### *Kisszeptin-immunreaktív sejtek térképezése nők és férfiak hipotalamuszában*

Minden húszadik metszetet a következő primer antiszérumok egyikében inkubáltuk: nyúl anti-KP (#566, 1:25000) illetve juh anti-KP (GQ2, 1:200000 az acroleinnal fixált metszeteknél és 1:100000 a PFA-val fixáltaknál). Az előbbi tíz aminosav hosszú KP fragmens ellen termeltetett, mely 90%-ban megegyezik a megfelelő humán KP szekvenciával. KP-KO egerek felhasználásával kimutatták, hogy specifikusan a KP-hez kötődik, azonban humán szöveteken még nem validálták. A GQ2 az 54 aminosav hosszú humán KP ellen termeltetett, a KP-54-en kívül felismeri a KP-14 és a KP-10 formákat is, viszont nem ismeri fel az egyéb humán RF amid peptideket (266). A KP immunreaktivitást ezüst intenzifikált NiDAB-bal tettük láthatóvá.

Ezt követően a metszeteket tárgylemezre húztuk, a metszetek egy harmadik csoportjával együtt, melyeken Nissl festést végeztünk, hogy az immunjelölt metszeteken való tájékozódást segítsük. A Nissl festett metszeteket Zeiss AxioImager M1 mikroszkóp, AxioCam MRc 5 digitális kamera és AxioVision 4.6 software (Carl Zeiss, Göttingen, Németország) felhasználásával beszkeneltük. Ezen képek segítségével sematikus ábrákat készítettünk CorelDRAW11 software-rel feltüntetve rajtuk a KP-IR struktúrákat.

##### *Nemek közti különbségek analízise*

A juh anti-KP primer szérummal jelölt metszeteken összehasonlítottuk a KP-IR rostok mennyiségét 200-szoros nagyítás mellett 5X5 okuláris grid segítségével 25 mezőben (0.0625mm<sup>2</sup> területen) a periventrikuláris (PeN) és az infundibuláris magban (Inf). A

KP-IR sejttesteket hasonló módon számoltuk 100-szoros nagyítás mellett (0.25 mm<sup>2</sup> területen). Az egyes agyaknál azt a maximális számot vettük figyelembe, melyet egyazon régió vizsgálatakor a különböző metszeteken kaptunk. Két utas ANOVA analízissel vizsgáltuk a nemek közti és a fixálás okozta különbségeket. Általános regresszió analízissel nemenként ellenőriztük az életkor hatásait a vizsgált paraméterekre.

*Humán GnRH-IR és KP-IR idegsejtek morfológiai kapcsolatának vizsgálata - KP-IR rostok GnRH neuronokkal kialakított kontaktusainak azonosítása*

A KP immunreaktivitást nyúl illetve juh anti-KP szérum felhasználásával a fent leírt módon detektáltuk, majd a metszeteket nyúl anti-GnRH primer szérumban inkubáltuk (LR-1, 1:20000, R. A. Benoit ajándéka), a szignált DAB-bal mutattuk ki. A kettősen jelölt metszeteket lefedtük és minden GnRH neuront lefotóztunk. A KP-IR rostok és a GnRH neuronok kontaktusainak számát 630-szoros nagyítás mellett számoltuk. Egy utas ANOVA-val vizsgáltuk, hogy a kontaktusok számában és a kontaktust képező GnRH neuronok arányában van-e nemek közti különbség.

*Kisspeptin és neurokininB immunreaktivitás vizsgálata a humán agy preoptikus és infundibuláris régiójában – KP neuronok neurokémiai vizsgálata*

A preproNKB detekciójához újonnan előállított primer szérumokat (IS-681, IS-682) használtunk, melyhez a humán preproNKB 28 aminosav hosszú szakaszával immunizáltak nyúlakat (P. Ciofi ajándéka).

A kettős immunfluoreszcens jelölés előtt a metszeteket Sudan feketével kezeltük a lipofuszcinn lerakódások miatt jellemző autofluoreszcencia csökkentésének érdekében (267). A metszeteket ezután a következő primer szérumok keverékében hagytuk 48 órán át: juh anti-KP (1:10000) és nyúl anti-preproNKB (IS-681, 1:1000). A KP immunreaktivitás vizualizálásához FITC konjugált szamar anti-juh szekunder antitestet, a preproNKB-hez pedig CY3-mal konjugált szamar anti-nyúl IgG-t.

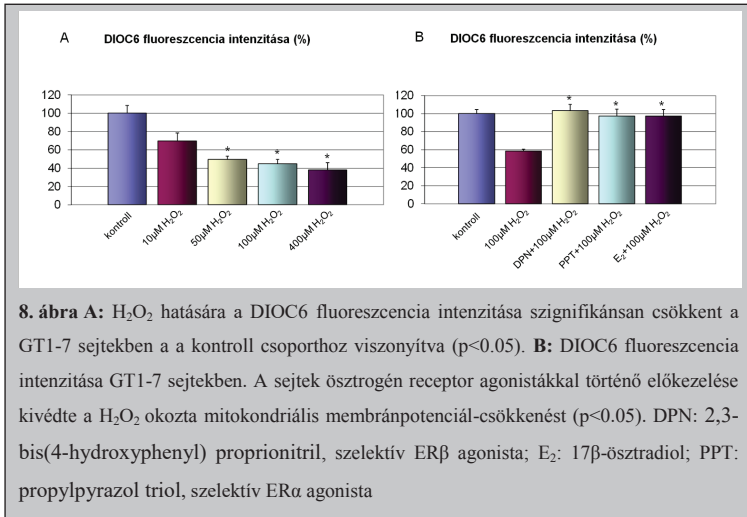
A metszeteket konfokális mikroszkóppal analizáltuk. Női mintákból három olyat választottunk ki, melyek metszeteiben alacsony volt az autofluoreszcencia, és meghatároztuk, hogy a KP-IR rostok hány százalékában expresszálódik preproNKB a Pe és az Inf területén.

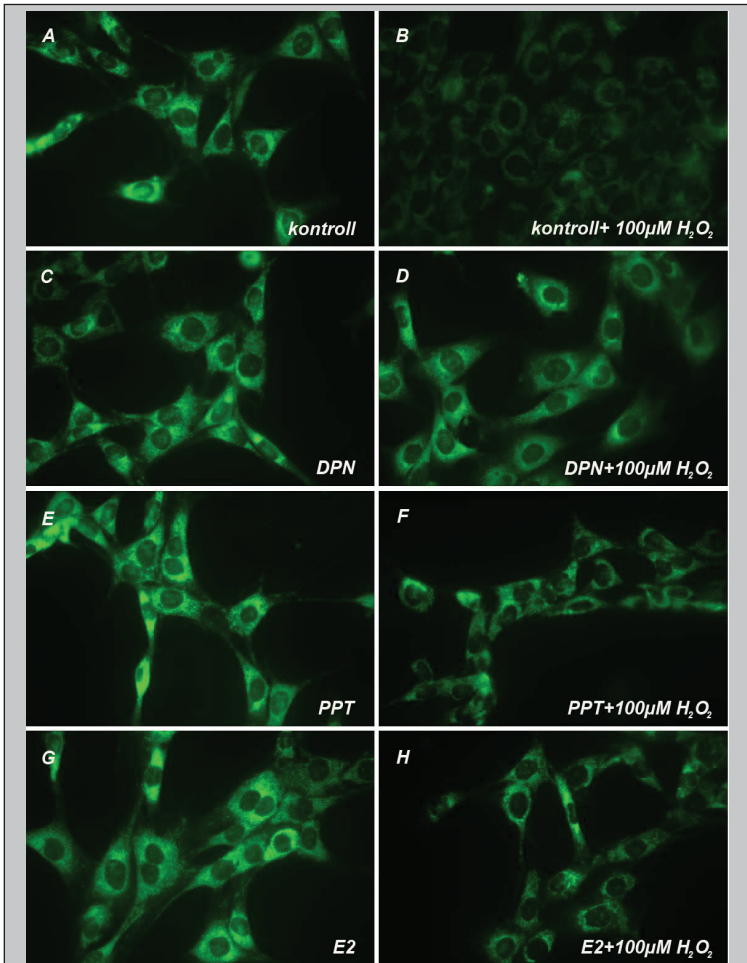
## 5. Eredmények

### 5.1. GnRH neuronokban ösztrogén receptor agonisták kivédik az oxidatív stressz okozta mitokondriális membránpotenciál – csökkenést in vitro

GT1-7 sejtek  $H_2O_2$  kezelése koncentráció-függő módon csökkenést okoz a sejtek által felvett DIOC6 fluoreszcenciájának intenzitásában, mely a mitokondriális membránpotenciál csökkenését jelzi (8. A ábra).

A  $H_2O_2$ -nak ezen hatását mind a  $17\beta$ -ösztradiollal, mind a szelektív ösztrogén receptor agonistákkal (szelektív  $ER\alpha$  agonista: PPT, szelektív  $ER\beta$  agonista: DPN) való kezelés (10pM) kivédi, a  $H_2O_2$  okozta membránpotenciál csökkenés szignifikánsan kisebb a kezelt csoportokban a kontrollhoz viszonyítva, melyet  $ER$  agonista-mentes mediummal kezeltünk (8. B, 9. ábra).





**9. ábra** A GT1-7 sejtek mitokondriális membránpotenciál ( $\Delta\Psi_m$ )-függő DIOC6 felvétele. A kontroll csoportban a fluorokróm elsősorban a mitokondriumokban halmozódik fel (A). Oxidatív stressz hatására csökken a  $\Delta\Psi_m$ , melynek hatására kevesebb DIOC6 jut a sejtekbe, ezt a fluoreszcencia intenzitásának csökkenése jelzi (B). Az ösztrogén receptor (ER) agonisták (DPN, PPT, E2) önmagukban nem befolyásolták a fluoreszcencia intenzitását (C, E, G) az A panelben illusztrált csoporthoz viszonyítva. A sejtek ER agonistákkal történt 24 órás előkezelése megvédte a mitokondriumokat a  $\Delta\Psi_m$  csökkenésétől (D, F, H).

## 5.2. A kisszeptin neuronok közvetíthetik a cirkadián szignált a GnRH neuronok felé

A hús PHA-L beadásból a góc hat esetben volt a SCN-ban, ebből három nem terjedt túl a mag határain (10. A ábra). Mindhárom esetben jelölt rostok nagy számban voltak megfigyelhetők az ipsilaterális RP3V területén, néhány azonban a kontralaterális oldalon is látható volt. Három immunfluoreszcens jelöléssel VP- és PHA-L kettősen jelölt axonterminális appozícióját mutattunk ki a KP sejteken (10. B&C ábra), mely arra utal, hogy a SCN VP neuronjai beidegzik az RP3V KP idegsejtjeit.

A következőkben vizsgáltuk, hogy a KP neuronok VP-IR afferenciációját befolyásolja-e az ösztrogén mennyisége, illetve, hogy beidegzés mértékében kimutatható-e nemek közti különbség. E kérdések megválaszolására a RP3V-ban KP, VP és galanin három immunfluoreszcens jelöléseket végeztünk szimultán, négy állapotmodellből - intakt hímekből, diösztruszos, OVX+E2-lal kezelt valamint OVX+olajjal kezelt nőstényekből - származó metszeteken.

Korábbi eredményekhez (221, 224) hasonlóan több KP-IR sejttestet mutattunk ki az OVX+E2 nőstény RP3V régióban az OVX nőstényekhez képest ( $248 \pm 13.57$  versus  $179.33 \pm 13.39$ ,  $P < 0.05$ , Táblázat 1). Hímekben átlagosan  $5.33 \pm 0.88$  KP neuront találtunk a vizsgált területen. A KP neuronokat galanin és VP rostok vették körül (10. H ábra). VP-IR varikozitások appozíciókat képeztek a KP sejttesteken (10. G&H ábra). Az összes VP-IR appozíciók mindössze 2%-a tartalmazott galanint (10. H ábra). Az OVX nőstények RP3V régiójában a KP neuronok  $30.79 \pm 1.63\%$ -án találtunk VP boutonokat, ezt az arányt az ösztrogén kezelés szignifikánsan ( $p < 0.05$ ) megnövelte  $46.95 \pm 1.88\%$ -ra. Az ösztrogén kezelés a KP neuronokon lévő átlagos bouton-számot is szignifikánsan megnövelte ( $0.40 \pm 0.03$ -ról  $0.62 \pm 0.05$ -ra,  $p < 0.05$ ). A hímek kis számú KP neuronjain hasonló arányban mutattunk ki VP-IR appozíciókat, mint a nőstényekben ( $57.61 \pm 11.35\%$ ). A VP-nel ellentétben VIP-IR varikozitások a modelltől függetlenül nagyon ritkán képeztek appozíciókat a KP neuronokon (10. I ábra).

Elektronmikroszkópiával vizsgáltuk a KP- VP-IR struktúrák közti appozíciók ultrastrukturális jellemzőit. Egymást követő, szomszédos ultravékony metszeteken szimmetrikus szinapsziszokat azonosítottunk a VP-IR terminálisok és KP-IR sejttestek közt (11. ábra).

	OVX+olaj	OVX+E2	Diösztusz nőstény	Intakt him
KP-IR neuronok száma	179.33±13.90 <sup>a</sup>	248±13.57 <sup>b</sup>	183.66±20.48 <sup>a,b</sup>	5.33±0.88 <sup>c</sup>
VP-IR appozíciók száma KP neuronokon %	30.79±1.63 <sup>a</sup>	46.95±1.88 <sup>b</sup>	33.67±4.89 <sup>a,b</sup>	57.61±11.37 <sup>a,b</sup>
A KP neuronokon lévő VP-IR appozíciók átlagos száma	0.40±0.03 <sup>a</sup>	0.62±0.05 <sup>b</sup>	0.45±0.08 <sup>a,b</sup>	0.75±0.22 <sup>a,b</sup>

**Táblázat 1** A táblázat a KP-IR neuronok számát, VP-IR appozíciókat fogadó KP-IR sejtek százalékos arányát valamint, a KP-IR sejteken átlagosan végződő axonok számát mutatja ovariectomizált (OVX+olaj), ovariectomizált ösztrogén kezelt (OVX+E2), valamint intakt nőstény (diösztusz fázisban lévő) ill. him egerek RP3V régiójában.

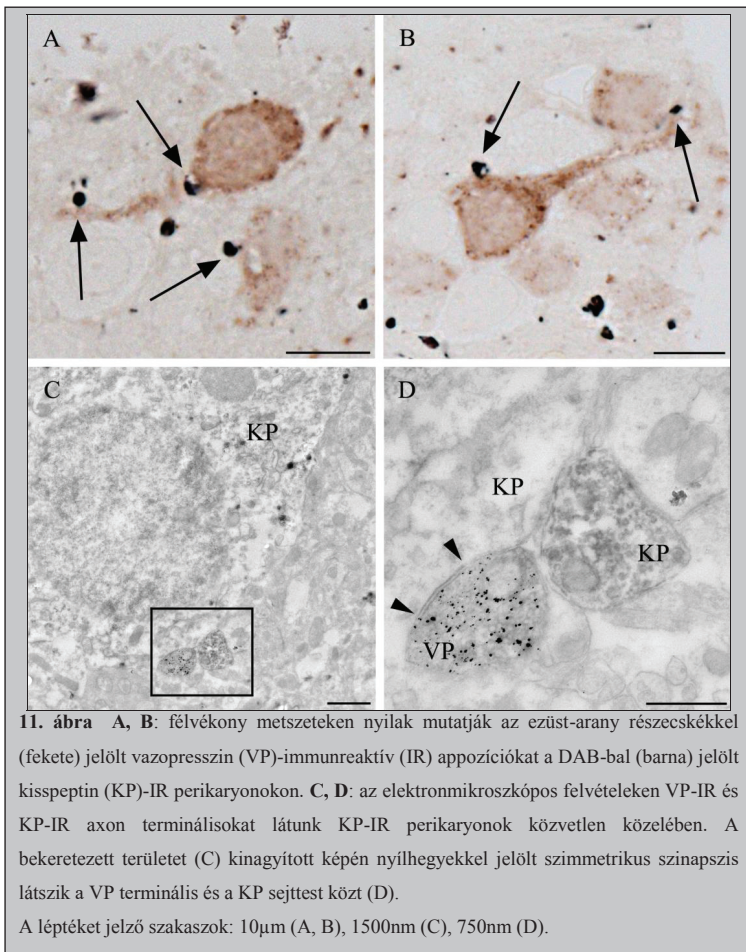
**10. ábra** (következő oldalon) Anterográd tracerrel (PHA-L) történő pályajelölés és többes immunfluoreszcens jelölés mutatja a suprachiasmaticus mag (SCN) és a rostrális periventriculáris régió kisspeptin (KP) idegsejtjei közti neuronális kapcsolatot. A PHA-L injekciós gócot Ni-DAB jelzi a SCN-ban (A). KP (piros), PHA-L (zöld) és vazopresszin (VP, kék) hármas immunfluoreszcens jelölésével PHA-L- és/vagy VP-immunreaktív (IR) appozíciókat láthatók a KP neuronokon (B). A nagy nagyítású képen példa (C) látható KP-IR neuronon (nyíl) található PHA-L és VP kettősen jelölt appozícióra. A VP rostok suprachiasmaticus eredetét azok galanin immunnegativitása jelzi. VP-IR varikozitások KP neuronok perikaryonjaival és proximális dendritjeivel képezett kontaktusait azonosítottuk a RP3V területén (D-F), ahol a KP-t késsel (D) a galanint pirossal (E) a VP-t zölddel (F) jelöltük. A VP-IR, galanin immunnegatív appozíciókat nyílhegyek mutatják (G, H). A VP-IR appozíciók 2%-ában galanin is kimutatható volt. A vazoaktív intesztinális polipeptid (VIP)-IR axonok KP neuronokkal képezett kontaktusai csak ritkán voltak megfigyelhetők (I). A képek az összes (B, D-F) vagy két szomszédos (C, G-I) optikai szelet összevetésével készültek.

A léptéket jelző szakaszok: 50µm (A), 20µm (B), 15µm (C), 30µm (F) és 15µm (I).

AVPV: anteroventrális periventriculáris mag; MPOM: mediális preoptikus mag mediális része; PeN: periventriculáris preoptikus mag.







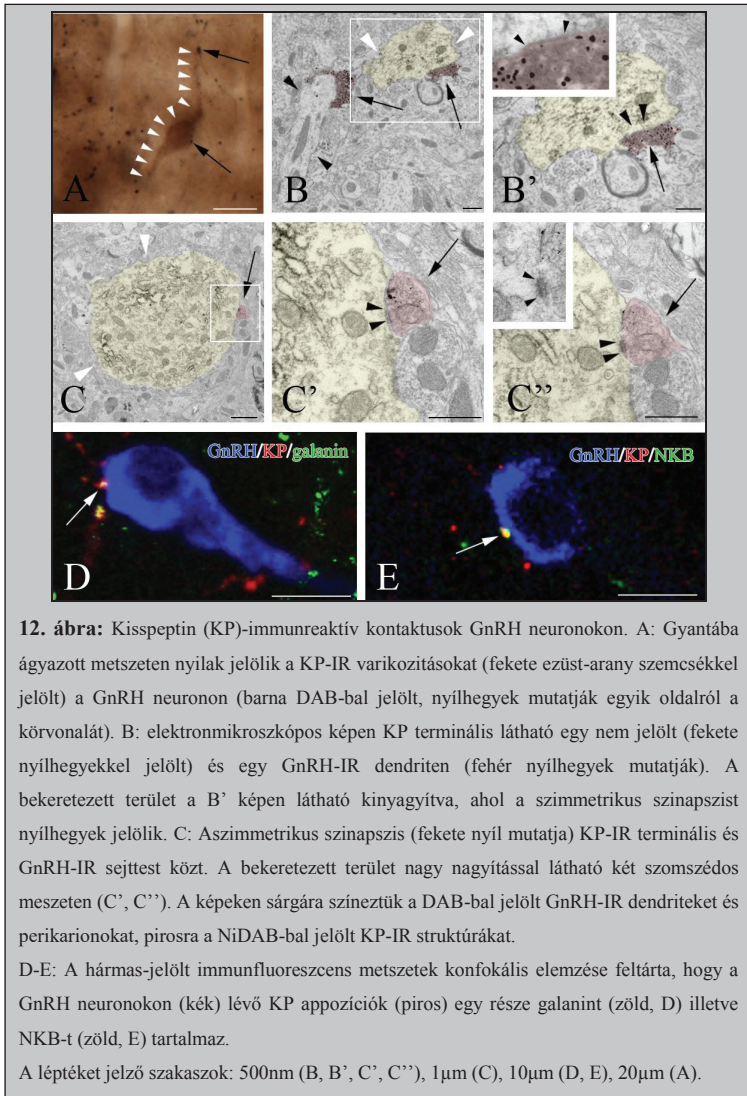
### 5.3. Kisszeptin neuronok különböző alpopulációi vesznek részt GnRH idegsejtek beidegzésében

A korábban intakt nőtény egerek GnRH neuronjain kimutatott KP-IR appozíciók (226) mennyiségét vizsgáltuk konfokális mikroszkóppal ösztrogénnel illetve kontrollként olajjal kezelt nőtény egerekből származó immunfluoreszcens kettősen jelölt metszeteken. Az analízist a GnRH sejttesteket tartalmazó POA területének három rostralkaudális síkjának megfelelő metszeteken végeztük. A korábbi eredményeknek megfelelően mindkét nőtény modellben a rostrális síkban alig, míg

a kaudálisokban nagy számban figyeltünk meg KP-IR kontaktusokat. A kaudális síkokban a 24 órás ösztrogén kezelés nem változtatta meg sem a kontaktust fogadó GnRH neuronok arányát (OVX+olaj csoport:  $73.90 \pm 4.32\%$ , OVX+E2 csoport:  $80.07 \pm 5.81\%$ ,  $p=0.4$ ,  $n=4$ ), sem az appozíció/sejttest számot (OVX+olaj csoport:  $1.98 \pm 0.31$ , OVX+E2 csoport:  $2.38 \pm 0.37$ ,  $p=0.38$ ,  $n=4$ ).

A GnRH neuronokon lévő KP-IR kontaktusok ultrastrukturális vizsgálatával axoszomatikus és axodendritikus kontaktusok közt kimutattunk mind szimmetrikus (12. B, B' ábra) mind aszimmetrikus szinapszist (13. C-C'' ábra), mely mutatja a GnRH neuronok KP afferenseinek különbözőségét.

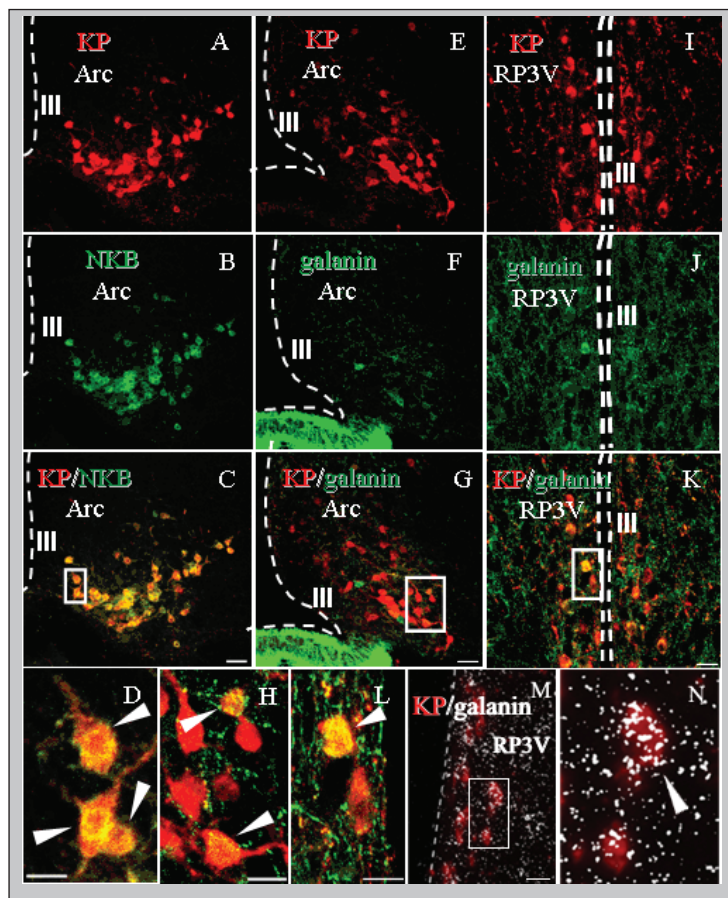
A hármás immunfluoreszcensen jelölt metszeteken a GnRH neuronokon lévő KP-IR appozíciók konfokális vizsgálatával kimutattuk, hogy OVX+olaj állatokban a KP-IR varikozitások  $5.78 \pm 1.57\%$ -ában található galanin immunreaktivitás (12. D ábra), és mindössze  $2.08 \pm 2.08\%$ -uk NKB immunpozitív (12. E ábra). Az ösztrogén-kezelte egerekben a KP appozíciók magasabb arányban tartalmazták mindkét neuropeptidet, galanin  $22.5 \pm 2.41\%$ -ukban fordult elő ( $p < 0.05$ ), míg a NKB  $5.61 \pm 2.57\%$ -ukban ( $p > 0.05$ ). A GnRH neuronokon vizsgált boutonok neuropeptid tartalma tehát eredményeink szerint ösztrogén szabályozás alatt állnak, mely jelzi az ösztrogén fiziológiai szerepét a vizsgált neuropeptidek szintézisében és/vagy felszabadulásában. A KP-IR sejttestek fenotípusának vizsgálatához kétféle egér modellt használtunk, hogy a KP neuronok maximális számát mutathassuk ki mind a RP3V-ben, mind az ARC-ban. A KP expresszió magasabb szintje miatt OVX+olaj nőstényekben vizsgáltuk az ARC-béli kolokalizációt, míg OVX+E2 állatokból származnak az RP3V-re vonatkozó adataink. Ezen kezeléseket mellet az egerek kolhicint is kaptak az oldalkamrájukba, hogy tovább növeljük a perikariális KP-szintet. A kettősen jelölt metszetek konfokális elemzésével kimutattuk, hogy az ARC mag KP-IR neuronjai  $98.1 \pm 1.3\%$ -ban NKB-t (13. A-D ábra), ettől szignifikánsan kevesebb,  $12.5 \pm 1.92\%$ -uk galanint (13. E-H ábra) tartalmaznak. A RP3V KP neuronjai jóval nagyobb arányban expresszálják galanint,  $87.84 \pm 2.65\%$ -uk galanin-IR (13. I-L ábra). *In situ* hibridizáció alkalmazásával szintén detektáltunk KP-galanin koexpressziót mindkét régióban, az ARC magban a KP neuronok  $42.5 \pm 12.52\%$ -ában expresszálódik galanin, a RP3V-ben pedig  $38.67 \pm 11.57\%$ -a galanin pozitív (13. M, N ábra).



	neuropeptid	OVX+olaj (%)	OVX+E2 (%)
KP-IR sejttest az RP3V-ben, melyben termelődik	galanin	—	87.84±2.65
	NKB	—	—
KP-IR sejttest az ARC-ban, melyben termelődik	galanin	12.5±1.92	—
	NKB	98.1±1.3	—
KP-IR appozíciókban jelen van	galanin	5.78±1.57	22.5±2.41
	NKB	2.08±2.08	5.61±2.57

**Táblázat 2** A kisspeptin (KP)-immunreaktív (IR) struktúrák, melyekben galanint vagy neurokinin B-t (NKB) mutattunk ki a rostrális periventrikuláris régióban (RP3V) illetve a nucleus arcuatusban (ARC). A sejttestekben előforduló kolokalizációt a régiónkénti maximális KP expresszió eléréséhez ovariektomizált ösztrogén-kezelt (OVX+E2, n=3) nőstényekben vizsgáltuk, míg ugyanezt az ARC-ban OVX olajjal kezelt (OVX+olaj, n=3) egerekben. A KP-IR varikozitásokban lévő kolokalizációt mindkét állat modellben vizsgáltuk (n=4).

**13. ábra** (Következő oldalon) Kettős immunfluoreszcens jelölés: neurokinin B (NKB) ill. galanin expresszió kisspeptin (KP) immunreaktív (IR) neuronokban kolhicin-kezelt egerek nucleus arcuatusában (ARC) és rostrális periventrikuláris régiójában (RP3V). A KP immunreaktivitás vizualizálásához Alexa594 streptavidint, a NKB-hez és galaninhoz FITC fluorokrómot használtunk. A-D: A fotókon a KP- (A, C, D) és a NKB-IR (B, C, D) neuronok megoszlása látható ovariektomizált (OVX) egér ARC-ban. A kettősen jelölt (sárga) neuronokra a C és D ábrán látunk példát. E-H: A fotókon a KP- (E, G, H) és a galanin-IR (F, G, H) neuronok megoszlása látható ovariektomizált egér ARC-ban. A kettősen jelölt (sárga) neuronokra a G és H ábrán látunk példát. I-L: A fotókon a KP- (I, K, L) és a galanin-IR (J, K, L) neuronok megoszlása látható ovariektomizált ösztrogén kezelt (OVX+E2) egér RP3V-ben. A kettősen jelölt (sárga) neuronokra a K és L ábrán látunk példát. M-N: Kettős *in situ* hibridizációval galanin mRNS-t (sötét háttér mellett fotózott, fehér színben látszó ezüst szemcsék csoportosulása jelzi) mutattunk ki KP-t expresszáló neuronokban (piros immunfluoreszcens jel) az RP3V-ben. A léptéket jelző szakaszok: 50µm (C, G, K) és 20µm (D, H, L, M, N).



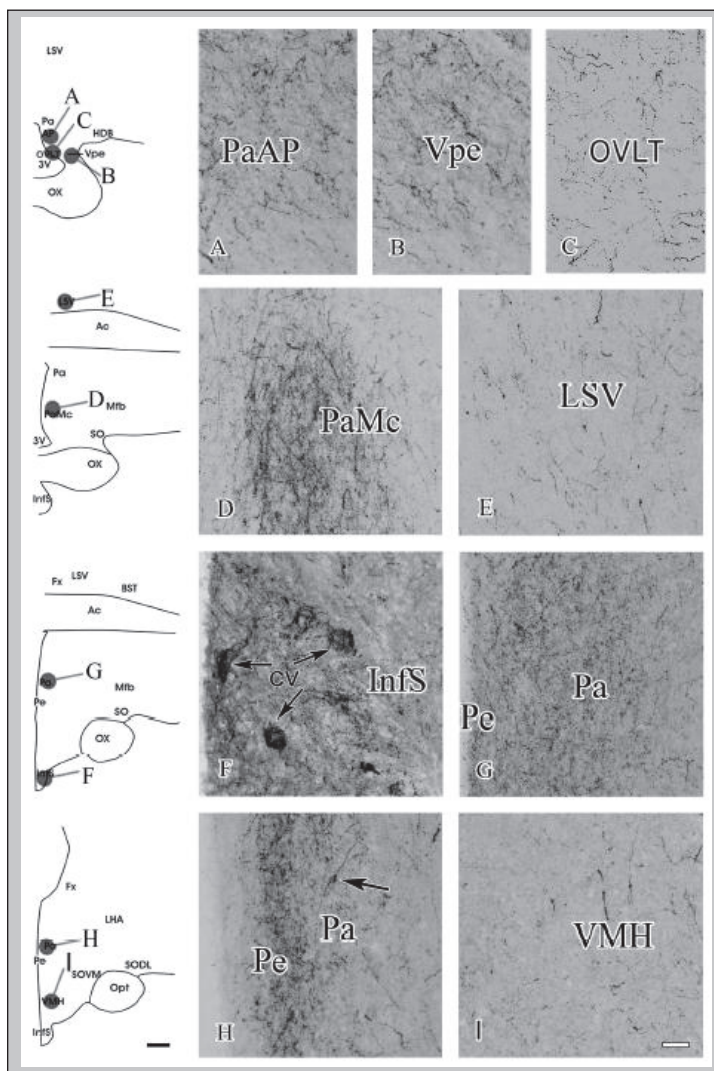


## **5.4. Kisszeptin immunreaktív idegsejtek megoszlása és fenotípusa humán hipotalamuszban**

### **5.4.1 A kisszeptin immunreaktív sejttestek és axonok megoszlása a női agy hipotalamuszában**

Nyúl anti-kisszeptin antitesttel sűrű KP rosthálózatot mutattunk ki a mediális hipotalamuszban (13. és 14. ábra). A fixálásbeli különbség nem befolyásolta a detektált jelet, csak a primer szérum szükséges koncentrációját. A rostok a legnagyobb számban az organum vasculosum laminae terminalis területén (OVL, 14. C ábra), a periventrikuláris mag ventrális részén (Vpe, 14. B), a periventrikuláris magban (Pe, 14. G, H ábra és 15. C, G ábra), anteromediális és anterolaterális preoptikus magban, paraventrikuláris magban (Pa, 14. A, D, G, H ábra és 15. A ábra), az infundibulumban (Inf, 15. E ábra), dorsomediális magban (DMH, 15. C, F ábra), a dorzális hipotalamikus areában (DHA, 15. H ábra) voltak találhatóak.

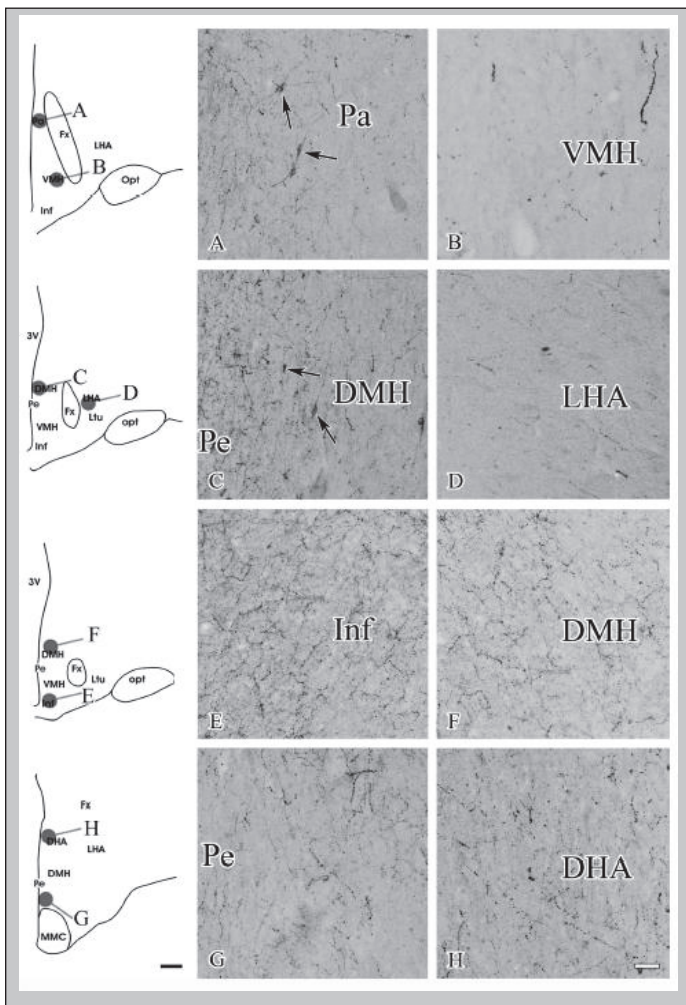
A nyúl antitestek csak kevés KP-IR sejttestet jelöltek (16. A, C ábra), ezzel szemben a juh anti-KP szérummal jelentős számú perikaryont detektáltunk az infundibulumban (16. D ábra), az infundibuláris nyélben (16. C ábra), a periventrikuláris terület rosztrális részén (16. A ábra), a paraventrikuláris mag anterior parvicelluláris (PaAP, 16. A ábra) és magnocelluláris (PaMc, 16. B ábra) részében.





**14. ábra** (előző oldalon) Kisszeptin-immunreaktív rostok rosztrális humán hipotalamikus metszeteken. A KP immunreaktivitást nyúl anti-KP szérummal mutattuk ki egy 27 éves nő acroleinnal fixált hipotalamuszából készített metszeteken. A sematikus ábrákat CorelDraw-val készítettük Nissl-festett metszetek felhasználásával. A szürke körök az A-I panelek fotóival illusztrált régiókat jelölik. Ezzel a primer szérummal elsősorban axonokat detektáltunk, néhány halványan jelölt sejttestet nyilak jelölnek (H). Nagy számú rostot mutattunk ki az organum vasculosum laminae terminalis (OVLT, C) területén, a paraventriculáris magban (Pa, PaMc a magnocelluláris alrégiója és PaAP a parvicelluláris alrégiója, A, D, G, H), a hipotalamusz ventrális periventriculáris magjában (Vpe, B), a PaMc-től laterálisan (D), a ventromediális magban (VMH, I), az infundibuláris nyélben (InfS, F), kapillárisok (CV) körül (F). Extrahipotalamikusan KP-IR rostokat mutattunk ki a laterális szeptális magban (LSV, E). A léptéket jelző szakaszok: 2.5mm a sematikus ábránál, 50µm a fotókon.

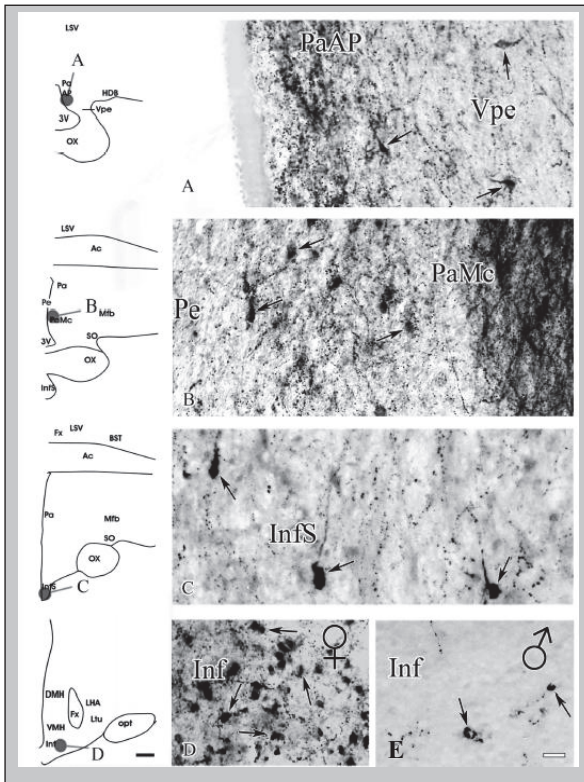
**15. ábra** (következő oldalon) Kisszeptin-immunreaktív rostok kaudális hipotalamikus humán metszeteken. A 12. ábrán mutatott területeken kívül KP-IR rostokat detektáltunk a paraventriculáris magban (Pa, A), dorzomediális magban (DMH, C, F), infundibuláris magban (Inf, E), a dorzális hipotalamikus areaban (DHA, H), ventromediális magban (VMH, B) és a laterális hipotalamikus areaban (LHA, D). A kevés KP-IR sejttestet nyilak mutatják (A, C). A léptéket jelző szakaszok: 2.5mm a sematikus ábránál, 50µm a fotókon.



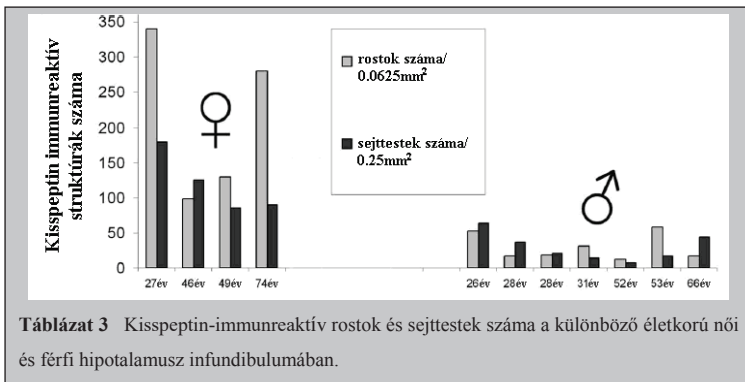
#### 5.4.2 Nemek közti eltérés a kisszeptin immunreaktív struktúrák megoszlásában

Mind a nyúl, mind a juh KP szérummal kevesebb KP-IR rostot mutattunk ki a férfiakból származó metszeteken, mint a nőkből származókon (16. D, E ábra). A  $0.0625\text{mm}^2$ -re eső rostok száma az Inf ( $212.1 \pm 58.2$  nőkben vs.  $29.6 \pm 7.1$  férfiakban,  $p < 0.05$ ) és a Pe ( $114.0 \pm 17.9$  nőkben vs.  $29.0 \pm 7.6$  férfiakban,  $p < 0.05$ ) területén is robusztus nemek közti különbséget mutat (Táblázat 3).

Sejttestek vonatkozásában az egyik szembetűnő különbség, hogy míg a nők rosztális periventrikuláris régiójában (Vpe és PaMc) markáns sejtcsoport látható, férfiaknál ezen régióban nem figyeltünk meg sejttesteket (16. A, B ábra). Ezen kívül férfiak esetében szignifikánsan kevesebb KP perikaryont jelöltünk az Inf-ban, mint nőkben ( $0.25\text{mm}^2$  területegységre eső sejttestek száma:  $49.3 \pm 4.6$  nőkben vs.  $7.7 \pm 7.6$  férfiakban,  $p < 0.05$ , Táblázat 3).

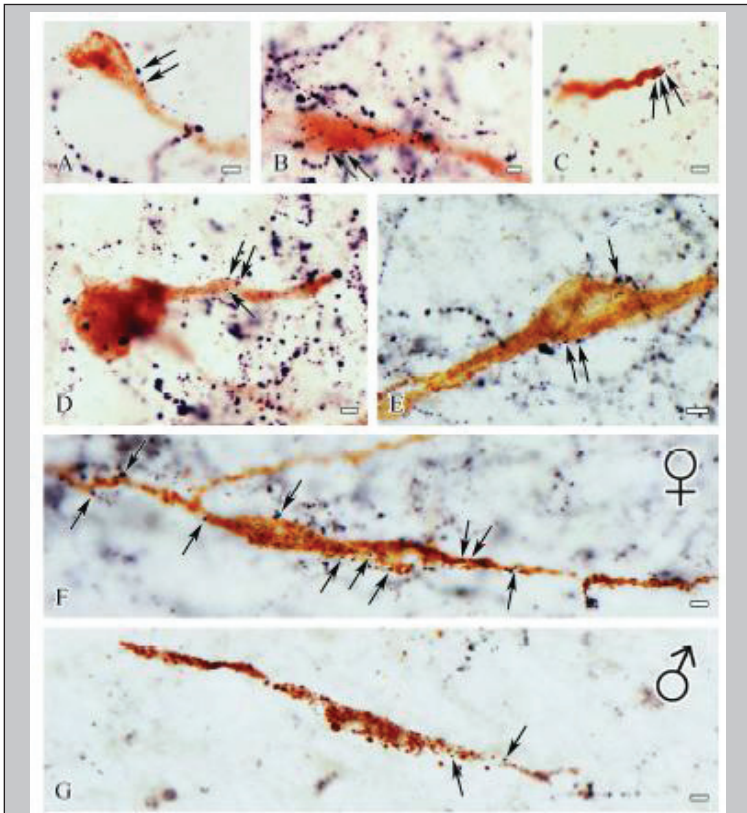


**16. ábra** (előző oldalon) Kisszeptin-immunreaktív sejttestek és rostok humán hipotalamikus metszeteken. Szintén a 27 éves nő hipotalamuszából készített metszeteken a juh anti-KP szérummal a nyúl antiszérumhoz hasonló rost megoszlást, emellett nagyobb számú, nagyobb jel intenzitású sejttesteket mutattunk ki a periventrikuláris mag ventrális részében (Vpe, A), a paraventrikuláris mag anterior parvicelluláris (PaAP, A) és magnocelluláris régiójában (PaMc, B), az infundibuláris magban (Inf, D) és az infundibuláris nyélben (InfS, C). A 31 éves férfi hipotalamuszából származó infundibulumban sokkal kevesebb KP rostot és sejttestet detektáltunk (E). Az A-D panelekben a nyílak a KP-IR perikaryonokra mutatnak. A léptéket jelző szakaszok: 2,5mm a sematikus ábránál, 25 $\mu$ m a fotókon.



### 5.4.3 A kisszeptin rostok GnRH neuronokkal kialakított kontaktusainak jellemzése

Kettős immunhisztokémiai jelöléssel jelentős számú KP-IR appozíciót mutattunk ki a GnRH neuronokon (17. ábra) mind a nyúl, mind a juh KP szérummal. Sejtenként eltérő mennyiségű kontaktust számoltunk a különböző agykból készült metszeteken, a nőkből származó metszeteken  $0.7 \pm 0.5$ , férfiakból származókon  $0.12 \pm 0.05$  kontaktust azonosítottunk. Nőkben a GnRH neuronok  $25.8 \pm 15.0\%$ -án, míg férfiakban e sejtek  $8.3 \pm 3.6\%$ -án találtunk appozíciót.

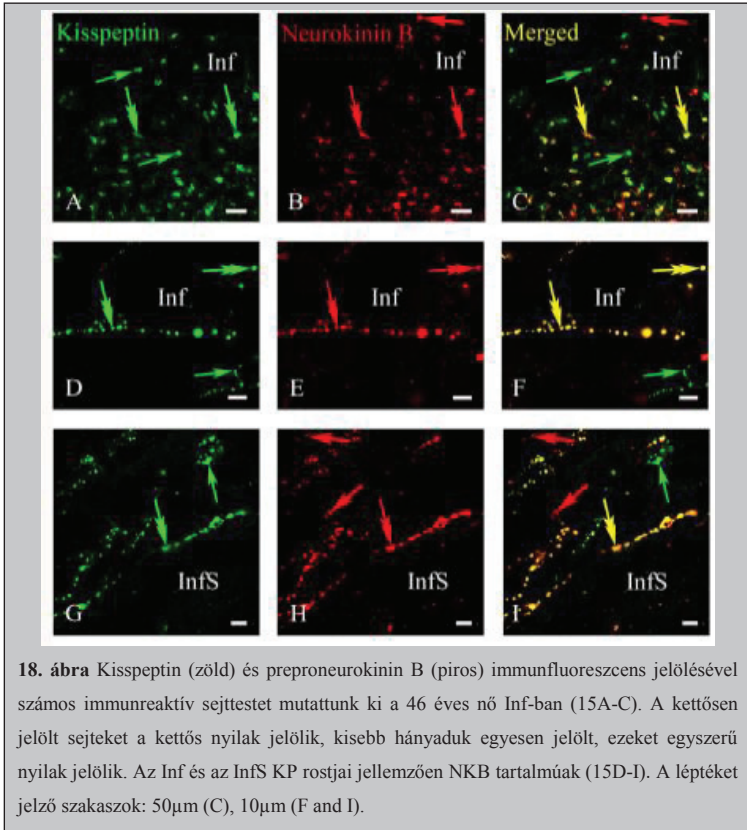


**17. ábra** Kettős immunhisztokémiai jelöléssel kisszeptin-immunreaktív (ezüst-arannyal intenzifikált NiDAB), nyilakkal jelölt appozíciókat mutattunk ki női GnRH neuronok (DAB) perikaryonján (A,B) és dendritjén (C, D) nyúl anti-KP és juh anti-KP szérum használatával egyaránt (E, F). Néhány juxtapozíciót férfi agyból készített metszeteken is kimutattunk (G). A léptéket jelző szakasz: 5 $\mu$ m.

#### 5.4.4 A kisszeptin neuronok preproneurokinin B immunreaktivitása

A juh anti-kisszeptin szérum felhasználásával kimutattuk, hogy az Inf-ban a KP-IR sejtek 77.0 $\pm$ 13.8%-a preproNKB immunreaktivitást is mutat, ugyanakkor a preproNKB sejtek 95 $\pm$ 3.1%-a tartalmaz KP-t. Kettősen jelölt varikozitásokat találtunk az Inf (18. D, F ábra) és az InfS (18. G-I ábra) területén. Az Inf-ban a KP-IR axonok 56.5 $\pm$ 7.8%-ában mutattunk ki preproNKB immunreaktivitást, míg a Pe

régióban szignifikánsan kisebb hányadukban ( $p < 0.05$ ),  $13.6 \pm 7.9\%$ -ukban. Ezzel szemben az LSV KP-IR rostjai prepronKB-re immunnegatívnak bizonyultak ( $< 0.5\%$ ).



## 6. Diskusszió

### 6.1. Ösztrogén protektív szerepe a GnRH neuronokban

Az ösztrogén a reprodukciós rendszerben kifejtett hatásain túl, befolyásolja a kardiovaszkuláris funkciókat (268), a memóriát (269), a csontok anyagcseréjét (270) és az immunrendszer működését (271) is. A sejtek, azon belül is a neuronok védelmében betöltött szerepére is egyre több tanulmány utal (111, 112, 272-275).

A neuronok energia igényét szinte kizárólag a mitokondriumaik ATP termelése fedezi. Különböző stresszorok, mint például neurotrofikus anyagok megvonása, szövetsérülés, excitatórikus aminosavak extracelluláris szintjének növekedése rontják a mitokondriumok működését. Oxidatív stressz esetén a sejtbe áramló  $Ca^{2+}$  megszünteti a mitokondriumok belső membránjának impermeabilitását, a mitokondriális membránpotenciál összeomlik. Ezt a mitokondriumok duzzadása kíséri, mely során belőlük citokrómm c és apaf-1 áramlik a citoplazmába, ahol aztán kaspázokat aktiválnak és sejthalált indukálnak. A mitokondriumok károsodása tehát az ATP szint csökkenését és reaktív oxigéngyökök további emelkedését vonja maga után, melyek az apoptózis és nekrozis fő kiváltó okai. Az ösztrogén sejtvédő hatásainak kutatásában ezért a mitokondriális funkciók vizsgálata kiemelt szerepet játszik (276).

Az ösztrogén az oxidatív foszforiláció növelésével és az ATPáz aktivitás csökkentésével igyekszik megőrizni a sejt ATP szintjét (277), növeli az antiapoptotikus fehérjék expresszióját, melyek a mitokondrium membránpotenciáljának stabilizálásához is hozzájárulnak (278, 279), és megnöveli a glutation sejten belüli mennyiségét (280). Számos kísérlet bizonyítja, hogy az ösztrogén sejtvédő hatásait ER-ok közvetítik. Hippokampális immortalizált sejteken kimutatták, hogy az ösztrogén ER $\alpha$  és ER $\beta$  közvetítésével nagymértékben csökkenti a sejtek magas koncentrációjú glutamát kezelésre bekövetkező pusztulását (111, 281). Ischemia esetén az ösztrogén ER $\alpha$  közvetítésével jelentősen csökkenti a nekrotizált agyterület mértékét (282), ER $\beta$  hiányában pedig az egerek számos agyi régiójára morfológiai abnormalitás jellemző (283). Humán neuroblasztóma sejteken végzett vizsgálatok szerint az ösztrogén ER-okon keresztül növeli meg a detoxifikációs és a sejtek túlélését segítő gének expresszióját (275), hippocampális sejtvonalon pedig csökkenti a kainsav okozta sejtpusztulást, (272).

Az ösztrogén sejtvédő hatásának egyik célpontja a GnRH neuronokban is a mitokondrium lehet. Ezt támasztja alá az immortalizált GnRH neuronokon végzett vizsgálataink eredménye is, mi szerint 24 órás ösztrogénexpozíció megakadályozza az oxidatív stressz hatására bekövetkező mitokondriális membránpotenciál csökkenést. Az alkalmazott alacsony ösztrogén koncentráció (10pM) miatt arra gondolunk, hogy nem az alkalmazott 17 $\beta$ -ösztrodin, illetve szelektív ER $\alpha$  illetve ER $\beta$  antagonisták önálló antioxidáns hatásáról, hanem ösztrogén receptorok közvetítésével létrejövő folyamatról van szó. Bár az ösztrogén fenolos A gyűrűjének C3-as pozíciójában lévő hidroxil csoport antioxidáns hatással bír (71, 284, 285), ahhoz, hogy ez érvényesülni tudjon az ösztrogén molekulának kellően magas (mikromoláris) koncentrációban kell jelen lenni. Azokban a oxidatív stressz modellekben, amelyekben igazolták az ösztrogén neuroprotektív hatását (66) (286-290) (291), arra a következtetésre jutottak, hogy az ösztrogén a hatását a fiziológiásnak mondható (nanomoláris vagy annál alacsonyabb) koncentrációban elsősorban ER-ok révén fejt ki (69, 282). Így a mi vizsgálati körülményeink is azt feltételezik, hogy a GT1-7 sejtek mitokondriumaira gyakorolt hatás közvetítésében ER-ok vesznek részt. Mégpedig nagy valószínűséggel mindkét altípus, mivel a szelektív ER $\alpha$  (PPT) és ER $\beta$  (DPN) agonisták ugyanolyan mértékű védelmet biztosítottak a sejteinknek, mint a 17 $\beta$ -ösztrodin. Eredményeinkből arra is következtettünk, hogy a kétféle ER altípus hasonló módon és mértékben járul hozzá a GT1-7 sejtek oxidatív stressz elleni védelmében. Nem zárható ki azonban az sem, hogy az ösztrogén, valamint az alkalmazott szelektív agonisták ER-októl függetlenül, más fehérjén keresztül is kifejtik a hatásukat (292-294). Ismert például, hogy az ubiquiter mitokondriális F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase is ösztrogén-szerkezetű molekulák célfehérjéje, azonban e fehérjében csak farmakológiai dózisok váltanak ki számottevő hatást (295). Az ER közvetítésével az ER agonisták transzkripciós változásokat idézhetnek elő, mely kiindulhat a magi és a mitokondriális genomból egyaránt. A 24 órás kezelési protokollunk lehetővé tette, hogy fehérje-fehérje interakciók mellett genomikus változások is kialakulhassanak az oxidatív stressz elleni védelemben. Hasonlóan azon hőrösög vesesejtjein végzett vizsgálatokhoz, amelyekben kimutatták, hogy az ösztrogén megnöveli a mitokondriumokban a citokrom oxidázok és az ATP szintáz egyik alegységének transzkripcióját (296), illetve olyan gének transzkripcióját az ERE szakaszokon keresztül (297-300), melyek hozzájárulhatnak a mitokondrium stabilitásához.



Munkacsoportunk kimutatta, hogy GT1-7 sejtekben hasonló transzkripció-s változások következtek be 24 órás ösztrogén-kezelés hatására (80).

A mitokondriális genom transzkripciójának befolyásolásához az ER-oknak a mitokondriumba kell jutniuk és a mátrixban lévő mtDNS-hez kell kapcsolódnuk. A mitokondriumban lokalizálható ER-ok nemcsak a GT1-7 sejtek tulajdonsága, hanem számos más perifériás szerv, vagy központi idegrendszeri sejtípus tulajdonsága. Így például az emlődaganatból származó MCF7 sejtvonalon expresszáldó ER $\beta$  génben a mitokondriumba irányító szekvencia mutatható ki, ami azonban az ER $\alpha$  génből hiányzik (301). Ennek ellenére mindkét receptor altípus detektálható volt az MCF7 sejtek mitokondriumban, sőt ösztrogén kezelés koncentráció- és időarányosan megnövelte a mitokondriális ER $\alpha$  és ER $\beta$  sejten belüli hányadát.

Az ösztrogén mitokondriális hatásokon kívül képes a magi genomban kódolt neurotrofikus és neuroprotektív fehérjék expressziójára is hatni (302-306), és aktiválni olyan szignalizációs útvonalakat, melyek a neuroprotektiót segítik (307-310).

Reprodukció csak a szervezet optimális működése esetén lehet sikeres, melyhez a GnRH neuronok fokozott védelme is hozzátartozik, az olyan - általában átmenetileg ható - stressz faktorokkal szemben, mint például hosszabb ideig tartó éhezés vagy különböző fertőzések állapotok. GT1-7 sejtek vizsgálatával nyert eredményeink azt jelzik, hogy az ösztrogén *in vivo* is hozzájárulhat a GnRH neuronok működésének stabilizálásához.

Kísérleteinkből elsősorban arra kaphattunk választ, hogy az ösztrogén milyen direkt hatással van a GnRH neuronok mitokondriális membrán potenciáljára oxidatív stressz esetén. Az ösztrogén *in vivo* körülmények között indirekt módon (pl. gliasejtek, immunsejtek szignálmolekuláin keresztül) is kifejezheti védő hatását a GnRH neuronokon, melynek megértése további vizsgálatokat igényel.

## **6.2. Az ösztrogén és a cirkadián szignál konvergenciája a GnRH neuronokat beidegző kisszeptin sejtekben**

Rágcsálókban a cirkadián jel elengedhetetlen az LH surge létrejöttéhez és időzítéséhez. A SCN neuronális kapcsolattrendszere szükséges az információ GnRH neuronok felé történő továbbításához (181) (311-313) (183), melyben az eddigi adatok szerint a mag VP- és/vagy VIP-IR efferensei vesznek részt (311) (202). Mások és saját vizsgálataink arra utalnak, hogy a circadian jel egérben főleg indirekt módon, az RP3V régió kisszeptin sejtjeinek részvételével továbbítódik a GnRH neuronokhoz.

Pályajelölési, konfokális és ultrastrukturális többes immuncitokémiai jelöléses vizsgálataink a SCN-ből vazopresszinerg, monoszintaptikus kapcsolatot tárt fel a RP3V KP neuronjaival (10B, C ábra), valamint e sejtek szinaptikus kapcsolatát mutatta ki a GnRH neuronokkal. Mivel a szuprakiazmatikus VP-IR neuronoknak csak egy töredéke veszi (11. ábra) fel és továbbítja a PHA-L-t, ezért az egyes állapotmodellekre jellemző KP neuronok és VP afferensek közötti innervációs mintázat kvantifikálásra más megközelítést választottunk. *In situ* hibridizációs és immunhisztokémiai irodalmi adatok szerint a szuprakiazmatikus VP neuronokban mérhető galanin expresszió vagy immunreaktivitás nincsen, (194, 314-316), ellentétben a magnocelluláris VP sejtekkel, vagy BNST-ben lévő parvicelluláris VP sejtekkel. Továbbá a RP3V, a kisspeptin sejteket tartalmazó régió vazopresszin-IR rostjai elsősorban a SCN-ből erednek (194). A KP/VP/galanin hármas immunfluoreszcens jelölés után konfokális elemzéssel megszámoltuk a KP neuronokon lévő VP-IR appozíciókat. Kimutattuk, hogy ezen appozíciók közel 100%-a galanin-immunnegatív. Az OVX nőstényekben a KP neuronok egyharmadánál találtunk juxtapozícióban galanin-immunnegatív VP-IR varikozitást. Ezt az arányt az ösztrogén-kezelés szignifikánsan megnövelte hasonlóan ahhoz a számadathoz, hogy átlagosan hány VP-IR bouton található a KP-IR sejteken. Ahhoz, hogy ezt a jelenséget a VP és KP sejtek közötti kapcsolat ösztrogén-indukálta plaszticitásaként értelmezzük, meg kellett vizsgálnunk, hogy az élettani változások mellett a számoláskor figyelembe nem vett faktorok nem befolyásolták-e mérési eredményeinket. Ismert ugyanis, hogy ösztrogén kezelés hatására az RP3V-ben nem csak a KP-t expresszáló sejtek száma, hanem az egyes sejteken belüli KISS-1 mRNS mennyisége is megnő (224), ami alapján feltételezhető, hogy a KP-immunreaktivitást mutató peptidok szintje is megnő. A sejtben lévő immunreaktív anyagok nagyobb mennyisége elérheti a detektálási limitet nemcsak az egyes sejtek szintjén (megnövelve a detektált sejtek számát), hanem subcelluláris kompartmentekben is (megnövelve a sejtek detektált volumenét), aminek következtében olyan meglévő intercelluláris kapcsolatok is láthatóvá válnak, amelyek az ösztrogén-kezelést megelőzően a detektálási limit alá estek.

Megvizsgáltuk tehát, hogy van-e különbség a KP neuronok detektált térfogatában az OVX és az OVX+E2 csoport között. Image J software-rel végzett térfogat analízissel kimutattuk, hogy a KP sejttestek térfogata az OVX+E2 egerekben  $937.39 \pm 62.96 \mu\text{m}^3$  szignifikánsan nem tér el az olajjal kezelt OVX csoportéhoz képest

( $906.26 \pm 52.47 \mu\text{m}^3$ ,  $p=0.7$ ). Mivel a KP sejtek detektálható mérete nem befolyásolta a számolás eredményét, ezért feltételezzük, hogy a VP immunreaktív afferensek száma nőtt meg a kezelés hatására. További vizsgálatot igényel annak kiderítése, hogy ennek háttérben VP tartalmú neuroszekretoros granulumok fokozott transzportja és megjelenése felelős a KP-IR sejtek kezelésig VP immunnegatív afferenseiben vagy pedig VP immunreaktív rostok illetve KP sejtek közötti szinapszis-újdonképződésről van-e szó.

Sem a VP-IR appozícióval rendelkező KP neuronok százalékos aránya, sem a KP neuronokra eső átlagos bouton szám nem mutatott nemek közti különbséget. Mivel a GnRH neuronok mintegy 10%-a hímegekben is fogad KP-IR terminálisokat (226), a VP-IR varikozitások a KP perikarionok beidegzése révén hozzájárulhatnak a GnRH expresszió hímegekben is megfigyelhető diurnális szabályozásához (177).

Az RP3V régióban megfigyelt gazdag VP-IR rosthálózattal szemben VIP-IR rostok ebben a régióban csak kis számban fordulnak elő (194), és megfigyeléseink alapján csak nagyon ritkán képeznek appozíciót KP neuronokon. Viszont a RP3V-ben, egérben és patkányban is (212) (317) jelentős 2-es típusú VIP receptor (VPAC2) expresszió mutatott ki munkacsoportunk. A kódolt receptorfehérje VIP-et és hipofízis adenilát cikláz-aktiváló fehérjét (PACAP) is képes kötni és tekintetbe véve, hogy a PACAP-IR rostok nagy mennyiségben fordulnak elő ezen a területen (318), az valószínűsíthető, hogy az itt található VPAC2 receptorok fő ligandja nem VIP, hanem elsősorban PACAP. A hipotézisünket, mely szerint a KP neuronok ösztrogéntől függő módon cirkadián szabályozás alatt állnak, alátámasztja az az irodalmi adat, mely szerint ösztrogén-kezelt egerekben az RP3V-ben a KP neuronok száma ill. a KP neuronok c-fos expressziója cirkadián ritmust mutat, és mindkettő maximuma egybeesik az LH surge idejével (319). Ezek az adatok arra utalnak, hogy az ösztrogén megengedőleg hat a SCN belül és a megnövekedett VP tartalmú output-on keresztül lehetővé teszi a KP neuronok cirkadián szabályozását. Az ösztrogén-függő VP inputra vonatkozó eredményeink kiegészítik Kurunczi és munkatársai elektron mikroszkópos vizsgálatait, melyekkel az axoszomatikus szinapszisok számának növekedését mutatták ki ösztrogén-kezelt patkány AVPV régiójában (320). Eredményeiket úgy interpretálták, hogy ösztrogén hatására új axon-sarjak keletkeznek az AVPV régióban, hasonlóan ahhoz, ahogy ezek az agytörzsben is kialakulnak (321). Felvetjük annak lehetőségét is, hogy esetleg a glia borítás visszahúzódása exponál olyan felületeket a KP sejteken, amin a közelben lévő VP terminálisok szinapszisokat hoznak létre. Az

ösztrogén direkt hatása érvényesülhet a VP terminálisok forrás területén, a SCN-ban is, ahol korábban kis számú ER $\beta$ -VP kolokalizációt mutattunk ki (322). Munkacsoportunk egy korábbi eredményéből kiindulva megjegyzendő, hogy az ösztrogénnek további hatásai posztzinaptikusan is jelentkezhetnek, megnövelve a V1a receptor mRNS szintet a patkány AVPV-ben (211).

Eredményeink morfológiai bizonyítéku szolgálnak arra vonatkozóan, hogy az egér KP neuronok a RP3V területén cirkadián információt kapnak a SCN-ból vazopressziner monoszínaptikus úton. Az ösztrogén VP appozíciók számát növelő hatása arra enged következtetni, hogy ez a szteroid szabályozza a KP neuronokon érvényesülő vazopressziner input intenzitását.

### **6.3. Kisszeptin és GnRH neuronok közötti interakció morfológiai alapjai**

Bár a GnRH neuronok önmagukban is képesek érzékelni az ösztrogén-szint változásait, az ösztrogén GnRH szekréciót befolyásoló negatív és pozitív visszacsatolását más, a RP3V-ben és az ARC-ban elhelyezkedő ösztrogén érzékeny idegsejtek közvetítik. A közvetítő idegsejtek egyik fontos populációját a KP neuronok alkotják, melyek a GnRH szekréció epizodikus és surge jellegének kialakításában egyaránt kulcsszerepet játszanak. A GnRH neuronok egérben, patkányban is heterogén populációt képeznek és elszórtan helyezkednek el a preoptikus területen. Transzgenikus egerek vizsgálatával nagyjából 70%-ban mutattak ki GPR54 mRNS-t továbbá, bizonyították, hogy a sejtek ezen pozitívítása nincs összefüggésben a preoptikus régió belüli elhelyezkedésükkel (229). Ezzel konzisztens az az elektrofiziológiai eredmény, mely szerint KP-nel való kezelésre a GnRH neuronok 61%-a válaszolt tüzelési aktivitás növekedésével (230), a reagáló GnRH neuronok elhelyezkedése viszont a rostrális preoptikus területre korlátozódott, oda, ahol a GnRH neuronokban a KP *c-fos* aktivációt is okoz. Ezzel szemben a mediális szeptum GnRH neuronjainak elenyésző hányadában indukálódik a *c-fos* KP hatására (147). Az aktivált GnRH neuronok és azok a GnRH sejttestek, melyeken KP kontaktusok figyelhetők meg, elhelyezkedésükben nagyon hasonlóak (226, 323), elsősorban a rostrális preoptikus területen vannak jelen.

Az ARC és a RP3V KP neuronjai ugyancsak heterogén, funkcionálisan egymástól különböző alcsoportokra bontható populációt alkotnak. Ezt alátámasztja az az eredményünk is, mely szerint az RP3V KP neuronjainak mintegy 30-50%-a VP-IR inputot kap, mely feltételezhetően a szuprakiazmatikus magból szállítja a cirkadián

információt (324). Ezt a hipotézist látszik alátámasztani egy hörcsög-kísérletből származó adat, mely szerint a RP3V KP neuronjai V1a receptort expresszálnak és 40%-uk *c-fos* expresszióval válaszol a centrális VP-kezelésre. (325). Ennek némileg ellentmond, hogy egerekben ugyanezen KP populáció mindössze 6%-a reagált VP-re (326). A GnRH neuronokat innerváló KP sejtek heterogenitását bizonyítja az is, mi szerint a köztük lévő szinapszisok különböző morfológiai kategóriákba sorolhatóak, vagyis egyes KP-IR inputokban GABA, másokban glutamát a kotranszmitter. Ezt kiegészítvén az általunk detektált aszimmetrikus szinapszis atípusos GABAerg terminálshoz is tartozhat, melyre a hipotalamuszban már mutattak példát (327, 328). Nem mellékes, hogy a RP3V és az ARC KP neuronjainak egy része kettős fenotípusú, azaz GABA-t és glutamátot egyaránt tartalmaznak, ezek terminálisainak szinaptikus morfológiája atípusos lehet.

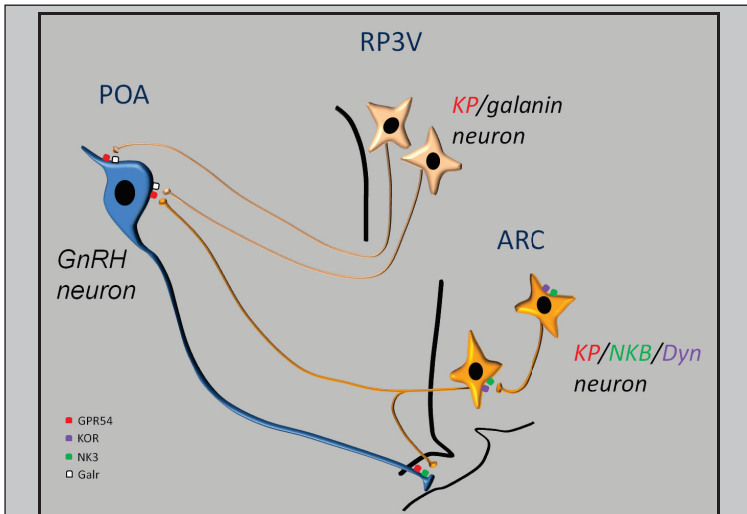
Egy másik aspektusa a KP neuronok heterogenitásának, hogy alpopulációik különböző neuromodulátorokat, mint pl. galanint, NKB-t, termelnek. Számos fajban találtakhoz hasonlóan (3, 234, 329, 330), egérben mi is jelentős KP-NKB kolokalizációt mutattunk ki az ARC-ban. A GnRH neuronok KP afferenseinek egy kis részében szintén NKB immunreaktivitást mutattunk ki, ami alapján feltételezhető, hogy a KP inputok egy része az ARC-ból származik. Ezt anterograd pályajelölési vizsgálatok is alátámasztják, amelyek egér rostrális preoptikus területén ARC-ból eredő KP-IR rostokat mutattak (331). Patkány rostrális preoptikus areában ugyancsak kimutattak ARC-eredetű, NKB-IR rostokat (332, 333). Az ARC magban KP-galanin kolokalizációt is találtunk, eredményeink szerint a KP neuronok mintegy egytizede termeli. További vizsgálatok szükségesek annak megállapítására, hogy a galanin NKB-vel együtt expresszálódik-e az ARC KP neuronjaiban, különös tekintettel azokra a NKB-KP sejtekre, amelyek résztvesznek a GnRH sejtek beidegzésében. Az eredményeink szerint az RP3R KP neuronjainak csaknem mindegyike galanin-IR és több, mint harmadukban galanin mRNS-t is ki tudunk mutatni. A KP-IR terminálisoknak viszont csak ötödében mutatott galanin immunreaktivitást, ösztrogén hiányában ez az arány még kisebb volt. Ezekből az adatokból következik, hogy a magasabb szérum ösztrogén szint a galanin termelődését stimulálja és fokozhatja annak felszabadulását a GnRH sejtek közvetlen szomszédságában. Figyelembe véve, hogy perikariális szinten az RP3V KP neuronjainak szinte mindegyikében kimutatható a galanin, a szintézis, transzport és/vagy felszabadulás mértékében lévő különbségek magyarázhatják az eltérő

kolokaizációs mértéket a perikarionok és az axonok közt. Az sem zárható ki, hogy adott fiziológiai körülmények közt a felszabadulás illetve a neuropeptidet tartalmazó vezikulák utánpótlása másképp regulálódik az axonális, mint a szomatodenditikus kompartmentben lévő részében az idegsejteknek (334). Ennek lehetőségét veti fel azok az elektron mikroszkópos megfigyeléseink is, hogy nagy számban vannak dense core vezikulák a KP-IR sejtek szomatodenditikus részében és a sejtmembránban omega profilok utalnak az ürítés tényére. Annak megállapítása, hogy a KP a galaninnal és/vagy NKB-vel azonos vezikulákból szabadul-e fel, hasonlóan a GnRH-galaninhoz (335), vagy egymástól elkülönülve szállítódnak és csomagolódnak az idegsejteken belül, további elemzéseket igényel. Fontos megjegyezni azt is, hogy a GnRH neuronok axonja is fontos célterülete lehet a KP neuronokból felszabaduló neuropeptideknek. Erre utal, hogy a hipotalamusz mediobazális része, mely egerekben elvéve és patkányokban pedig egyáltalán nem tartalmaz GnRH sejtesteket, KP kezelésre GnRH felszabadulással válaszol (336). Számos fajban mutattak már ki kontaktusokat KP és GnRH axonok közt az eminentia medianában (337-339), így valószínűsíthető a köztük lévő kommunikáció lehetősége.

A perikarionokban lévő kolokalizációk vizsgálatához olyan állatmodelleket használtunk, melyekben a hormonális háttér az adott régióban a KP szintjét maximalizálja. Ennek ellenére a kolokalizáció arányát esetenként alulbecsülhették, lévén, hogy más neuropeptidek expressziójának nem feltétlenül a választott hormonális háttér volt a legoptimálisabb. Ezen kívül a gonadális hormonok mellett a koexpresszálódó neuropeptidek detektálhatóságát számos egyéb faktor, körülmény is befolyásolhatta, így például a cirkadián idő, szociális környezet is jelentős hatással lehet a mérési eredményekre. Az eredmények értékelésekor természetesen az alkalmazott technikák korlátait is figyelembe kellett venni. Az egyes neuropeptidek fiziológiai szintjét túl is becsülhettük, mivel a kolchicin például képes megnövelni bizonyos gének transzkripcióját (340).

Morfológiai adataink hozzájárulnak azon modell kiszélesítéséhez, mely változja a KP GnRH neuronokra kifejtett hatását (19. ábra). A modell az eddigi irodalmi adatok alapján feltételezi, hogy az ARC mag KP neuronjai elsősorban az eminentia mediana területén fejtik ki hatásukat a GnRH szekrécióra, mégpedig nem önmagukban, hanem más, szintén az ARC-ban termelődő neuropeptidekkel együttműködve. Eszerint a KP/NKB/Dyn sejtek autoszinaptikus inputot kapnak a NKB/NK3 és a Dyn/KOR útvonalakon keresztül, és a GPR54-et és NK3-t expresszáló

GnRH terminálisokra vetülnek. Alacsony ösztrogén szint mellett ezen idegsejtek aktivitása magas, mely tovább nő a NKB/NK3 szignalizáción keresztül, és a kollaterálisokon keresztül átkerül a többi sejtre, ezzel szinkronizálva a KP/NKB/Dyn populáció működését. Kis fáziskéséssel megnő a Dyn felszabadulás, mely viszont csökkenti a KP/NKB/Dyn sejtek aktivitását. Ennek következtében csökken a Dyn felszabadulás, felszabadulnak a gátló hatása alól a sejtek, és újabb ciklus veszi kezdetét. Ilyen módon a KP és a NKB pulzusokban szabadul fel a GnRH terminálisok közelében, a KP GnRH szekréciót eredményez, melyet a terminálisokban a NKB/NK3 jelítvitel fékez, ezáltal pulzatilissá téve azt. Magas ösztrogén szint mellett megnő a RP3V-ből a GnRH sejtestekre érkező KP/galanin input, ami a GPR54 és galanin receptorokon (236, 341) hatva, elősegíti a GnRH neuronok hosszabb aktiválásával a GnRH surge kialakulását. A GnRH sejtesteken kimutatott KP-NKB kettősen-jelölt appozíciók arra utalnak, hogy az ARC eredetű KP sejtek nem csak a GnRH terminálisonok, hanem a GnRH sejtesteken is kifejthetik hatásukat. Ennek jelentősége további vizsgálatokat igényel.



**19. ábra** Az irodalmi adatok alapján felállított modell (1) a saját eredményeink beépítésével sematikusan ábrázolja az RP3V-ban illetve az ARC magban elhelyezkedő KP populációk lehetséges szerepét a GnRH surge és a pulztilis GnRH szekréció szabályozásában. A KP/NKB/Dyn neuronok csoportja egy autoregulációs mechanizmuson keresztül szabályozza a GnRH pulztilis szekrécióját a GnRH terminálisokra hatva (3, 4). Alacsony ösztrogén szint mellett ezen idegsejtek aktivitása magas, ekkor a NKB/NK3 útvonal növeli a KP felszabadulását az ARC magból, a Dyn/KOR útvonal pedig csökkenti, így a KP pulztilis módon képes stimulálni a GnRH szekréciót. Ezzel szemben a magas ösztrogén szint mellett megnő a GnRH sejtestekre az RP3V-ből érkező KP/galanin input, mely a GnRH neuronok hosszabb aktiválásával GnRH surge-öt eredményez. Eredményeink arra utalnak, hogy az ARC eredetű KP sejtek nem csak a GnRH terminálistonok, hanem a GnRH sejtesteken is kifejthetik hatásukat. Ennek jelentősége további vizsgálatokat igényel.

#### **6.4. A humán kisszeptin rendszer a laboratóriumi állatokból nyert vizsgálati eredmények tükrében**

Rágcsálókhoz hasonlóan emberben is hipogonadotróp hipogonadizmust okoz a GPR54 gén funkcióvesztéses mutációja (217, 342, 343), míg a funkciónyeréses mutáció korai pubertást eredményez (219). Tekintettel a KP/GPR54 szignalizáció humán reprodukcióban betöltött meghatározó szerepére, morfológiai vizsgálatainkban feltérképeztük a KP rendszert és a GnRH neuronokkal kialakított kapcsolatát.



Térképezési vizsgálatainkban kétféle KP antitestet használtunk: a korábban karakterizált nyúl anti-egér (226, 263, 344) és a juh anti-humán szérumot (337, 345). A két különböző antiszérummal megegyező KP-IR rost-megoszlást kaptunk, ami a humán szöveten történt KP-jelölésünk specifikusságát igazolja. Hasonlóan a majom hipotalamuszból származó immunhisztokémiai eredményekhez (337), azonban juh szérummal emberi agyban is több intenzíven jelölt KP sejttestet tettünk láthatóvá. A két antitesttel kapott eltérő immunjel magyarázata lehet, hogy a juh szérum előállítására használt hosszabb peptid szakaszon több epitop van, mint a nyúl szérum előállítására használtban, és így a juh szérum felismerhet a perikaryonban vagy annak közelében nagyobb mennyiségben jelenlevő éretlen KP prekursor peptideket is. A nyúl anti-KP szérum egér KP-10 ellen termeltetett, és bár az egér és a humán peptid szakasz 90%-ban megegyezik (YNWNSFGLRY vs. YNWNSFGLRF), radioimmúnassay vizsgálatok mégis csak 1%-os keresztreakciót mutattak ki a humán KP-10 peptid szakasszal (263). Feltehetően az epitóp fixált szövetben való megőrzöttségének köszönhetően, ennek ellenére az antiszérum jól működött az immuncitokémiai detektálás során.

Az emberi agyban a KP-IR rostok periventrikulárisan a mediobazális hipotalamusz teljes rostro-kaudális kiterjedésében megfigyelhetők. Rostban leggazdagabb terület a Vpe, Pe, PaMc, PaAP, anteromedialis és anterolaterális preoptikus mag, Inf, InfS, DMN, DHA. A nyúlványok kiterjedt megoszlása a KP sokrétű, a GnRH neuronok szabályozásán kívüli, funkciójára enged következtetni. Az InfS területén a kapillárisokat - a GnRH neuronok és egyéb parvicelluláris neuroszekretoros rendszerek axonjaihoz hasonlóan - nagyszámú KP rost veszi körül mely alapján feltételezhetjük a portális kapillárisokba történő KP szekréciót, melynek alacsony szintjét juhokban ki is mutatták (346). Agonadális hím rhesus majmokban a KP axonok az InfS területén appozíciókat is képeznek a GnRH rostokkal (337), mely axo-axonális kommunikációt is feltételez. Hasonló axo-axonális kontaktusokat mi is ki tudtunk mutatni a humán InfS területén.

KP-IR sejttestek legnagyobb csoportját az InfS proximális részében és az Inf-ban találtuk, ami megegyezik a posztmenopauzális korú női Inf-ban detektált KP mRNS (347) és az agonadális rhesus majom nucleus arcuatus-ában kimutatott KP-IR neuronok megoszlásával (337). További KP neuron csoportot találtunk női hipotalamuszban a Vpe és a PaMc területén is. Bár rosztálisan KP neuronokat leírtak juhokban (339) és rácsálóokban (348) is, ebben a régióban sem a humán *in situ*

hibridizációs (347), sem a majom immuncitokémiai illetve *in situ* hibridizációs vizsgálatok (337) eddig nem tudtak KP-sejteket kimutatni, kivéve azt a néhány elszórt, halvány sejttestet, amit Rometo és mtsai találtak a humán mediális preoptikus régióban (347). Az általunk leírt rosztális populáció homológ lehet a rágsálók RP3V területén elhelyezkedő KP neuronok csoportjával, mely nagy valószínűséggel az ösztrogén pozitív visszacsatolásának közvetítésében vesz részt (141). Ezt a rosztális csoportot férfiak hipotalamuszában nem detektáltuk. Ezen neuronok további morfológiai és funkcionális – mely elsősorban egyéb főemlősök vizsgálatának bevonásával történhet – jellemzése még várat magára.

Egerekben és patkányokban a KP rendszer nemek közti különbsége többek közt abban nyilvánul meg, hogy nőstények RP3V területén körülbelül tízszer annyi KP neuron mutatható ki, mint hímekben (226, 349). Az általunk csak női agyban talált rosztális KP populáció mutatja, hogy hasonló nemek közti különbség van emberben is. Meg kell jegyezni azonban, hogy míg rágsálókban az RP3V-t az ösztrogén pozitív visszacsatolásával hozzák összefüggésbe, főemlősökben mind a negatív, mind a pozitív visszacsatolásban az ARC/Inf területének tulajdonítanak kizárólagos szerepet (33), így a humán rosztális KP neuronok funkciójának felderítése további vizsgálatokat igényel.

Az Inf-ban azonosított KP neuronok száma is nemek közti különbséget mutat, nőkben körülbelül hétszer több sejt található, mint férfiakban. Hasonló különbséget találtak juhok ARC-ban is (350).

A legfeltűnőbb nemek közti különbséget a KP-IR rostok denzitása mutatta a mediobazális hipotalamuszban, hétszer több rost figyelhető meg a női Inf-ban és négyszer több a női Pe-ben, mint a férfiak hasonló agyi régióiban.

A KP rendszer nemek közti különbsége patkányokban bizonyítottan a perinatális korban, hímekben fellépő tesztoszteron surge-nek köszönhető (349). Ez felhívja a figyelmet a KP rendszer környezeti ártalmakkal szembeni sérülékenységre, melyek ebben a kritikus korban érhetik az endokrin rendszert (351).

A KP-IR appozíciók, melyeket GnRH sejttesteken és dendriteken mutattunk ki, axo-szomatikus és axo-dendritikus kommunikációra utalnak. Hasonló kontaktusokat mutattak ki rágsálókban (223, 226). Felnőtt hím egerekben a GnRH neuronok 10%-a, nőstényekben 40%-a fogad KP appozíciót (223, 226). Az ebből adódó feltételezést, mely szerint a KP a GnRH neuronok sejttesteken illetve dendriteken fejti ki hatását, funkcionális vizsgálatok is alátámasztják. Agyszeletben

kimutatták a KP direkt depolarizáló hatását egér GnRH neuronokon (227, 230, 235). Hasonló axo-szomatikus és axo-dendritikus kontaktusokat írtak le agonadális rhesus majomban, a GnRH neuronok 25-50%-án mutattak ki KP appozíciót, átlagosan 0.3-0.5 bouton/sejttest-et figyeltek meg (337). Vizsgálatainkban a női GnRH neuronok  $25.8 \pm 15.0\%$ -án, a férfiak neuronjainak  $8.3 \pm 3.6\%$ -án találtunk KP-IR axonvarikozitásokat, a nőkben átlagosan  $0.7 \pm 0.5$ , férfiakban  $0.12 \pm 0.05$  bouton/sejttestet számoltunk. Nőstény juhok analízise is azt mutatta, hogy mind az innervált GnRH neuronok arányában, mind a sejtenkénti kontaktusok számában nagymértékű, a párzási időszaktól és agyi régiótól függő ingadozás van (352). Minden eddig vizsgált fajra jellemző, hogy nem minden GnRH neuronnal létesítenek kontaktust a KP rostok, illetve, hogy a kontaktusok előfordulása is viszonylag ritka (0.1-3.5 bouton/GnRH neuron) (337, 352).

Axo-axonális kontaktusokat is találtunk a GnRH és a KP rostok közt az InfS-ben, hasonlóan az agonadális rhesus majom eminentia medianában leírtakkal (337). Ez alapján feltételezhető, hogy a KP a GnRH szekréciót az InfS-ben is szabályozza. Ezt az elképzelést alátámasztja, hogy rágcsálókban perifériásan beadott KP is kiváltja az LH felszabadulást, vagyis a KP a vér-agy gáton kívül is képes kifejteni a gonadotropin szekrécióra gyakorolt hatását (353) anélkül, hogy cFos expressziót indukálna a GnRH neuronokban (354). További bizonyíték az extrahipotalamikus hatásra, hogy a KP mediobazális hipotalamusz explantátumban vagyis a GnRH sejttestek hiányában (147) is GnRH felszabadulást vált ki. KP axonok és GnRH terminálisok közti appozíciókat írtak le rágcsáló eminentiában (355), az utóbbiak NKB rostokkal alkotott axo-axonális kontaktusai pedig további indirekt bizonyítékkul szolgálhatnak (356, 357), mivel ezek feltételezhetően az ARC KP/NKB/Dyn-pozitív neuronjaiból erednek (3).

A GPR54 immunhisztokémiai lokalizációja nagy valószínűséggel segíteni fog annak megbecslésében, hogy ezeknek a KP bemeneteknek a KP hatás közvetítésében mekkora jelentősége van.

A NKB jelenléte humán infundibuláris KP neuronokban egyrészt azért érdekes, mert kolokalizációjukat kimutatták már egér (3) és juh (234) ARC-ban, másrészt, a humán Inf-ban a KP- (347) és a NKB-IR (330) neuronok is hipertrofizálnak a menopauza utáni időszakban. Továbbá nemrég kimutatták, hogy a KP-GPR54 rendszerhez hasonlóan a NKB-t illetve receptorát (NK3) kódoló gén mutációja is hipogonadotróp hipogonadizmust okoz (358, 359). Kettős

immunfluoreszcens jelöléssel kimutattuk, hogy a női infundibuláris KP neuronok 77%-a preproNKB-t is szintetizál. Az Inf-ban lévő KP rostok 56.5%-a, a Pe-ben lévők 13.6%-a mutatott NKB immunreaktivitást, a LSV-ben pedig csak egyesek jelölt KP rostokat láttunk, vagyis az infundibuláris és az egyéb régiókból eredő KP axonok eltérő mértékben vesznek részt a hipotalamikus és az extrahipotalamikus területek innerválásában. Sem a helye, sem a mechanizmusa nem ismert még annak, ahogy a NKB az emberi reprodukcióra hat. Patkányban NK3 expressziót GnRH terminálisokban (356) valamint GnRH-NKB kontaktusokat az eminentia medianában (357) mutattak ki.

## 7. Összefoglalás

Emlősökben a szaporodást és az azzal összefüggő életteni folyamatokat a hipotalamo-hipofizeo-gonadális tengely szabályozza, melynek központi elemei a preoptikus area-hipotalamusz területén elhelyezkedő gonadotropin-releasing hormon (GnRH)-t termelő idegsejtek. Az ösztrogén számos módon befolyásolja a GnRH neuronok működését. Az értekezés célja további modulációs útvonalak azonosítása volt.

Irodalmi adatok alapján feltételeztük, hogy a GnRH neuronokban lévő ösztrogén receptorok (ER) az ösztrogén neuroprotektív hatásának közvetítésében is szerepelnek. *In vitro* körülmények közt GT1-7 sejteken kimutattuk, hogy a 17 $\beta$ -ösztradiol és a szelektív ösztrogén receptor (ER $\alpha$  és ER $\beta$ ) agonista, PPT és DPN jelentősen mérséklék az oxidatív stressz okozta mitokondriális membránpotenciál csökkenést és ezzel valószínűsíthetően védő hatást fejtenek ki.

Az ösztrogén hatása a GnRH idegsejteken indirekt módon, olyan neuroncsoportok közvetítésével is érvényesülhet, melyek ER-okat expresszálnak és efferenseik a GnRH neuronokra vetülnek. Ezek közül a nucleus suprachiasmaticus (SCN) a GnRH neuronok működéséhez szükséges cirkadián információt biztosítja, mely egerekben feltételezhetően egy köztes területen - a rostrális periventrikuláris régió (RP3V) kisszeptin (KP) neuronjain - keresztül jut el a GnRH neuronokhoz. Hím és nőstény egerekben anterográd pályajelöléssel és többes immunhisztokémiai jelöléssel kimutattuk, hogy a SCN vazopresszint (VP) termelő neuronjai a RP3V KP idegsejtjeire vetülnek, továbbá azt is, hogy nőstényekben az ösztrogén kezelés megnöveli a sejtesteken a VP appozíciók számát. Eredményeink valószínűsítik, hogy a SCN a rostrális KP populáción keresztül juttatja el a cirkadián információt a GnRH neuronokhoz. Ez az útvonal magas ösztrogén szint esetén erősödik.

A másik általunk vizsgált neuroncsoportot a KP-immunreaktív (IR) idegsejtek alkotják, melyek két fő csoportra, a RP3V-ben és a nucleus arcuatusban (ARC) elhelyezkedő neuronpopulációra különülnek. Eddigi adatok szerint az előbbi felelős az ösztrogén pozitív, az utóbbi pedig a negatív visszacsatolásának közvetítéséért, így mindkét nemben a reprodukív tengely kulcsfontosságú részét képezik. Egerekben megvizsgáltuk, hogy a KP neuronok két különböző funkciójú alpopulációjában termelődnek-e más neuropeptidek, melyek önmagukban is befolyásolják a GnRH neuronok működését. Eredményeink szerint az ARC mag közel minden KP neuronja

NKB-t is tartalmaz és körülbelül tíz százalékukban galanin is kimutatható. Ezzel szemben a RP3V KP neuronjainak közel 100%-a galanin pozitív. Ez a terület nem expresszál NKB-t. Kettős *in situ* hibridizáció alkalmazásával mindkét régióban a KP neuronok közel felében mutattunk ki galanin mRNS-t. Ezek szerint a vizsgált neuropeptidok közül együtt szintetizálódnak azok, melyeknek a pozitív visszacsatolásban van szerepe (KP és galanin az RP3V-ben) és azok, melyek a negatív visszacsatolásban vesznek részt (KP és NKB az ARC-ban). Következő lépésben a GnRH neuronok KP-IR afferenseinek vizsgálatával nőstényekben kimutattuk, hogy ösztrogén kezelt állatokban a GnRH neuronokon lévő KP-IR appozíciók körülbelül ötöde tartalmaz galanint, és alig hat százaléka NKB-t, ovariectomizáltakban ennél kisebb arányt tudunk kimutatni.

A humán hipotalamuszban a KP-IR struktúrák feltérképezésével nagy mértékű nemek közti különbséget mutattunk ki, KP-IR appozíciókat detektáltunk GnRH sejteken valamint KP-NKB kolokalizációt mutattunk ki az ARC-nak megfelelő nucleus infundibularisban.

## 8. Summary

In mammals the reproduction and related physiological functions are regulated by the hypothalamo-pituitary-gonadal axis. The central regulatory element of this axis is a preoptic-hypothalamic neuronal network, in which the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons form the final common pathway to control fertility. Estrogen can modify the function of GnRH neurons directly as well as indirectly within the neuronal network. The aim of the thesis was to identify novel modulatory mechanisms and pathways within the central regulatory network of reproduction.

Based on data available to date about neuroprotective roles of estrogen in various CNS regions, we hypothesised similar effects on GnRH neurons protecting against transient stress factors, which otherwise could – by inducing cell death – permanently impair reproduction. Our *in vitro* studies revealed that 24h exposure of the immortalised GnRH cell line (GT1-7) to  $17\beta$ -estradiol or selective ER agonists prevents the  $H_2O_2$ -induced decrease of the mitochondrial membrane potential. This result supports a critical effect of estrogen exerted directly on GnRH neurons within the regulatory center of reproduction. In contrast, estrogenic actions those providing negative and/or positive feedbacks for GnRH neurons, are mediated indirectly by involving ER $\alpha$  expressed by interneurons. The positive feedback converge with a circadian signal deriving from neurons of the suprachiasmatic nucleus (SCN), that is essential to generate GnRH surge in rodents. In mice the circadian signal reaches GnRH neurons presumably through kisspeptin (KP) neurons of the rostral periventricular nucleus of the third ventricle (RP3V). By combining anterograde tract tracing with multiple-labelling immunohistochemistry we demonstrated that suprachiasmatic vasopressin (VP)-synthesising neurons contact KP-immunoreactive (IR) neurons in the RP3V of male and female mice. We also showed that estrogen-treatment increased the number of VP-IR appositions on KP-IR neurons in gonadectomised mice. In summary, our morphological results indicate that the rostral KP-IR neuron population receives circadian information from the SCN VP-IR neurons through a pathway, which is enhanced by estrogen.

We also investigated subpopulations of KP-IR neurons in the RP3V and the arcuate nucleus (ARC) in connection with GnRH neurons. Data have already been demonstrated that the former group of KP neurons is involved in the mediation of the positive feedback of estrogen and consequently the surge release of GnRH. The latter

group, in turn, regulates the pulsatile release of GnRH, when serum estrogen levels are low and the feedback has negative consequences on GnRH secretion. We investigated whether other neuropeptides with modulatory role in the regulation of GnRH secretion are synthesised in KP neurons in female mice. We revealed that almost all KP neurons in the ARC are NKB immunopositive, whereas the tenth of them produce galanin. In contrast nearly all KP cells in the RP3V are galanin-IR. We detected no NKB-IR cell bodies in the RP3V. Double *in situ* hybridisation disclosed that nearly half of the KP neurons express galanin mRNA in both regions. According to these results, KP neurons of the RP3V and the ARC synthesise additional neuropeptides, galanin and NKB, which have been previously shown to play roles, respectively, in the mediation of estrogen's positive and negative feedback.

In the course of the examination of KP-IR varicosities on GnRH neurons, we have shown that GnRH neurones are innervated by heterogeneous KP cell populations; a significant proportion of the afferents deriving from the RP3V contains galanin, the incidence of which is strongly influenced by the presence of oestrogen. A few afferents derive from the ARC KP cell population, identified by their NKB content, which is not affected by the presence of oestrogen. At the ultrastructural level, different types of synaptic specialisations are made by KP-IR afferents onto GnRH neurones, possibly suggesting differential presence of the co-transmitter GABA or glutamate.

Finally, our investigations on the human hypothalamus revealed that KP-IR structures show sex differences. KP-IR appositions were detected on GnRH cells similarly to those in mice and KP-NKB co-localization was also demonstrated in the nucleus infundibularis, the region homologue to the rodent ARC.



## 9. Publikációk listája

### *Publikációk*

1. B Vida, E Hrabovszky, T Kalamatianos, C W Coen, Z Liposits, I Kalló  
Oestrogen receptor alpha and beta immunoreactive cells in the suprachiasmatic nucleus of mice: distribution, sex differences and regulation by gonadal hormones.  
J Neuroendocrinol. 2008 Nov; 20(11):1270-7.  
IF 3.252
2. I Kalló, C Jekkel, Hrabovszky, Z Jurányi, B Vida, A Járási, T Wilhelm, LG Harsing Jr, Z Liposits  
Immunohistochemical and *in situ* hybridization studies on glycine transporter 1 after transient ischemia in the rat forebrain.  
Neurochem Int. 2008 Mar-Apr; 52(4-5):799-808.  
IF 3.228
3. E Hrabovszky, P Ciofi, B Vida, MC Horvath, E Keller, A Caraty, SR Bloom, MA Ghatei, WS Dhillon, Z Liposits, I Kalló  
The kisspeptin system of the human hypothalamus. Sexual dimorphism and relationship with gonadotropin-releasing hormone and neurokinin B neurons  
Eur J Neurosci. 2010 Jun;31(11):1984-98.  
IF 3.418
4. B Vida, L Deli, T Kalamatianos, E Hrabovszky, A Caraty, C W Coen, Z Liposits, I Kalló  
Evidence for suprachiasmatic vasopressin neurons innervating kisspeptin neurons in the rostral periventricular area of the mouse brain: regulation by oestrogen  
J Neuroendocrinol. 2010 Sep;22(9):1032-9.  
IF 3.7
5. I Farkas, I Kalló, L Deli, B Vida, E Hrabovszky, C Fekete, SM Moenter, M Watanabe, Z Liposits  
Retrograde Endocannabinoid Signaling Reduces GABA-ergic Synaptic Transmission to Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons  
Endocrinology  
IF 4.752
6. I Kalló, B Vida, L Deli, CS. Molnár, E Hrabovszky, A Caraty, P Ciofi, CW C, Z Liposits  
Co-localisation of kisspeptin with galanin or neurokinin B in afferents to mouse GnRH neurones  
J Neuroendocrinol 2011 elfogadva  
IF 4.65

7. E Hrabovszky, CS Molnar, M Sipos, B Vida, P Ciofi, BA Borsay, L Sarkadi, L Herczeg, SR Bloom, MA Ghatel, WS. Dhillo, I Kalló, Z Liposits  
Sexual dimorphism of kisspeptin and neurokinin B immunoreactive neurons in the infundibular nucleus of aged men and women  
Front Genom Endocr 2011  
IF 0 (2011-ben megjelent folyóirat)

Összesített impakt faktor: 23

## 10. Köszönetnyilvánítás

Hálával tartozom témavezetőmnek, Dr. Kalló Imrének, aki megtanított a tudományos kutatómunka lépéseinek elsajátítására. Ezúton szeretném neki megköszönni segítségét és támogatását, tanácsait, amelyekkel szakmai fejlődésemhez hozzájárult.

Hálámat szeretném kifejezni konzulensemnek, Liposits Zsolt professzor úrnak, az Endokrin Neurobiológiai Kutatócsoport vezetőjének, hogy maximális támogatása mellett dolgozhattam kutatócsoportjában, és tanácsaival folyamatosan segítette munkámat.

Köszönöm Clive W. Coen professzor úrnak a dolgozat alapjául szolgáló közlemények elkészítésében nyújtott értékes segítségét. Dr. Hrabovszky Eriknek és Dr. Farkas Imrének a kollaborációban elvégzett munkát és azt, hogy szakmai kérdésekben mindig bizalommal fordulhattam hozzájuk.

Köszönöm Laki Éva és László Barna asszisztenseknek a gondos és figyelmes munkájukat, amivel a segítségemre voltak.

Külön köszönöm legközelebbi munkatársaimnak, Dr. Füzesi Tamásnak, Dr. Wittmann Gábornak, Bardóczy Zsuzsának és Kádár Andreának a hasznos tanácsokat és a vidám hangulatot.

Köszönöm minden további munkatársamnak az Endokrin Neurobiológiai Kutatócsoportból a támogatást, segítőkészséget és a nagyszerű társaságot: Bekó Norbertné, Deli Levente, Egri Péter, Dr. Fekete Csaba, Dr. Gereben Balázs, Hársfalvi Vivien, Juhász Andrea, Mohácsik Petra, Molnár Csilla, Nagyunyomi-Sényi Kata, Novák Viktória, Sárvári Anna, Dr. Sárvári Miklós, Szabó Edit, Turek Márta, Dr. Túri Gergely, Dr. Zeöld Anikó, Zséli Györgyi.

Szeretném megköszönni az Orvosi Géntechnológiai Részleg vezetőjének, Dr. Erdélyi Ferencnek, és munkatársainak, Kaziné Szűcs Máriának és Szafner Rozáliának, hogy az állatházi munkáim során mindig bizalommal fordulhattam hozzájuk segítségért.

## 11. Referenciák

1. Christian CA, Moenter SM 2010 The neurobiology of preovulatory and estradiol-induced gonadotropin-releasing hormone surges. *Endocr Rev* 31:544-577
2. Dardente H, Menet JS, Challet E, Tourmier BB, Pevet P, Masson-Pevet M 2004 Daily and circadian expression of neuropeptides in the suprachiasmatic nuclei of nocturnal and diurnal rodents. *Brain Res Mol Brain Res* 124:143-151
3. Navarro VM, Gottsch ML, Chavkin C, Okamura H, Clifton DK, Steiner RA 2009 Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse. *J Neurosci* 29:11859-11866
4. Lehman MN, Coolen LM, Goodman RL 2010 Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 151:3479-3489
5. Neill JD 2006 *Physiology of reproduction*. Third ed. San Diego: Academic Press
6. Levine JE 1997 New concepts of the neuroendocrine regulation of gonadotropin surges in rats. *Biol Reprod* 56:293-302
7. Park OK, Ramirez VD 1989 Spontaneous changes in LHRH release during the rat estrous cycle, as measured with repetitive push-pull perfusions of the pituitary gland in the same female rats. *Neuroendocrinology* 50:66-72
8. Merchenthaler I, Gorcs T, Setalo G, Petrusz P, Flerko B 1984 Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons and pathways in the rat brain. *Cell Tissue Res* 237:15-29
9. Jasoni CL, Porteous RW, Herbison AE 2009 Anatomical location of mature GnRH neurons corresponds with their birthdate in the developing mouse. *Dev Dyn* 238:524-531
10. Singh SP, Wolfe A, Ng Y, DiVall SA, Buggs C, Levine JE, Wondisford FE, Radovick S 2009 Impaired estrogen feedback and infertility in female mice with pituitary-specific deletion of estrogen receptor alpha (ESR1). *Biol Reprod* 81:488-496
11. Wintermantel TM, Campbell RE, Porteous R, Bock D, Grone HJ, Todman MG, Korach KS, Greiner E, Perez CA, Schutz G, Herbison AE 2006 Definition of estrogen receptor pathway critical for estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone neurons and fertility. *Neuron* 52:271-280
12. Christian CA, Moenter SM 2007 Estradiol induces diurnal shifts in GABA transmission to gonadotropin-releasing hormone neurons to provide a neural signal for ovulation. *J Neurosci* 27:1913-1921
13. Christian CA, Pielecka-Fortuna J, Moenter SM 2009 Estradiol suppresses glutamatergic transmission to gonadotropin-releasing hormone neurons in a model of negative feedback in mice. *Biol Reprod* 80:1128-1135
14. Christian CA, Mobley JL, Moenter SM 2005 Diurnal and estradiol-dependent changes in gonadotropin-releasing hormone neuron firing activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:15682-15687
15. Strobl FJ, Gilmore CA, Levine JE 1989 Castration induces luteinizing hormone (LH) secretion in hypophysectomized pituitary-grafted rats receiving pulsatile LH-releasing hormone infusions. *Endocrinology* 124:1140-1144
16. Adams TE, Norman RL, Spies HG 1981 Gonadotropin-releasing hormone receptor binding and pituitary responsiveness in estradiol-primed monkeys. *Science* 213:1388-1390
17. Aiyer MS, Fink G, Greig F 1974 Changes in the sensitivity of the pituitary gland to luteinizing hormone releasing factor during the oestrous cycle of the rat. *J Endocrinol* 60:47-64

18. Wheaton JE, McCann SM 1976 Luteinizing hormone-releasing hormone in peripheral plasma and hypothalamus of normal and ovariectomized rats. *Neuroendocrinology* 20:296-310
19. Cordey M, Pike CJ 2005 Neuroprotective properties of selective estrogen receptor agonists in cultured neurons. *Brain Res* 1045:217-223
20. de la Iglesia HO, Schwartz WJ 2006 Minireview: timely ovulation: circadian regulation of the female hypothalamo-pituitary-gonadal axis. *Endocrinology* 147:1148-1153
21. Ellis GB, Desjardins C 1982 Male rats secrete luteinizing hormone and testosterone episodically. *Endocrinology* 110:1618-1627
22. Gogan F, Beattie IA, Hery M, Laplante E, Kordon D 1980 Effect of neonatal administration of steroids or gonadectomy upon oestradiol-induced luteinizing hormone release in rats of both sexes. *J Endocrinol* 85:69-74
23. Rajendren G, Gibson MJ 1999 Expression of galanin immunoreactivity in gonadotropin-releasing hormone neurons in mice: a confocal microscopic study. *Brain Res* 821:270-276
24. Sullivan SD, Moenter SM 2004 Prenatal androgens alter GABAergic drive to gonadotropin-releasing hormone neurons: implications for a common fertility disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:7129-7134
25. Barraclough CA 1961 Production of anovulatory, sterile rats by single injections of testosterone propionate. *Endocrinology* 68:62-67
26. Barraclough CA, Gorski RA 1961 Evidence that the hypothalamus is responsible for androgen-induced sterility in the female rat. *Endocrinology* 68:68-79
27. Stopa EG, Koh ET, Svendsen CN, Rogers WT, Schwaber JS, King JC 1991 Computer-assisted mapping of immunoreactive mammalian gonadotropin-releasing hormone in adult human basal forebrain and amygdala. *Endocrinology* 128:3199-3207
28. Kerdelhue B, Brown S, Lenoir V, Queenan JT, Jr., Jones GS, Scholler R, Jones HW, Jr. 2002 Timing of initiation of the preovulatory luteinizing hormone surge and its relationship with the circadian cortisol rhythm in the human. *Neuroendocrinology* 75:158-163
29. Boden MJ, Kennaway DJ 2006 Circadian rhythms and reproduction. *Reproduction* 132:379-392
30. Cahill DJ, Wardle PG, Harlow CR, Hull MG 1998 Onset of the preovulatory luteinizing hormone surge: diurnal timing and critical follicular prerequisites. *Fertil Steril* 70:56-59
31. Yen SS, Tsai CC, Naftolin F, Vandenberg G, Ajabor L 1972 Pulsatile patterns of gonadotropin release in subjects with and without ovarian function. *J Clin Endocrinol Metab* 34:671-675
32. Filicori M, Santoro N, Merriam GR, Crowley WF, Jr. 1986 Characterization of the physiological pattern of episodic gonadotropin secretion throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 62:1136-1144
33. Knobil E, Plant TM, Wildt L, Belchetz PE, Marshall G 1980 Control of the rhesus monkey menstrual cycle: permissive role of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. *Science* 207:1371-1373
34. Pau KY, Berria M, Hess DL, Spies HG 1993 Preovulatory gonadotropin-releasing hormone surge in ovarian-intact rhesus macaques. *Endocrinology* 133:1650-1656
35. Thompson IE, Arfania J, Taymor ML 1973 Effects of estrogen and progesterone on pituitary response to stimulation by luteinizing hormone-releasing factor. *J Clin Endocrinol Metab* 37:152-155
36. Hayes FJ, Seminara SB, Decruz S, Boepple PA, Crowley WF, Jr. 2000 Aromatase inhibition in the human male reveals a hypothalamic site of estrogen feedback. *J Clin Endocrinol Metab* 85:3027-3035

37. Park SJ, Goldsmith LT, Weiss G 2002 Age-related changes in the regulation of luteinizing hormone secretion by estrogen in women. *Exp Biol Med* (Maywood) 227:455-464
38. Nakai Y, Plant TM, Hess DL, Keogh EJ, Knobil E 1978 On the sites of the negative and positive feedback actions of estradiol in the control of gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Endocrinology* 102:1008-1014
39. Santen RJ 1975 Is aromatization of testosterone to estradiol required for inhibition of luteinizing hormone secretion in men? *J Clin Invest* 56:1555-1563
40. Norman RL, Rivier J, Vale W, Spies HG 1986 Inhibition of estradiol-induced gonadotropin release in ovariectomized rhesus macaques by a gonadotropin-releasing hormone antagonist. *Fertil Steril* 45:288-291
41. Pau KY, Gliessman PM, Hess DL, Spies HG 1988 Effects of estrogen on hypothalamic gonadotropin-releasing hormone release in castrated male rhesus macaques. *Brain Res* 459:70-75
42. Karsch FJ, Weick RF, Butler WR, Dierschke DJ, Krey LC, Weiss G, Hotchkiss J, Yamaji T, Knobil E 1973 Induced LH surges in the rhesus monkey: strength-duration characteristics of the estrogen stimulus. *Endocrinology* 92:1740-1747
43. Dorner G, Rohde W, Schnorr D 1975 Evocability of a slight positive oestrogen feedback action on LH secretion in castrated and oestrogen-primed men. *Endokrinologie* 66:373-376
44. Lee SJ, McEwen BS 2001 Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogens and their therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:569-591
45. McEwen BS 2001 Invited review: Estrogens effects on the brain: multiple sites and molecular mechanisms. *J Appl Physiol* 91:2785-2801
46. Walter P, Green S, Greene G, Krust A, Bornert JM, Jeltsch JM, Staub A, Jensen E, Scraze G, Waterfield M, et al. 1985 Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:7889-7893
47. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA 1996 Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:5925-5930
48. Milner TA, McEwen BS, Hayashi S, Li CJ, Reagan LP, Alves SE 2001 Ultrastructural evidence that hippocampal alpha estrogen receptors are located at extranuclear sites. *J Comp Neurol* 429:355-371
49. Marino M, Galluzzo P, Ascenzi P 2006 Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. *Curr Genomics* 7:497-508
50. Varea O, Arevalo MA, Garrido JJ, Garcia-Segura LM, Wandosell F, Mendez P 2010 Interaction of estrogen receptors with insulin-like growth factor-I and Wnt signaling in the nervous system. *Steroids* 75:565-569
51. Razandi M, Pedram A, Greene GL, Levin ER 1999 Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol Endocrinol* 13:307-319
52. Wade CB, Robinson S, Shapiro RA, Dorsa DM 2001 Estrogen receptor (ER)alpha and ERbeta exhibit unique pharmacologic properties when coupled to activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocrinology* 142:2336-2342
53. Marino M, Ascenzi P 2008 Membrane association of estrogen receptor alpha and beta influences 17beta-estradiol-mediated cancer cell proliferation. *Steroids* 73:853-858
54. Levin ER 2002 Cellular functions of plasma membrane estrogen receptors. *Steroids* 67:471-475
55. Jacobi JS, Martin C, Nava G, Jeziorski MC, Clapp C, Martinez de la Escalera G 2007 17-Beta-estradiol directly regulates the expression of adrenergic receptors and kisspeptin/GPR54 system in GT1-7 GnRH neurons. *Neuroendocrinology* 86:260-269
56. Toran-Allerand CD, Guan X, MacLusky NJ, Horvath TL, Diano S, Singh M, Connolly ES, Jr., Nethrapalli IS, Tinnikov AA 2002 ER-X: a novel, plasma membrane-associated, putative estrogen receptor that is regulated during development and after ischemic brain injury. *J Neurosci* 22:8391-8401

57. Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M 2000 Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev* 52:513-556
58. Valverde MA, Rojas P, Amigo J, Cosmelli D, Orio P, Bahamonde MI, Mann GE, Vergara C, Latorre R 1999 Acute activation of Maxi-K channels (hSlo) by estradiol binding to the beta subunit. *Science* 285:1929-1931
59. Ruehlmann DO, Steinert JR, Valverde MA, Jacob R, Mann GE 1998 Environmental estrogenic pollutants induce acute vascular relaxation by inhibiting L-type Ca<sup>2+</sup> channels in smooth muscle cells. *FASEB J* 12:613-619
60. Kelly MJ, Moss RL, Dudley CA 1977 The effects of microelectrophoretically applied estrogen, cortisol and acetylcholine on medial preoptic-septal unit activity throughout the estrous cycle of the female rat. *Exp Brain Res* 30:53-64
61. Wong M, Thompson TL, Moss RL 1996 Nongenomic actions of estrogen in the brain: physiological significance and cellular mechanisms. *Crit Rev Neurobiol* 10:189-203
62. Alyea RA, Laurence SE, Kim SH, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA, Watson CS 2008 The roles of membrane estrogen receptor subtypes in modulating dopamine transporters in PC-12 cells. *J Neurochem* 106:1525-1533
63. Whiting KP, Restall CJ, Brain PF 2000 Steroid hormone-induced effects on membrane fluidity and their potential roles in non-genomic mechanisms. *Life Sci* 67:743-757
64. Klinge CM 2008 Estrogenic control of mitochondrial function and biogenesis. *J Cell Biochem* 105:1342-1351
65. Bishop J, Simpkins JW 1994 Estradiol treatment increases viability of glioma and neuroblastoma cells in vitro. *Mol Cell Neurosci* 5:303-308
66. Green PS, Bishop J, Simpkins JW 1997 17 alpha-estradiol exerts neuroprotective effects on SK-N-SH cells. *J Neurosci* 17:511-515
67. Green PS, Gridley KE, Simpkins JW 1996 Estradiol protects against beta-amyloid (25-35)-induced toxicity in SK-N-SH human neuroblastoma cells. *Neurosci Lett* 218:165-168
68. Singer CA, Rogers KL, Strickland TM, Dorsa DM 1996 Estrogen protects primary cortical neurons from glutamate toxicity. *Neurosci Lett* 212:13-16
69. Moosmann B, Behl C 1999 The antioxidant neuroprotective effects of estrogens and phenolic compounds are independent from their estrogenic properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:8867-8872
70. Weaver CE, Jr., Park-Chung M, Gibbs TT, Farb DH 1997 17beta-Estradiol protects against NMDA-induced excitotoxicity by direct inhibition of NMDA receptors. *Brain Res* 761:338-341
71. Behl C, Skutella T, Lezoualc'h F, Post A, Widmann M, Newton CJ, Holsboer F 1997 Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: structure-activity relationship. *Mol Pharmacol* 51:535-541
72. Blum-Degen D, Haas M, Pohli S, Harth R, Romer W, Oettel M, Riederer P, Gotz ME 1998 Scavestrogens protect IMR 32 cells from oxidative stress-induced cell death. *Toxicol Appl Pharmacol* 152:49-55
73. Goodman Y, Bruce AJ, Cheng B, Mattson MP 1996 Estrogens attenuate and corticosterone exacerbates excitotoxicity, oxidative injury, and amyloid beta-peptide toxicity in hippocampal neurons. *J Neurochem* 66:1836-1844
74. Zhao L, Brinton RD 2007 Estrogen receptor alpha and beta differentially regulate intracellular Ca<sup>2+</sup> dynamics leading to ERK phosphorylation and estrogen neuroprotection in hippocampal neurons. *Brain Res* 1172:48-59
75. Wang J, Green PS, Simpkins JW 2001 Estradiol protects against ATP depletion, mitochondrial membrane potential decline and the generation of reactive oxygen species induced by 3-nitropropionic acid in SK-N-SH human neuroblastoma cells. *J Neurochem* 77:804-811

76. Nilsen J, Brinton RD 2003 Divergent impact of progesterone and medroxyprogesterone acetate (Provera) on nuclear mitogen-activated protein kinase signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10506-10511
77. Mattson MP, Robinson N, Guo Q 1997 Estrogens stabilize mitochondrial function and protect neural cells against the pro-apoptotic action of mutant presenilin-1. *Neuroreport* 8:3817-3821
78. Petersen SL, McCrone S, Keller M, Shores S 1995 Effects of estrogen and progesterone on luteinizing hormone-releasing hormone messenger ribonucleic acid levels: consideration of temporal and neuroanatomical variables. *Endocrinology* 136:3604-3610
79. Marks DL, Smith MS, Clifton DK, Steiner RA 1993 Regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and galanin gene expression in GnRH neurons during lactation in the rat. *Endocrinology* 133:1450-1458
80. Varju P, Chang KC, Hrabovszky E, Merchenthaler I, Liposits Z 2009 Temporal profile of estrogen-dependent gene expression in LHRH-producing GT1-7 cells. *Neurochem Int* 54:119-134
81. Pak TR, Chung WC, Roberts JL, Handa RJ 2006 Ligand-independent effects of estrogen receptor beta on mouse gonadotropin-releasing hormone promoter activity. *Endocrinology* 147:1924-1931
82. Temple JL, Laing E, Sunder A, Wray S 2004 Direct action of estradiol on gonadotropin-releasing hormone-1 neuronal activity via a transcription-dependent mechanism. *J Neurosci* 24:6326-6333
83. Ronnekleiv OK, Bosch MA, Zhang C 2010 Regulation of endogenous conductances in GnRH neurons by estrogens. *Brain Res* 1364:25-34
84. Herbison AE 1998 Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocr Rev* 19:302-330
85. Petersen SL, Ottem EN, Carpenter CD 2003 Direct and indirect regulation of gonadotropin-releasing hormone neurons by estradiol. *Biol Reprod* 69:1771-1778
86. Zhen S, Dunn IC, Wray S, Liu Y, Chappell PE, Levine JE, Radovick S 1997 An alternative gonadotropin-releasing hormone (GnRH) RNA splicing product found in cultured GnRH neurons and mouse hypothalamus. *J Biol Chem* 272:12620-12625
87. Martinez de la Escalera G, Choi AL, Weiner RI 1992 Generation and synchronization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulses: intrinsic properties of the GT1-1 GnRH neuronal cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:1852-1855
88. Wetsel WC, Valenca MM, Merchenthaler I, Liposits Z, Lopez FJ, Weiner RI, Mellon PL, Negro-Vilar A 1992 Intrinsic pulsatile secretory activity of immortalized luteinizing hormone-releasing hormone-secreting neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4149-4153
89. Wolfe A, Ng Y, Divall SA, Singh SP, Radovick S 2008 Development of an immortalised, post-pubertal gonadotropin-releasing hormone neuronal cell line. *J Neuroendocrinol* 20:1029-1037
90. Suter KJ, Song WJ, Sampson TL, Wuarin JP, Saunders JT, Dudek FE, Moenter SM 2000 Genetic targeting of green fluorescent protein to gonadotropin-releasing hormone neurons: characterization of whole-cell electrophysiological properties and morphology. *Endocrinology* 141:412-419
91. Kelly MJ, Ronnekleiv OK, Eskay RL 1984 Identification of estrogen-responsive LHRH neurons in the guinea pig hypothalamus. *Brain Res Bull* 12:399-407
92. Skynner MJ, Sim JA, Herbison AE 1999 Detection of estrogen receptor alpha and beta messenger ribonucleic acids in adult gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 140:5195-5201
93. Kallo I, Butler JA, Barkovics-Kallo M, Goubillon ML, Coen CW 2001 Oestrogen receptor beta-immunoreactivity in gonadotropin releasing hormone-expressing neurones: regulation by oestrogen. *J Neuroendocrinol* 13:741-748
94. Hrabovszky E, Shughrae PJ, Merchenthaler I, Hajszan T, Carpenter CD, Liposits Z, Petersen SL 2000 Detection of estrogen receptor-beta messenger ribonucleic acid and



- 1251-estrogen binding sites in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. *Endocrinology* 141:3506-3509
95. Herbison AE SM, Sim JA 2001 Lack of detection of estrogen receptor- $\alpha$  transcripts in mouse gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*:493
  96. Hrabovszky E, Kallo I, Szlavik N, Keller E, Merchenthaler I, Liposits Z 2007 Gonadotropin-releasing hormone neurons express estrogen receptor-beta. *J Clin Endocrinol Metab* 92:2827-2830
  97. Malyala A, Pattee P, Nagalla SR, Kelly MJ, Ronnekleiv OK 2004 Suppression subtractive hybridization and microarray identification of estrogen-regulated hypothalamic genes. *Neurochem Res* 29:1189-1200
  98. Abraham IM, Han SK, Todman MG, Korach KS, Herbison AE 2003 Estrogen receptor beta mediates rapid estrogen actions on gonadotropin-releasing hormone neurons in vivo. *J Neurosci* 23:5771-5777
  99. Chu Z, Andrade J, Shupnik MA, Moenter SM 2009 Differential regulation of gonadotropin-releasing hormone neuron activity and membrane properties by acutely applied estradiol: dependence on dose and estrogen receptor subtype. *J Neurosci* 29:5616-5627
  100. Handa RJ, Ogawa S, Wang JM, Herbison AE 2011 Roles for estrogen receptor beta in adult brain function. *J Neuroendocrinol*
  101. Couse JF, Yates MM, Walker VR, Korach KS 2003 Characterization of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in estrogen receptor (ER) Null mice reveals hypergonadism and endocrine sex reversal in females lacking ERalpha but not ERbeta. *Mol Endocrinol* 17:1039-1053
  102. Dupont S, Krust A, Gansmuller A, Dierich A, Chambon P, Mark M 2000 Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes. *Development* 127:4277-4291
  103. Antal MC, Krust A, Chambon P, Mark M 2008 Sterility and absence of histopathological defects in nonreproductive organs of a mouse ERbeta-null mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:2433-2438
  104. Noel SD, Keen KL, Baumann DI, Filardo EJ, Terasawa E 2009 Involvement of G protein-coupled receptor 30 (GPR30) in rapid action of estrogen in primate LHRH neurons. *Mol Endocrinol* 23:349-359
  105. Otto C, Fuchs I, Kauselmann G, Kern H, Zevnik B, Andreasen P, Schwarz G, Altmann H, Klewer M, Schoor M, Vonk R, Fritzscheier KH 2009 GPR30 does not mediate estrogenic responses in reproductive organs in mice. *Biol Reprod* 80:34-41
  106. Roy D, Angelini NL, Belsham DD 1999 Estrogen directly represses gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene expression in estrogen receptor-alpha (ERalpha)- and ERbeta-expressing GT1-7 GnRH neurons. *Endocrinology* 140:5045-5053
  107. Butler JA, Sjoberg M, Coen CW 1999 Evidence for oestrogen receptor alpha-immunoreactivity in gonadotrophin-releasing hormone-expressing neurones. *J Neuroendocrinol* 11:331-335
  108. Shen ES, Meade EH, Perez MC, Deecher DC, Negro-Vilar A, Lopez FJ 1998 Expression of functional estrogen receptors and galanin messenger ribonucleic acid in immortalized luteinizing hormone-releasing hormone neurons: estrogenic control of galanin gene expression. *Endocrinology* 139:939-948
  109. Ng Y, Wolfe A, Novaira HJ, Radovick S 2009 Estrogen regulation of gene expression in GnRH neurons. *Mol Cell Endocrinol* 303:25-33
  110. Brooks C, Ketsawatomkron P, Sui Y, Wang J, Wang CY, Yu FS, Dong Z 2005 Acidic pH inhibits ATP depletion-induced tubular cell apoptosis by blocking caspase-9 activation in apoptosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 289:F410-419
  111. Mize AL, Shapiro RA, Dorsa DM 2003 Estrogen receptor-mediated neuroprotection from oxidative stress requires activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocrinology* 144:306-312

112. Brann DW, Dhandapani K, Wakade C, Mahesh VB, Khan MM 2007 Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogen: basic mechanisms and clinical implications. *Steroids* 72:381-405
113. Shakil T, Snell A, Whitehead SA 1994 Effects of lipopolysaccharide and cyclosporin on the endocrine control of ovarian function. *J Reprod Fertil* 100:57-64
114. Xiao E, Xia-Zhang L, Ferin M 2000 Inhibitory effects of endotoxin on LH secretion in the ovariectomized monkey are prevented by naloxone but not by an interleukin-1 receptor antagonist. *Neuroimmunomodulation* 7:6-15
115. Li XF, Mitchell JC, Wood S, Coen CW, Lightman SL, O'Byrne KT 2003 The effect of oestradiol and progesterone on hypoglycaemic stress-induced suppression of pulsatile luteinizing hormone release and on corticotropin-releasing hormone mRNA expression in the rat. *J Neuroendocrinol* 15:468-476
116. Tilbrook AJ, Canny BJ, Serapiglia MD, Ambrose TJ, Clarke IJ 1999 Suppression of the secretion of luteinizing hormone due to isolation/restraint stress in gonadectomised rams and ewes is influenced by sex steroids. *J Endocrinol* 160:469-481
117. Norman RL, McGlone J, Smith CJ 1994 Restraint inhibits luteinizing hormone secretion in the follicular phase of the menstrual cycle in rhesus macaques. *Biol Reprod* 50:16-26
118. Laughlin GA, Yen SS 1996 Nutritional and endocrine-metabolic aberrations in amenorrhic athletes. *J Clin Endocrinol Metab* 81:4301-4309
119. Loucks AB, Heath EM 1994 Dietary restriction reduces luteinizing hormone (LH) pulse frequency during waking hours and increases LH pulse amplitude during sleep in young menstruating women. *J Clin Endocrinol Metab* 78:910-915
120. Berriman SJ, Wade GN, Blaustein JD 1992 Expression of Fos-like proteins in gonadotropin-releasing hormone neurons of Syrian hamsters: effects of estrous cycles and metabolic fuels. *Endocrinology* 131:2222-2228
121. Kile JP, Alexander BM, Moss GE, Hallford DM, Nett TM 1991 Gonadotropin-releasing hormone overrides the negative effect of reduced dietary energy on gonadotropin synthesis and secretion in ewes. *Endocrinology* 128:843-849
122. Cameron JL, Nobsch C 1991 Suppression of pulsatile luteinizing hormone and testosterone secretion during short term food restriction in the adult male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Endocrinology* 128:1532-1540
123. Bronson FH 1988 Effect of food manipulation on the GnRH-LH-estradiol axis of young female rats. *Am J Physiol* 254:R616-621
124. Bronson FH 1986 Food-restricted, prepubertal, female rats: rapid recovery of luteinizing hormone pulsing with excess food, and full recovery of pubertal development with gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 118:2483-2487
125. Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, Flier JS 1996 Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 382:250-252
126. Hill JW, Levine JE 2003 Abnormal response of the neuropeptide Y-deficient mouse reproductive axis to food deprivation but not lactation. *Endocrinology* 144:1780-1786
127. Schneider JE 2004 Energy balance and reproduction. *Physiol Behav* 81:289-317
128. Wade GN, Jones JE 2004 Neuroendocrinology of nutritional infertility. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287:R1277-1296
129. Zhang S, Blache D, Blackberry MA, Martin GB 2005 Body reserves affect the reproductive endocrine responses to an acute change in nutrition in mature male sheep. *Anim Reprod Sci* 88:257-269
130. Amado D, Cavalheiro EA, Bentivoglio M 1993 Epilepsy and hormonal regulation: the patterns of GnRH and galanin immunoreactivity in the hypothalamus of epileptic female rats. *Epilepsy Res* 14:149-159
131. Ebling FJ, Cronin AS, Hastings MH 1998 Resistance of gonadotropin-releasing hormone neurons to glutamatergic neurotoxicity. *Brain Res Bull* 47:575-584

132. Spengel DJ, Kruth U, Hanley DF, Sprengel R, Seeburg PH 1999 GABA- and glutamate-activated channels in green fluorescent protein-tagged gonadotropin-releasing hormone neurons in transgenic mice. *J Neurosci* 19:2037-2050
133. Kuehl-Kovarik MC, Pouliot WA, Halterman GL, Handa RJ, Dudek FE, Partin KM 2002 Episodic bursting activity and response to excitatory amino acids in acutely dissociated gonadotropin-releasing hormone neurons genetically targeted with green fluorescent protein. *J Neurosci* 22:2313-2322
134. Brann DW, Mahesh VB 1995 Glutamate: a major neuroendocrine excitatory signal mediating steroid effects on gonadotropin secretion. *J Steroid Biochem Mol Biol* 53:325-329
135. Kiss J, Kocsis K, Csaki A, Halasz B 2003 Evidence for vesicular glutamate transporter synapses onto gonadotropin-releasing hormone and other neurons in the rat medial preoptic area. *Eur J Neurosci* 18:3267-3278
136. Olney JW 1969 Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164:719-721
137. Michaels RL, Rothman SM 1990 Glutamate neurotoxicity in vitro: antagonist pharmacology and intracellular calcium concentrations. *J Neurosci* 10:283-292
138. Murphy TH, Miyamoto M, Sastre A, Schnaar RL, Coyle JT 1989 Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress. *Neuron* 2:1547-1558
139. Lindzey J, Jayes FL, Yates MM, Couse JF, Korach KS 2006 The bi-modal effects of estradiol on gonadotropin synthesis and secretion in female mice are dependent on estrogen receptor-alpha. *J Endocrinol* 191:309-317
140. Christian CA, Glidewell-Kenney C, Jameson JL, Moenter SM 2008 Classical estrogen receptor alpha signaling mediates negative and positive feedback on gonadotropin-releasing hormone neuron firing. *Endocrinology* 149:5328-5334
141. Herbison AE 2008 Estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons in the rodent: the case for the rostral periventricular area of the third ventricle (RP3V). *Brain Res Rev* 57:277-287
142. Wiegand SJ, Terasawa E, Bridson WE 1978 Persistent estrus and blockade of progesterone-induced LH release follows lesions which do not damage the suprachiasmatic nucleus. *Endocrinology* 102:1645-1648
143. Petersen SL, Cheuk C, Hartman RD, Barraclough CA 1989 Medial preoptic microimplants of the antiestrogen, keoxifene, affect luteinizing hormone-releasing hormone mRNA levels, median eminence luteinizing hormone-releasing hormone concentrations and luteinizing hormone release in ovariectomized, estrogen-treated rats. *J Neuroendocrinol* 1:279-283
144. Petersen SL, Barraclough CA 1989 Suppression of spontaneous LH surges in estrogen-treated ovariectomized rats by microimplants of antiestrogens into the preoptic brain. *Brain Res* 484:279-289
145. Han SK, Lee K, Bhattarai JP, Herbison AE 2010 Gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) exerts stimulatory effects on GnRH neurons in intact adult male and female mice. *J Neuroendocrinol* 22:188-195
146. Smith JT, Popa SM, Clifton DK, Hoffman GE, Steiner RA 2006 Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge. *J Neurosci* 26:6687-6694
147. Clarkson J, d'Anglemont de Tassigny X, Moreno AS, Colledge WH, Herbison AE 2008 Kisspeptin-GPR54 signaling is essential for preovulatory gonadotropin-releasing hormone neuron activation and the luteinizing hormone surge. *J Neurosci* 28:8691-8697
148. Roa J, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M 2008 New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function. *Front Neuroendocrinol* 29:48-69

149. Smith JT, Dungan HM, Stoll EA, Gottsch ML, Braun RE, Eacker SM, Clifton DK, Steiner RA 2005 Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology* 146:2976-2984
150. Yin W, Wu D, Noel ML, Gore AC 2009 Gonadotropin-releasing hormone neuroterminals and their microenvironment in the median eminence: effects of aging and estradiol treatment. *Endocrinology* 150:5498-5508
151. Prevot V, Dutoit S, Croix D, Tramu G, Beauvillain JC 1998 Semi-quantitative ultrastructural analysis of the localization and neuropeptide content of gonadotropin releasing hormone nerve terminals in the median eminence throughout the estrous cycle of the rat. *Neuroscience* 84:177-191
152. Knauf C, Ferreira S, Hamdane M, Mailliot C, Prevot V, Beauvillain JC, Croix D 2001 Variation of endothelial nitric oxide synthase synthesis in the median eminence during the rat estrous cycle: an additional argument for the implication of vascular blood vessel in the control of GnRH release. *Endocrinology* 142:4288-4294
153. Knauf C, Prevot V, Stefano GB, Mortreux G, Beauvillain JC, Croix D 2001 Evidence for a spontaneous nitric oxide release from the rat median eminence: influence on gonadotropin-releasing hormone release. *Endocrinology* 142:2343-2350
154. Prevot V, Croix D, Rialas CM, Poulain P, Fricchione GL, Stefano GB, Beauvillain JC 1999 Estradiol coupling to endothelial nitric oxide stimulates gonadotropin-releasing hormone release from rat median eminence via a membrane receptor. *Endocrinology* 140:652-659
155. Aguan K, Mahesh VB, Ping L, Bhat G, Brann DW 1996 Evidence for a physiological role for nitric oxide in the regulation of the LH surge: effect of central administration of antisense oligonucleotides to nitric oxide synthase. *Neuroendocrinology* 64:449-455
156. Bouret S, De Seranno S, Beauvillain JC, Prevot V 2004 Transforming growth factor beta1 may directly influence gonadotropin-releasing hormone gene expression in the rat hypothalamus. *Endocrinology* 145:1794-1801
157. Prevot V, Cornea A, Mungenast A, Smiley G, Ojeda SR 2003 Activation of erbB-1 signaling in tanyocytes of the median eminence stimulates transforming growth factor beta1 release via prostaglandin E2 production and induces cell plasticity. *J Neurosci* 23:10622-10632
158. Reppert SM, Weaver DR 2002 Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418:935-941
159. Lee C, Etchegaray JP, Cagampang FR, Loudon AS, Reppert SM 2001 Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell* 107:855-867
160. Froy O, Chapnik N 2007 Circadian oscillation of innate immunity components in mouse small intestine. *Mol Immunol* 44:1954-1960
161. Zvonice S, Pititsyn AA, Conrad SA, Scott LK, Floyd ZE, Kilroy G, Wu X, Goh BC, Mynatt RL, Gimble JM 2006 Characterization of peripheral circadian clocks in adipose tissues. *Diabetes* 55:962-970
162. Durgan DJ, Trexler NA, Egbejimi O, McElfresh TA, Suk HY, Petterson LE, Shaw CA, Hardin PE, Bray MS, Chandler MP, Chow CW, Young ME 2006 The circadian clock within the cardiomyocyte is essential for responsiveness of the heart to fatty acids. *J Biol Chem* 281:24254-24269
163. Loboda A, Kraft WK, Fine B, Joseph J, Nebozhyn M, Zhang C, He Y, Yang X, Wright C, Morris M, Chalikhonda I, Ferguson M, Emilsson V, Leonardson A, Lamb J, Dai H, Schadt E, Greenberg HE, Lum PY 2009 Diurnal variation of the human adipose transcriptome and the link to metabolic disease. *BMC Med Genomics* 2:7
164. Panda S, Antoch MP, Miller BH, Su AI, Schook AB, Straume M, Schultz PG, Kay SA, Takahashi JS, Hogenesch JB 2002 Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell* 109:307-320

165. Drucker-Colin R, Aguilar-Roblero R, Garcia-Hernandez F, Fernandez-Cancino F, Bermudez Ratonni F 1984 Fetal suprachiasmatic nucleus transplants: diurnal rhythm recovery of lesioned rats. *Brain Res* 311:353-357
166. Silver R, Lehman MN, Gibson M, Gladstone WR, Bittman EL 1990 Dispersed cell suspensions of fetal SCN restore circadian rhythmicity in SCN-lesioned adult hamsters. *Brain Res* 525:45-58
167. Moore RY, Eichler VB 1972 Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res* 42:201-206
168. Stephan FK, Zucker I 1972 Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69:1583-1586
169. Ralph MR, Foster RG, Davis FC, Menaker M 1990 Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* 247:975-978
170. Froy O 2011 The circadian clock and metabolism. *Clin Sci (Lond)* 120:65-72
171. Le Minh N, Damiola F, Tronche F, Schutz G, Schibler U 2001 Glucocorticoid hormones inhibit food-induced phase-shifting of peripheral circadian oscillators. *EMBO J* 20:7128-7136
172. Reppert SM, Weaver DR 2001 Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol* 63:647-676
173. Lowrey PL, Takahashi JS 2000 Genetics of the mammalian circadian system: Photoc entrainment, circadian pacemaker mechanisms, and posttranslational regulation. *Annu Rev Genet* 34:533-562
174. Okamura H 2004 Clock genes in cell clocks: roles, actions, and mysteries. *J Biol Rhythms* 19:388-399
175. Yoo SH, Yamazaki S, Lowrey PL, Shimomura K, Ko CH, Buhr ED, Slepka SM, Hong HK, Oh WJ, Yoo OJ, Menaker M, Takahashi JS 2004 PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:5339-5346
176. Gillespie JM, Chan BP, Roy D, Cai F, Belsham DD 2003 Expression of circadian rhythm genes in gonadotropin-releasing hormone-secreting GT1-7 neurons. *Endocrinology* 144:5285-5292
177. Gore AC 1998 Diurnal rhythmicity of gonadotropin-releasing hormone gene expression in the rat. *Neuroendocrinology* 68:257-263
178. Balsalobre A, Damiola F, Schibler U 1998 A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* 93:929-937
179. Chappell PE, White RS, Mellon PL 2003 Circadian gene expression regulates pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretory patterns in the hypothalamic GnRH-secreting GT1-7 cell line. *J Neurosci* 23:11202-11213
180. Miller BH, Olson SL, Levine JE, Turek FW, Horton TH, Takahashi JS 2006 Vazopressin regulation of the proestrous luteinizing hormone surge in wild-type and Clock mutant mice. *Biol Reprod* 75:778-784
181. Everett JW, Sawyer CH 1950 A 24-hour periodicity in the "LH-release apparatus" of female rats, disclosed by barbiturate sedation. *Endocrinology* 47:198-218
182. Kawakami M, Arita J 1981 Effects of lesions in the medial basal part of the suprachiasmatic area on prolactin and gonadotropin surges induced by estrogen and progesterone treatment in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology* 32:242-247
183. Meyer-Bernstein EL, Jetton AE, Matsumoto SI, Markuns JF, Lehman MN, Bittman EL 1999 Effects of suprachiasmatic transplants on circadian rhythms of neuroendocrine function in golden hamsters. *Endocrinology* 140:207-218
184. Silver R, LeSauter J, Tresco PA, Lehman MN 1996 A diffusible coupling signal from the transplanted suprachiasmatic nucleus controlling circadian locomotor rhythms. *Nature* 382:810-813
185. LeSauter J, Silver R 1998 Output signals of the SCN. *Chronobiol Int* 15:535-550

186. Legan SJ, Karsch FJ 1975 A daily signal for the LH surge in the rat. *Endocrinology* 96:57-62
187. Norman RL, Blake CA, Sawyer CH 1973 Estrogen-dependent 24-hour periodicity in pituitary LH release in the female hamster. *Endocrinology* 93:965-970
188. Boyar R, Finkelstein J, Roffwarg H, Kapen S, Weitzman E, Hellman L 1972 Synchronization of augmented luteinizing hormone secretion with sleep during puberty. *N Engl J Med* 287:582-586
189. Kapen S, Boyar RM, Finkelstein JW, Hellman L, Weitzman ED 1974 Effect of sleep-wake cycle reversal on luteinizing hormone secretory pattern in puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 39:293-299
190. Labyak S, Lava S, Turek F, Zee P 2002 Effects of shiftwork on sleep and menstrual function in nurses. *Health Care Women Int* 23:703-714
191. Scott AJ 2000 Shift work and health. *Prim Care* 27:1057-1079
192. Knutsson A 2003 Health disorders of shift workers. *Occup Med (Lond)* 53:103-108
193. Lohstroh PN, Chen J, Ba J, Ryan LM, Xu X, Overstreet JW, Lasley BL 2003 Bone resorption is affected by follicular phase length in female rotating shift workers. *Environ Health Perspect* 111:618-622
194. Abrahamson EE, Moore RY 2001 Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Res* 916:172-191
195. Moga MM, Moore RY 1997 Organization of neural inputs to the suprachiasmatic nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 389:508-534
196. Watts AG, Swanson LW 1987 Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: II. Studies using retrograde transport of fluorescent dyes and simultaneous peptide immunohistochemistry in the rat. *J Comp Neurol* 258:230-252
197. Palm IF, van der Beek EM, Swarts HJ, van der Vliet J, Wiegant VM, Buijs RM, Kalsbeek A 2001 Control of the estradiol-induced prolactin surge by the suprachiasmatic nucleus. *Endocrinology* 142:2296-2302
198. Funabashi T, Shinohara K, Mitsushima D, Kimura F 2000 Gonadotropin-releasing hormone exhibits circadian rhythm in phase with arginine-vasopressin in co-cultures of the female rat preoptic area and suprachiasmatic nucleus. *J Neuroendocrinol* 12:521-528
199. Van der Zee EA, Roman V, Ten Brinke O, Meerlo P 2005 TGF $\alpha$  and AVP in the mouse suprachiasmatic nucleus: anatomical relationship and daily profiles. *Brain Res* 1054:159-166
200. Kalsbeek A, Buijs RM, Engelmann M, Wotjak CT, Landgraf R 1995 In vivo measurement of a diurnal variation in vasopressin release in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 682:75-82
201. Christian CA, Moenter SM 2008 Vasoactive intestinal polypeptide can excite gonadotropin-releasing hormone neurons in a manner dependent on estradiol and gated by time of day. *Endocrinology* 149:3130-3136
202. Kalsbeek A, Buijs RM 2002 Output pathways of the mammalian suprachiasmatic nucleus: coding circadian time by transmitter selection and specific targeting. *Cell Tissue Res* 309:109-118
203. Harney JP, Scarbrough K, Rosewell KL, Wise PM 1996 In vivo antisense antagonism of vasoactive intestinal peptide in the suprachiasmatic nuclei causes aging-like changes in the estradiol-induced luteinizing hormone and prolactin surges. *Endocrinology* 137:3696-3701
204. Weick RF, Stobie KM 1992 Vasoactive intestinal peptide inhibits the steroid-induced LH surge in the ovariectomized rat. *J Endocrinol* 133:433-437
205. Takahashi Y, Okamura H, Yanaihara N, Hamada S, Fujita S, Ibata Y 1989 Vasoactive intestinal peptide immunoreactive neurons in the rat suprachiasmatic nucleus demonstrate diurnal variation. *Brain Res* 497:374-377
206. Yang J, Cagampang FR, Nakayama Y, Inouye SI 1993 Vasoactive intestinal polypeptide precursor mRNA exhibits diurnal variation in the rat suprachiasmatic nuclei. *Brain Res Mol Brain Res* 20:259-262

207. van der Beek EM, van Oudheusden HJ, Buijs RM, van der Donk HA, van den Hurk R, Wiegant VM 1994 Preferential induction of c-fos immunoreactivity in vasoactive intestinal polypeptide-innervated gonadotropin-releasing hormone neurons during a steroid-induced luteinizing hormone surge in the female rat. *Endocrinology* 134:2636-2644
208. van der Beek EM, Wiegant VM, van der Donk HA, van den Hurk R, Buijs RM 1993 Lesions of the suprachiasmatic nucleus indicate the presence of a direct vasoactive intestinal polypeptide-containing projection to gonadotrophin-releasing hormone neurons in the female rat. *J Neuroendocrinol* 5:137-144
209. Kriegsfeld LJ, Silver R, Gore AC, Crews D 2002 Vasoactive intestinal polypeptide contacts on gonadotropin-releasing hormone neurones increase following puberty in female rats. *J Neuroendocrinol* 14:685-690
210. Ward DR, Dear FM, Ward IA, Anderson SI, Spergel DJ, Smith PA, Ebling FJ 2009 Innervation of gonadotropin-releasing hormone neurons by peptidergic neurons conveying circadian or energy balance information in the mouse. *PLoS One* 4:e5322
211. Kalamatianos T, Kallo I, Goubillon ML, Coen CW 2004 Cellular expression of V1a vazopresszin receptor mRNA in the female rat preoptic area: effects of oestrogen. *J Neuroendocrinol* 16:525-533
212. Kallo I, Kalamatianos T, Wiltshire N, Shen S, Sheward WJ, Harmor AJ, Coen CW 2004 Transgenic approach reveals expression of the VPAC2 receptor in phenotypically defined neurons in the mouse suprachiasmatic nucleus and in its efferent target sites. *Eur J Neurosci* 19:2201-2211
213. Watson RE, Jr., Langub MC, Jr., Engle MG, Maley BE 1995 Estrogen-receptive neurons in the anteroventral periventricular nucleus are synaptic targets of the suprachiasmatic nucleus and peri-suprachiasmatic region. *Brain Res* 689:254-264
214. Kotani M, Dethoux M, Vandenbogaerde A, Communi D, Vanderwinden JM, Le Poul E, Brezillon S, Tyldesley R, Suarez-Huerta N, Vandeput F, Blanpain C, Schifffmann SN, Vassart G, Parmentier M 2001 The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem* 276:34631-34636
215. Lee DK, Nguyen T, O'Neill GP, Cheng R, Liu Y, Howard AD, Coulombe N, Tan CP, Tang-Nguyen AT, George SR, O'Dowd BF 1999 Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Lett* 446:103-107
216. Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Masuda Y, Ishibashi Y, Watanabe T, Asada M, Yamada T, Suenaga M, Kitada C, Usuki S, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Fujino M 2001 Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 411:613-617
217. Seminara SB, Messager S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS, Jr., Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwinf KM, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Kaiser UB, Slaugenhaupt SA, Gusella JF, O'Rahilly S, Carlton MB, Crowley WF, Jr., Aparicio SA, Colledge WH 2003 The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med* 349:1614-1627
218. Funes S, Hedrick JA, Vassileva G, Markowitz L, Abbondanzo S, Golovko A, Yang S, Monsma FJ, Gustafson EL 2003 The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochem Biophys Res Commun* 312:1357-1363
219. Teles MG, Bianco SD, Brito VN, Trarbach EB, Kuohung W, Xu S, Seminara SB, Mendonca BB, Kaiser UB, Latronico AC 2008 A GPR54-activating mutation in a patient with central precocious puberty. *N Engl J Med* 358:709-715
220. Messager S, Chatzidaki EE, Ma D, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Thresher RR, Malinge I, Lomet D, Carlton MB, Colledge WH, Caraty A, Aparicio SA 2005 Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:1761-1766

221. Adachi S, Yamada S, Takatsu Y, Matsui H, Kinoshita M, Takase K, Sugiura H, Ohtaki T, Matsumoto H, Uenoyama Y, Tsukamura H, Inoue K, Maeda K 2007 Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats. *J Reprod Dev* 53:367-378
222. Li XF, Kinsey-Jones JS, Cheng Y, Knox AM, Lin Y, Petrou NA, Roseweir A, Lightman SL, Milligan SR, Millar RP, O'Byrne KT 2009 Kisspeptin signalling in the hypothalamic arcuate nucleus regulates GnRH pulse generator frequency in the rat. *PLoS One* 4:e8334
223. Kinoshita M, Tsukamura H, Adachi S, Matsui H, Uenoyama Y, Iwata K, Yamada S, Inoue K, Ohtaki T, Matsumoto H, Maeda K 2005 Involvement of central metastin in the regulation of preovulatory luteinizing hormone surge and estrous cyclicity in female rats. *Endocrinology* 146:4431-4436
224. Smith JT, Cunningham MJ, Rissman EF, Clifton DK, Steiner RA 2005 Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology* 146:3686-3692
225. Dungan HM, Clifton DK, Steiner RA 2006 Minireview: kisspeptin neurons as central processors in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 147:1154-1158
226. Clarkson J, Herbison AE 2006 Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 147:5817-5825
227. Han SK, Gottsch ML, Lee KJ, Popa SM, Smith JT, Jakawich SK, Clifton DK, Steiner RA, Herbison AE 2005 Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J Neurosci* 25:11349-11356
228. Irwig MS, Fraley GS, Smith JT, Acohido BV, Popa SM, Cunningham MJ, Gottsch ML, Clifton DK, Steiner RA 2004 Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology* 80:264-272
229. Herbison AE, de Tassigny X, Doran J, Colledge WH 2010 Distribution and postnatal development of Gpr54 gene expression in mouse brain and gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 151:312-321
230. Dumalska I, Wu M, Morozova E, Liu R, van den Pol A, Alreja M 2008 Excitatory effects of the puberty-initiating peptide kisspeptin and group I metabotropic glutamate receptor agonists differentiate two distinct subpopulations of gonadotropin-releasing hormone neurons. *J Neurosci* 28:8003-8013
231. Moenter SM 2010 Identified GnRH neuron electrophysiology: a decade of study. *Brain Res* 1364:10-24
232. Cravo RM, Margatho LO, Osborne-Lawrence S, Donato J, Jr., Atkin S, Bookout AL, Rovinsky S, Frazao R, Lee CE, Gautron L, Zigman JM, Elias CF 2011 Characterization of Kiss1 neurons using transgenic mouse models. *Neuroscience* 173:37-56
233. Burke MC, Letts PA, Krajewski SJ, Rance NE 2006 Coexpression of dynorphin and neurokinin B immunoreactivity in the rat hypothalamus: Morphologic evidence of interrelated function within the arcuate nucleus. *J Comp Neurol* 498:712-726
234. Goodman RL, Lehman MN, Smith JT, Coolen LM, de Oliveira CV, Jafarzadehshirazi MR, Pereira A, Iqbal J, Caraty A, Ciofi P, Clarke IJ 2007 Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. *Endocrinology* 148:5752-5760
235. Pielecka-Fortuna J, Chu Z, Moenter SM 2008 Kisspeptin acts directly and indirectly to increase gonadotropin-releasing hormone neuron activity and its effects are modulated by estradiol. *Endocrinology* 149:1979-1986



236. Todman MG, Han SK, Herbison AE 2005 Profiling neurotransmitter receptor expression in mouse gonadotropin-releasing hormone neurons using green fluorescent protein-promoter transgenics and microarrays. *Neuroscience* 132:703-712
237. Peters EE, Towler KL, Mason DR, Evans JJ 2009 Effects of galanin and leptin on gonadotropin-releasing hormone-stimulated luteinizing hormone release from the pituitary. *Neuroendocrinology* 89:18-26
238. Splett CL, Scheffen JR, Desotelle JA, Plamann V, Bauer-Dantoin AC 2003 Galanin enhancement of gonadotropin-releasing hormone-stimulated luteinizing hormone secretion in female rats is estrogen dependent. *Endocrinology* 144:484-490
239. Gajewska A, Zwierchowski L, Kochman K 2004 Stimulation of luteinizing hormone subunit gene expression by pulsatile intracerebroventricular microinjection of galanin in female rats. *J Neuroendocrinol* 16:558-565
240. Mitchell V, Bouret S, Howard AD, Beauvillain JC 1999 Expression of the galanin receptor subtype Gal-R2 mRNA in the rat hypothalamus. *J Chem Neuroanat* 16:265-277
241. Dufourny L, Skinner DC 2005 Distribution of galanin receptor 1-immunoreactive neurons in the ovine hypothalamus: colocalization with GnRH. *Brain Res* 1054:73-81
242. Mellon PL, Windle JJ, Goldsmith PC, Padula CA, Roberts JL, Weiner RI 1990 Immortalization of hypothalamic GnRH neurons by genetically targeted tumorigenesis. *Neuron* 5:1-10
243. Stauffer SR, Coletta CJ, Tedesco R, Nishiguchi G, Carlson K, Sun J, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA 2000 Pyrazole ligands: structure-affinity/activity relationships and estrogen receptor-alpha-selective agonists. *J Med Chem* 43:4934-4947
244. Meyers MJ, Sun J, Carlson KE, Marriner GA, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA 2001 Estrogen receptor-beta potency-selective ligands: structure-activity relationship studies of diarylpropionitriles and their acetylene and polar analogues. *J Med Chem* 44:4230-4251
245. Wise PM, Dubal DB, Wilson ME, Rau SW, Bottner M 2001 Minireview: neuroprotective effects of estrogen-new insights into mechanisms of action. *Endocrinology* 142:969-973
246. Duchon MR 2004 Roles of mitochondria in health and disease. *Diabetes* 53 Suppl 1:S96-102
247. Cohen PE, Milligan SR 1993 Silastic implants for delivery of oestradiol to mice. *J Reprod Fertil* 99:219-223
248. Brown TJ, Naftolin F, Maclusky NJ 1992 Sex differences in estrogen receptor binding in the rat hypothalamus: effects of subsaturating pulses of estradiol. *Brain Res* 578:129-134
249. Molnar CS, Kallo I, Liposits Z, Hrabovszky E 2011 Estradiol down-regulates RF-amide-related peptide (RFRP) expression in the mouse hypothalamus. *Endocrinology* 152:1684-1690
250. Zarnani AH, Moazzeni SM, Shokri F, Salehnia M, Jeddi Tehrani M 2006 Analysis of endometrial myeloid and lymphoid dendritic cells during mouse estrous cycle. *J Reprod Immunol* 71:28-40
251. Maguire JL, Stell BM, Rafizadeh M, Mody I 2005 Ovarian cycle-linked changes in GABA(A) receptors mediating tonic inhibition alter seizure susceptibility and anxiety. *Nat Neurosci* 8:797-804
252. Gerfen CR, Sawchenko PE 1984 An anterograde neuroanatomical tracing method that shows the detailed morphology of neurons, their axons and terminals: immunohistochemical localization of an axonally transported plant lectin, Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L). *Brain Res* 290:219-238
253. Paxinos G, Franklin KBJ 2001 *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. second ed. San Diego: Academic Press
254. Wang JF, Spitzer JJ 1997 Alcohol-induced thymocyte apoptosis is accompanied by impaired mitochondrial function. *Alcohol* 14:99-105

255. Mitchell P, Moyle J 1967 Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation. *Nature* 213:137-139
256. Norenberg MD, Rao KV 2007 The mitochondrial permeability transition in neurologic disease. *Neurochem Int* 50:983-997
257. Petit PX, Lecoq H, Zorn E, Dauguet C, Mignotte B, Gougeon ML 1995 Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. *J Cell Biol* 130:157-167
258. Liposits Z, Setalo G, Flerko B 1984 Application of the silver-gold intensified 3,3'-diaminobenzidine chromogen to the light and electron microscopic detection of the luteinizing hormone-releasing hormone system of the rat brain. *Neuroscience* 13:513-525
259. Hrabovszky E, Kallo I, Steinhäuser A, Merchenthaler I, Coen CW, Petersen SL, Liposits Z 2004 Estrogen receptor-beta in oxytocin and vasopressin neurons of the rat and human hypothalamus: Immunocytochemical and in situ hybridization studies. *J Comp Neurol* 473:315-333
260. Ben-Barak Y, Russell JT, Whitnall MH, Ozato K, Gainer H 1985 Neurophysin in the hypothalamo-neurohypophysial system. I. Production and characterization of monoclonal antibodies. *J Neurosci* 5:81-97
261. Ichikawa H, Sugimoto T 2003 Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-immunoreactive nerve fibers in rat and human tooth pulps. *Brain Res* 980:288-292
262. Lopez FJ, Meade EH, Jr., Negro-Vilar A 1993 Endogenous galanin modulates the gonadotropin and prolactin proestrous surges in the rat. *Endocrinology* 132:795-800
263. Franceschini I, Lomet D, Cateau M, Delsol G, Tillet Y, Caraty A 2006 Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express estrogen receptor alpha. *Neurosci Lett* 401:225-230
264. Ciofi P, Krause JE, Prins GS, Mazzuca M 1994 Presence of nuclear androgen receptor-like immunoreactivity in neurokinin B-containing neurons of the hypothalamic arcuate nucleus of the adult male rat. *Neurosci Lett* 182:193-196
265. Silversides DW, Murphy BD, Misra V, Mapletoft RJ 1985 Monoclonal antibodies against LHRH: development and immunoactivity in vivo and in vitro. *J Reprod Immunol* 7:171-184
266. Dhillo WS, Chaudhri OB, Patterson M, Thompson EL, Murphy KG, Badman MK, McGowan BM, Amber V, Patel S, Ghatei MA, Bloom SR 2005 Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. *J Clin Endocrinol Metab* 90:6609-6615
267. Mihaly E, Fekete C, Lechan RM, Liposits Z 2002 Corticotropin-releasing hormone-synthesizing neurons of the human hypothalamus receive neuropeptide Y-immunoreactive innervation from neurons residing primarily outside the infundibular nucleus. *J Comp Neurol* 446:235-243
268. Stevenson JC 2000 Cardiovascular effects of oestrogens. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 74:387-393
269. Sherwin BB 1999 Can estrogen keep you smart? Evidence from clinical studies. *J Psychiatry Neurosci* 24:315-321
270. Compston JE 2001 Sex steroids and bone. *Physiol Rev* 81:419-447
271. Ahmed SA, Hissong BD, Verthelyi D, Donner K, Becker K, Karpuzoglu-Sahin E 1999 Gender and risk of autoimmune diseases: possible role of estrogenic compounds. *Environmental health perspectives* 107 Suppl 5:681-686
272. Goodenough S, Schleusner D, Pietrzik C, Skutella T, Behl C 2005 Glycogen synthase kinase 3beta links neuroprotection by 17beta-estradiol to key Alzheimer processes. *Neuroscience* 132:581-589
273. Liu M, Kelley MH, Herson PS, Hurn PD 2010 Neuroprotection of sex steroids. *Minerva Endocrinol* 35:127-143
274. Biewenga E, Cabell L, Audesirk T 2005 Estradiol and raloxifene protect cultured SN4741 neurons against oxidative stress. *Neurosci Lett* 373:179-183

275. Manthey D, Behl C 2006 From structural biochemistry to expression profiling: neuroprotective activities of estrogen. *Neuroscience* 138:845-850
276. Simpkins JW, Dykens JA 2008 Mitochondrial mechanisms of estrogen neuroprotection. *Brain Res Rev* 57:421-430
277. Nilsen J, Brinton RD 2004 Mitochondria as therapeutic targets of estrogen action in the central nervous system. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 3:297-313
278. Chen J, Delannoy M, Odwin S, He P, Trush MA, Yager JD 2003 Enhanced mitochondrial gene transcript, ATP, bcl-2 protein levels, and altered glutathione distribution in ethinyl estradiol-treated cultured female rat hepatocytes. *Toxicol Sci* 75:271-278
279. Chiueh C, Lee S, Andoh T, Murphy D 2003 Induction of antioxidative and antiapoptotic thioredoxin supports neuroprotective hypothesis of estrogen. *Endocrine* 21:27-31
280. Schmidt AJ, Krieg JC, Vedder H 2002 Differential effects of glucocorticoids and gonadal steroids on glutathione levels in neuronal and glial cell systems. *J Neurosci Res* 67:544-550
281. Zhao L, Wu TW, Brinton RD 2004 Estrogen receptor subtypes alpha and beta contribute to neuroprotection and increased Bcl-2 expression in primary hippocampal neurons. *Brain Res* 1010:22-34
282. Dubal DB, Zhu H, Yu J, Rau SW, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Kindy MS, Wise PM 2001 Estrogen receptor alpha, not beta, is a critical link in estradiol-mediated protection against brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:1952-1957
283. Wang L, Andersson S, Warner M, Gustafsson JA 2001 Morphological abnormalities in the brains of estrogen receptor beta knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:2792-2796
284. Rauhala P, Chiueh CC 2000 Effects of atypical antioxidative agents, S-nitrosoglutathione and manganese, on brain lipid peroxidation induced by iron leaking from tissue disruption. *Ann N Y Acad Sci* 899:238-254
285. Green PS, Yang SH, Simpkins JW 2000 Neuroprotective effects of phenolic A ring oestrogens. *Novartis Found Symp* 230:202-213; discussion 213-220
286. Kim H, Bang OY, Jung MW, Ha SD, Hong HS, Huh K, Kim SU, Mook-Jung I 2001 Neuroprotective effects of estrogen against beta-amyloid toxicity are mediated by estrogen receptors in cultured neuronal cells. *Neurosci Lett* 302:58-62
287. Kuroki Y, Fukushima K, Kanda Y, Mizuno K, Watanabe Y 2001 Neuroprotection by estrogen via extracellular signal-regulated kinase against quinolinic acid-induced cell death in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 13:472-476
288. Berco M, Bhavnani BR 2001 Differential neuroprotective effects of equine estrogens against oxidized low density lipoprotein-induced neuronal cell death. *J Soc Gynecol Investig* 8:245-254
289. Hawkins V, Shen Q, Chiueh CC 1999 Kynostatin and 17beta-estradiol prevent the apoptotic death of human neuroblastoma cells exposed to HIV-1 protease. *J Biomed Sci* 6:433-438
290. Howard SA, Brooke SM, Sapolsky RM 2001 Mechanisms of estrogenic protection against gp120-induced neurotoxicity. *Exp Neurol* 168:385-391
291. Sawada H, Ibi M, Kihara T, Honda K, Nakamizo T, Kanki R, Nakanishi M, Sakka N, Akaike A, Shimohama S 2002 Estradiol protects dopaminergic neurons in a MPP+Parkinson's disease model. *Neuropharmacology* 42:1056-1064
292. Garcia MV, Cabezas JA, Perez-Gonzalez MN 1985 Effects of oestradiol, testosterone and medroxyprogesterone on subcellular fraction marker enzyme activities from rat liver and brain. *Comp Biochem Physiol B* 80:347-354
293. Tuquet C, Dupont J, Mesneau A, Roussaux J 2000 Effects of tamoxifen on the electron transport chain of isolated rat liver mitochondria. *Cell Biol Toxicol* 16:207-219

294. Kipp JL, Ramirez VD 2001 Effect of estradiol, diethylstilbestrol, and resveratrol on F0F1-ATPase activity from mitochondrial preparations of rat heart, liver, and brain. *Endocrine* 15:165-175
295. Zheng J, Ramirez VD 1999 Rapid inhibition of rat brain mitochondrial proton F0F1-ATPase activity by estrogens: comparison with Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> -ATPase of porcine cortex. *Eur J Pharmacol* 368:95-102
296. Thomas RD, Roy D 2001 Base sequence-specific attack of stilbene estrogen metabolite(s) on the mitochondrial DNA: implications in the induction of instability in the mitochondrial genome in the kidney of Syrian hamsters. *Int J Mol Med* 7:389-395
297. Hatzoglou E, Sekeris CE 1997 The detection of nucleotide sequences with strong similarity to hormone responsive elements in the genome of eubacteria and archaeobacteria and their possible relation to similar sequences present in the mitochondrial genome. *J Theor Biol* 184:339-344
298. Démonacos CV, Karayanni N, Hatzoglou E, Tsiriyiotis C, Spandidos DA, Sekeris CE 1996 Mitochondrial genes as sites of primary action of steroid hormones. *Steroids* 61:226-232
299. Sekeris CE 1990 The mitochondrial genome: a possible primary site of action of steroid hormones. *In Vivo* 4:317-320
300. Felty Q, Roy D 2005 Mitochondrial signals to nucleus regulate estrogen-induced cell growth. *Med Hypotheses* 64:133-141
301. Chen JQ, Delannoy M, Cooke C, Yager JD 2004 Mitochondrial localization of ERalpha and ERbeta in human MCF7 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286:E1011-1022
302. Lee SY, Andoh T, Murphy DL, Chiueh CC 2003 17beta-estradiol activates ICI 182,780-sensitive estrogen receptors and cyclic GMP-dependent thioredoxin expression for neuroprotection. *FASEB J* 17:947-948
303. Ivanova T, Kupperts E, Engele J, Beyer C 2001 Estrogen stimulates brain-derived neurotrophic factor expression in embryonic mouse midbrain neurons through a membrane-mediated and calcium-dependent mechanism. *J Neurosci Res* 66:221-230
304. Singleton JR, Randolph AE, Feldman EL 1996 Insulin-like growth factor I receptor prevents apoptosis and enhances neuroblastoma tumorigenesis. *Cancer Res* 56:4522-4529
305. Dubal DB, Shughrue PJ, Wilson ME, Merchenthaler I, Wise PM 1999 Estradiol modulates bcl-2 in cerebral ischemia: a potential role for estrogen receptors. *J Neurosci* 19:6385-6393
306. Stoltzner SE, Berchtold NC, Cotman CW, Pike CJ 2001 Estrogen regulates bcl-x expression in rat hippocampus. *Neuroreport* 12:2797-2800
307. Bruce-Keller AJ, Keeling JL, Keller JN, Huang FF, Camandola S, Mattson MP 2000 Antiinflammatory effects of estrogen on microglial activation. *Endocrinology* 141:3646-3656
308. Sawada H, Ibi M, Kihara T, Urushitani M, Honda K, Nakanishi M, Akaike A, Shimohama S 2000 Mechanisms of antiapoptotic effects of estrogens in nigral dopaminergic neurons. *FASEB J* 14:1202-1214
309. Paech K, Webb P, Kuiper GG, Nilsson S, Gustafsson J, Kushner PJ, Scanlan TS 1997 Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science* 277:1508-1510
310. Harms C, Lautenschlager M, Bergk A, Katchanov J, Freyer D, Kapinya K, Herwig U, Megow D, Dirnagl U, Weber JR, Hortnagl H 2001 Differential mechanisms of neuroprotection by 17 beta-estradiol in apoptotic versus necrotic neurodegeneration. *J Neurosci* 21:2600-2609
311. Miller BH, Olson SL, Turek FW, Levine JE, Horton TH, Takahashi JS 2004 Circadian clock mutation disrupts estrous cyclicity and maintenance of pregnancy. *Curr Biol* 14:1367-1373

312. Moline ML, Albers HE 1988 Response of circadian locomotor activity and the proestrous luteinizing hormone surge to phase shifts of the light-dark cycle in the hamster. *Physiol Behav* 43:435-440
313. Coen CW, MacKinnon PC 1980 Lesions of the suprachiasmatic nuclei and the serotonin-dependent phasic release of luteinizing hormone in the rat: effects on drinking rhythmicity and on the consequences of preoptic area stimulation. *J Endocrinol* 84:231-236
314. Miller MA, Kolb PE, Raskind MA 1993 Extra-hypothalamic vasopressin neurons coexpress galanin messenger RNA as shown by double in situ hybridization histochemistry. *J Comp Neurol* 329:378-384
315. Rokaeus A, Young WS, 3rd, Mezey E 1988 Galanin coexists with vasopressin in the normal rat hypothalamus and galanin's synthesis is increased in the Brattleboro (diabetes insipidus) rat. *Neurosci Lett* 90:45-50
316. Planas B, Kolb PE, Raskind MA, Miller MA 1995 Vasopressin and galanin mRNAs coexist in the nucleus of the horizontal diagonal band: a novel site of vasopressin gene expression. *J Comp Neurol* 361:48-56
317. Kalamatianos T, Kallo I, Piggins HD, Coen CW 2004 Expression of VIP and/or PACAP receptor mRNA in peptide synthesizing cells within the suprachiasmatic nucleus of the rat and in its efferent target sites. *J Comp Neurol* 475:19-35
318. Hannibal J 2002 Pituitary adenylate cyclase-activating peptide in the rat central nervous system: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 453:389-417
319. Robertson JL, Clifton DK, de la Iglesia HO, Steiner RA, Kauffman AS 2009 Circadian regulation of Kiss1 neurons: implications for timing the proovulatory gonadotropin-releasing hormone/luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 150:3664-3671
320. Kurunczi A, Hoyk Z, Csakvari E, Gyenes A, Parducz A 2009 17beta-Estradiol-induced remodeling of GABAergic axo-somatic synapses on estrogen receptor expressing neurons in the anteroventral periventricular nucleus of adult female rats. *Neuroscience* 158:553-557
321. Gerrits PO, Kortekaas R, Veening JG, de Weerd H, Algra A, Mouton LJ, van der Want JJ 2008 Estrous cycle-dependent neural plasticity in the caudal brainstem in the female golden hamster: ultrastructural and immunocytochemical studies of axo-dendritic relationships and dynamic remodeling. *Horm Behav* 54:627-639
322. Vida B, Hrabovszky E, Kalamatianos T, Coen CW, Liposits Z, Kallo I 2008 Oestrogen receptor alpha and beta immunoreactive cells in the suprachiasmatic nucleus of mice: distribution, sex differences and regulation by gonadal hormones. *J Neuroendocrinol* 20:1270-1277
323. Clarkson J, Herbison AE 2011 Dual phenotype kisspeptin-dopamine neurones of the rostral periventricular area of the third ventricle project to gonadotrophin-releasing hormone neurones. *J Neuroendocrinol* 23:293-301
324. Vida B, Deli L, Hrabovszky E, Kalamatianos T, Caraty A, Coen CW, Liposits Z, Kallo I 2010 Evidence for suprachiasmatic vasopressin neurones innervating kisspeptin neurones in the rostral periventricular area of the mouse brain: regulation by oestrogen. *J Neuroendocrinol* 22:1032-1039
325. Williams WP, 3rd, Jarjisian SG, Mikkelsen JD, Kriegsfeld LJ 2011 Circadian control of kisspeptin and a gated GnRH response mediate the proovulatory luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 152:595-606
326. Ducret E, Gaidamaka G, Herbison AE 2010 Electrical and morphological characteristics of anteroventral periventricular nucleus kisspeptin and other neurons in the female mouse. *Endocrinology* 151:2223-2232
327. Belenky MA, Yarom Y, Pickard GE 2008 Heterogeneous expression of gamma-aminobutyric acid and gamma-aminobutyric acid-associated receptors and transporters in the rat suprachiasmatic nucleus. *J Comp Neurol* 506:708-732

328. Miklos IH, Kovacs KJ 2002 GABAergic innervation of corticotropin-releasing hormone (CRH)-secreting parvocellular neurons and its plasticity as demonstrated by quantitative immunoelectron microscopy. *Neuroscience* 113:581-592
329. Kauffman AS, Navarro VM, Kim J, Clifton D, Steiner RA 2009 Sex Differences in the Regulation of Kiss1/NKB Neurons in Juvenile Mice: Implications for the Timing of Puberty. *Am J Physiol Endocrinol Metab*
330. Rance NE 2009 Menopause and the human hypothalamus: evidence for the role of kisspeptin/neurokinin B neurons in the regulation of estrogen negative feedback. *Peptides* 30:111-122
331. Yeo SH, Herbison AE 2011 Projections of arcuate nucleus and rostral periventricular kisspeptin neurons in the adult female mouse brain. *Endocrinology* 152:2387-2399
332. Krajewski SJ, Burke MC, Anderson MJ, McMullen NT, Rance NE 2010 Forebrain projections of arcuate neurokinin B neurons demonstrated by anterograde tract-tracing and monosodium glutamate lesions in the rat. *Neuroscience* 166:680-697
333. True C, Kirigiti M, Ciofi P, Grove KL, Smith MS 2011 Characterisation of arcuate nucleus kisspeptin/neurokinin B neuronal projections and regulation during lactation in the rat. *J Neuroendocrinol* 23:52-64
334. Ludwig M, Pittman QJ 2003 Talking back: dendritic neurotransmitter release. *Trends Neurosci* 26:255-261
335. Liposits Z, Reid JJ, Negro-Vilar A, Merchenthaler I 1995 Sexual dimorphism in copackaging of luteinizing hormone-releasing hormone and galanin into neurosecretory vesicles of hypophysiotrophic neurons: estrogen dependency. *Endocrinology* 136:1987-1992
336. d'Anglemont de Tassigny X, Fagg LA, Carlton MB, Colledge WH 2008 Kisspeptin can stimulate gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release by a direct action at GnRH nerve terminals. *Endocrinology* 149:3926-3932
337. Ramaswamy S, Guerriero KA, Gibbs RB, Plant TM 2008 Structural interactions between kisspeptin and GnRH neurons in the mediobasal hypothalamus of the male rhesus monkey (*Macaca mulatta*) as revealed by double immunofluorescence and confocal microscopy. *Endocrinology* 149:4387-4395
338. Ohkura S, Takase K, Matsuyama S, Mogi K, Ichimaru T, Wakabayashi Y, Uenoyama Y, Mori Y, Steiner RA, Tsukamura H, Maeda KI, Okamura H 2009 Gonadotrophin-releasing hormone pulse generator activity in the hypothalamus of the goat. *J Neuroendocrinol* 21:813-821
339. Pompolo S, Pereira A, Estrada KM, Clarke IJ 2006 Colocalization of kisspeptin and gonadotropin-releasing hormone in the ovine brain. *Endocrinology* 147:804-810
340. Cortes R, Ceccatelli S, Schalling M, Hokfelt T 1990 Differential effects of intracerebroventricular colchicine administration on the expression of mRNAs for neuropeptides and neurotransmitter enzymes, with special emphasis on galanin: an in situ hybridization study. *Synapse* 6:369-391
341. Mitchell V, Bouret S, Prevot V, Jennes L, Beauvillain JC 1999 Evidence for expression of galanin receptor Gal-R1 mRNA in certain gonadotropin releasing hormone neurones of the rostral preoptic area. *J Neuroendocrinol* 11:805-812
342. de Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E 2003 Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KISS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10972-10976
343. Semple RK, Achermann JC, Ellery J, Farooqi IS, Karet FE, Stanhope RG, O'Rahilly S, Aparicio SA 2005 Two novel missense mutations in g protein-coupled receptor 54 in a patient with hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 90:1849-1855
344. Clarkson J, d'Anglemont de Tassigny X, Colledge WH, Caraty A, Herbison AE 2009 Distribution of kisspeptin neurones in the adult female mouse brain. *J Neuroendocrinol* 21:673-682
345. Dhillon WS, Chaudhri OB, Thompson EL, Murphy KG, Patterson M, Ramachandran R, Nijher GK, Amber V, Kokkinos A, Donaldson M, Ghatei MA, Bloom SR 2007

- Kisspeptin-54 stimulates gonadotropin release most potently during the preovulatory phase of the menstrual cycle in women. *J Clin Endocrinol Metab* 92:3958-3966
346. Smith JT, Rao A, Pereira A, Caraty A, Millar RP, Clarke IJ 2008 Kisspeptin is present in ovine hypophysial portal blood but does not increase during the preovulatory luteinizing hormone surge: evidence that gonadotropes are not direct targets of kisspeptin in vivo. *Endocrinology* 149:1951-1959
  347. Rometo AM, Krajewski SJ, Voytko ML, Rance NE 2007 Hypertrophy and increased kisspeptin gene expression in the hypothalamic infundibular nucleus of postmenopausal women and ovariectomized monkeys. *J Clin Endocrinol Metab* 92:2744-2750
  348. Gottsch ML, Cunningham MJ, Smith JT, Popa SM, Acohido BV, Crowley WF, Seminara S, Clifton DK, Steiner RA 2004 A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology* 145:4073-4077
  349. Kauffman AS, Gottsch ML, Roa J, Byquist AC, Crown A, Clifton DK, Hoffman GE, Steiner RA, Tena-Sempere M 2007 Sexual differentiation of Kiss1 gene expression in the brain of the rat. *Endocrinology* 148:1774-1783
  350. Cheng G, Coolen LM, Padmanabhan V, Goodman RL, Lehman MN 2010 The kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cell population of the arcuate nucleus: sex differences and effects of prenatal testosterone in sheep. *Endocrinology* 151:301-311
  351. Tena-Sempere M Kisspeptin/GPR54 system as potential target for endocrine disruption of reproductive development and function. *Int J Androl* 33:360-368
  352. Smith JT, Coolen LM, Kriegsfeld LJ, Sari IP, Jaafarzadehshirazi MR, Maltby M, Bateman K, Goodman RL, Tilbrook AJ, Ubuka T, Bentley GE, Clarke IJ, Lehman MN 2008 Variation in kisspeptin and RFamide-related peptide (RFRP) expression and terminal connections to gonadotropin-releasing hormone neurons in the brain: a novel medium for seasonal breeding in the sheep. *Endocrinology* 149:5770-5782
  353. Matsui H, Takatsu Y, Kumano S, Matsumoto H, Ohtaki T 2004 Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 320:383-388
  354. Mikkelsen JD, Bentsen AH, Ansel L, Simonneaux V, Juul A 2009 Comparison of the effects of peripherally administered kisspeptins. *Regul Pept* 152:95-100
  355. Uenoyama Y, Inoue N, Pheng V, Homma T, Takase K, Yamada S, Ajiki K, Ichikawa M, Okamura H, Maeda KI, Tsukamura H 2011 Ultrastructural evidence of kisspeptin-gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) interaction in the median eminence of female rats: implication of axo-axonal regulation of GnRH release. *J Neuroendocrinol* 23:863-870
  356. Krajewski SJ, Anderson MJ, Iles-Shih L, Chen KJ, Urbanski HF, Rance NE 2005 Morphologic evidence that neurokinin B modulates gonadotropin-releasing hormone secretion via neurokinin 3 receptors in the rat median eminence. *J Comp Neurol* 489:372-386
  357. Ciofi P, Leroy D, Tramu G 2006 Sexual dimorphism in the organization of the rat hypothalamic infundibular area. *Neuroscience* 141:1731-1745
  358. Guran T, Tolhurst G, Bereket A, Rocha N, Porter K, Turan S, Gribble FM, Kotan LD, Akcay T, Atay Z, Canan H, Serin A, O'Rahilly S, Reimann F, Semple RK, Topaloglu AK 2009 Hypogonadotropic hypogonadism due to a novel missense mutation in the first extracellular loop of the neurokinin B receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 94:3633-3639
  359. Topaloglu AK, Reimann F, Guclu M, Yalin AS, Kotan LD, Porter KM, Serin A, Mungan NO, Cook JR, Ozbek MN, Imamoglu S, Akalin NS, Yuksel B, O'Rahilly S, Semple RK 2009 TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction. *Nat Genet* 41:354-358