

**Ösztradiol által kiváltott szinaptikus
átrendeződés mechanizmusának vizsgálata
patkány nucleus arcuatus-ban**

Hoyk Zsófia

Szegedi Tudományegyetem Természettudományi Kar
neurobiológia doktori program

Témavezetők: **Dr. Dionysia Theodosis**
Neurobiologie Morphofonctionnelle
INSERM U.378
Institut François Magendie, Bordeaux

Dr. Párducz Árpád
Molekuláris Neurobiológiai Csoport
MTA SZBK, Biofizikai Intézet, Szeged

SZEGED, 2000

TARTALOMJEGYZÉK

Bevezetés és célkitűzések	1
Irodalmi áttekintés	4
I. A sejtadhéziós molekulákról általában	4
1. A Ca ²⁺ -függő sejtadhéziós molekulák	4
2. A Ca ²⁺ -független sejtadhéziós molekulák	6
II. A neuronális sejtadhéziós molekula	6
1. A molekula szerkezete	6
2. Az NCAM előfordulása	9
3. A PSA-NCAM gyakorlati jelentősége	10
4. A PSA-NCAM szerepe a neuronális plaszticitásban	12
5. PSA-NCAM expresszió és az idegsejtek működése	15
Anyagok és módszerek	20
I. Kísérleti csoportok	20
II. Műtéti beavatkozások	21
1. Ovariectomia és ösztradiol kezelés	21
2. Endo-N injektálás	21
3. PSA-NCAM antitest in vivo laterális agykamrába juttatása	21
III. Fénymikroszkópos immunhisztokémia	22
IV. Elektronmikroszkópos vizsgálatok	22
V. Exo-endocitotikus aktivitás vizsgálata	23
VI. A szinapszisok számának meghatározása	23
VII. Elektrofiziológiai vizsgálatok	24



Eredmények	26
I. Az exo-endocitótikus aktivitás változása.....	26
II. A PSA-NCAM immunhisztokémiai reakció jellegzetességei	28
III. Az endo-N injektálás hatása.....	29
IV. A PSA-NCAM antitest oldalkamrába juttatásának következménye. 31	
V. A 17β-ösztradiol hatása az axo-dendritikus szinapszisok számára	35
VI. Az elektrofiziológiai vizsgálatok eredményei.....	38
Az eredmények megbeszélése.....	40
I. Membrán szintű változások	40
II. A PSA-NCAM és az ösztradiol hatás közti összefüggés	41
III. A PSA-NCAM permisszív szerepe a neuronális plaszticitásban	44
IV. Ösztradiol által kiváltott finomszerkezeti átrendeződések	44
V. Az ösztradiol lehetséges hatásmechanizmusa	46
Kísérleteink eredményeinek rövid összegzése	48
Irodalmi hivatkozások	49
Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények és előadások.....	59
Az értekezés témájához nem kapcsolódó közlemények és előadások	60
Köszönetnyilvánítás	61
A disszertáció összefoglalása	62
Summary	67

BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A külső és belső környezetből érkező változatos fizikai és kémiai jeleket - fényt, hangot, hőmérsékletet, izmok összehúzódását és elemyedését, szagokat, ízeket, hormonokat, ingerületátvivő anyagokat - a gerincesek idegrendszerét alkotó több millió neuron érzékeli, feldolgozza és reagál rá. Ennek alapfeltétele az idegrendszer magasfokú szervezettsége, a rugalmas alkalmazkodásra képes kapcsolat a különböző funkciójú struktúrák között, melyet a sejtek közti szabályozott kommunikáció biztosít.

Az embrionális fejlődés során kialakuló idegsejt hálózat tehát nem merev szerkezet, hanem az egész élet folyamán a környezeti hatásoknak megfelelően változó rendszer. Ez a szerkezeti átrendeződésre való képesség a neuronális plaszticitás. A finomszerkezeti változások az idegrendszert alkotó neuronok és gliasejtek morfológiai átalakulásában nyilvánulnak meg: eltérő lehet pl. az idegsejtek nyúlványainak kiterjedése, a dendrituskék száma, a glia alakja, mindennek következtében a neuronok és gliasejtek közti érintkező felület mérete és jellege. Mindez alapvetően befolyásolja a szinaptikus hálózat szerveződését, mely a működés szempontjából a sejtek közti kommunikációt érinti, azaz az információ terjedése is módosulhat.

Az embrionális fejlődés során nem meglepő, hogy az idegsejtek közti kapcsolatok folyamatosan változnak, hiszen ebben az időszakban alakulnak ki az idegpályák, a főbb működési egységek, tehát a növekvő axonok termináljai ekkor találják meg célsejtjeiket. Érdekes módon azonban az embrió idegrendszerére általánosan jellemző folyamatok nem tűnnek el teljesen az egyedfejlődés során: a felnőtt idegrendszernek bizonyos kiűntetett területein kimutattak olyan, korábban kizárólag az embrióra specifikusnak tartott jellegzetességeket, mint a sejtosztódást és vándorlást, a radiális glia jelenlétét, a sejtek

felszínén pedig egy különleges glikoprotein, a hosszú polisziálsavat hordozó neuronális sejtadhéziós molekula expresszióját. A sejt felszíni molekulák szerepe a neuronális plaszticitás mechanizmusa szempontjából különösen lényegesnek tűnik, mivel a szinaptikus átrendeződés egyben membrán-membrán kapcsolatok átalakulását is jelenti, továbbá figyelemre méltó a korreláció az idegrendszer különböző területeinek plaszticitásra való képessége és a hosszú polisziálsavval jellemezhető neuronális sejtadhéziós molekula előfordulása között.

Kísérleteink a plasztikus változások lezajlásának módjára, ezen belül a nagy polisziálsav tartalmú neuronális sejtadhéziós molekula funkciójának megértésére irányultak. Ezt a célt szem előtt tartva egy olyan modell rendszert kerestünk, mely megfelel a következő kritériumoknak: egyrészt expresszálódik benne az említett neuronális sejtadhéziós molekula, másrészt fiziológias körülmények között plasztikus átrendeződés jellemzi, és ez az átalakulás kísérletes, kontrollált körülmények között megbízhatóan reprodukálható. Ennek alapján a hipotalamuszban található nucleus arcuatus-t választottuk modellül, mert ezen a területen a neuronális sejtadhéziós molekulának az embrióra általánosan jellemző formája felnőtt állatban is jelen van, ugyanakkor érvényesül a másik kritérium is: fiziológias körülmények között az ösztadiol koncentráció függvényében ciklikusan változik az axo-szomatikus szinapszisok száma, mely kísérletesen is előidézhető, ha ovariektomizált nőstény patkányokat ösztadiollal kezelünk. A disszertációban összefoglalt valamennyi kísérletünket ezen a jól kézben tartható modell rendszeren végeztük.

Annak érdekében, hogy a neuronális plaszticitás egy lehetséges mechanizmusának finomszerkezeti és működésbeli vonatkozásait feltárjuk a rendelkezésünkre álló morfológiai és elektrofiziológiai módszerek segítségével, a dolgozatban ismertetett kísérletek elé a következő célokat tűztük ki:

1. megvizsgálni, hogy az ösztadiol hatására lejátszódó szinaptikus átrendeződést milyen membránszintű változások kísérik

2. kideríteni, hogy a hosszú poliszíálsav láncot hordozó neuronális sejtadhéziós molekula milyen szerepet tölt be az axo-szomatikus szinapszis szám változásban:
 - a) milyen következményekkel jár a poliszíálsav enzimátikus úton való eltávolítása
 - b) mi történik, ha a poliszíálsavhoz egy specifikus antitestet kapcsolva befolyásoljuk a sejtek közti adhéziót

3. megállapítani, hogy az ösztadiol által indukált szinapszis szám változás csak az axo-szomatikus szinapszisokat érinti-e, vagy az axo-dendritikus szinapszisok is részt vesznek-e a folyamatban

4. kimutatni, hogy a szinapszisok szintjén végbemenő átrendeződések hogyan befolyásolják az idegsejtek működését

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

I. A sejtdhéziós molekulákról általában

A biológiának olyan szerteágazó területei között, mint az embrionális fejlődés, a sejtjárárás, az idegrendszerben az axonális növekedés irányítása, tanulás és emlékezés, az immunválasz, a sérülést követő regeneráció, vagy a daganatok kialakulása, létezik egy alapvető fontosságú találkozási pont: a sejtek közti kommunikáció. Ebben a kölcsönhatásban nélkülözhetetlen szerepet játszanak a sejtek felszínére kinyúló glikoproteinek, az ún. sejtdhéziós molekulák. Hagyományosan két nagyobb csoportba sorolhatók attól függően, hogy hatásuk kifejtéséhez szükség van-e Ca^{2+} -ra:

1.) A Ca^{2+} -függő sejtdhéziós molekulákon belül szerkezet és funkció szempontjából a kadherineket ill. a szelektineket és integrineket különíthetők el.

1.1. A kadherineket felelősek elsősorban a sejtek közti erős adhézióért, mely a szövetek integritását biztosítja. Legrészletesebben a három legkorábban felfedezett kadherin, az epitél sejteken található E kadherin, a neuronok által expresszált N kadherin és a placentában levő P kadherin ismert. Folyamatosan írnak le újabb és újabb kadherineket, jelenleg közel egy tucatnyit említ a szakirodalom. Mindegyiket külön gén kódolja, de szerkezetük hasonló: mintegy 700-750 aminosavból álló transzmembrán glikoproteinek, melyek extracelluláris része öt doménre különül. Ebből három homológ és Ca^{2+} -kötő helyet tartalmaz. Extracelluláris Ca^{2+} hiányában a kadherineket drasztikus konformációváltáson mennek keresztül, melynek következtében a proteolitikus enzimek gyorsan lebontják őket. A kadherineketnek egyetlen transzmembrán régiójuk van. Az

intracelluláris domén egy másik fehérje család, a kateninek segítségével kapcsolódik a citoskeleton aktinjához. A kadherineket a szomszédos sejt felszínén levő ugyanolyan kadherinhez kötődnek, azaz homofil módon tapasztják össze a sejteket. Ennek a kötésnek az erőssége, illetve a kadherineket a citoskeletonhoz való kapcsolódása teszi lehetővé, hogy a sejtek összefüggő szövetet alkossanak (Shapiro, L. és munkatársai, 1995).

1.2. A szelektinek és integrinek az előbbi csoporttal ellentétben csak ideiglenes sejt-sejt kapcsolatokat alakítanak ki. Legismertebb a gyulladásban betöltött szerepük: ezeknek a molekuláknak a közreműködésével jutnak el a neutrofil granulociták a gyulladás helyére. Gyulladás esetén ugyanis az endotél sejt felszínén transzmembrán glikoproteinek jelennek meg, melyek közül a P szelektin a legjobban jellemzett. Az intracelluláris C-terminális domént, mely nem rögzül a citoskeletonhoz, egyetlen transzmembrán alfa hélix köti össze az extracelluláris N-terminális régióval, melynek legfontosabb része egy rendkívül konzervatív C típusú lektin domén. Ez ismeri fel a fehérvérsejt felszínén levő glikolipid vagy glikoprotein oligoszacharid egységét és Ca^{2+} jelenlétében heterofil módon egymáshoz kapcsolja az endotél sejtet és a neutrofil granulocitát. Ez a kötés éppen csak olyan erősségű, hogy a vérárammal a fehérvérsejtek irányítottan gördülhessenek a gyulladás helye felé, ahol már a szelektinek helyett integrinek expresszálódnak, lehetővé téve, hogy a granulociták átjussanak az ér falán. Az integrinek a szelektinekhez hasonlóan Ca^{2+} -függő heterofil kötést alakítanak ki, de nem oligoszacharidokat ismernek fel, hanem az immunglobulin szupercsaládba tartozó sejt felszíni molekulákat. További különbség, hogy az integrinek C-terminális része kapcsolódik a citoskeleton intermedier filamentumaihoz, vagyis a kadherinekhöz hasonló erősebb kötést hoznak létre. Az

integrinek nemcsak sejt-sejt kapcsolatokban, hanem a sejteknek az extracelluláris mátrixhoz való kötésében is részt vesznek (Rosen, S.D. és munkatársai, 1994).

2.) A Ca^{2+} -független kötést kialakító sejtadhéziós molekulák szerkezetük alapján az **immunglobulin szupercsaládba** tartoznak, mivel legalább egy immunglobulin domént tartalmaznak. Számos molekulában megtalálhatóak a III típusú fibronectin ismétlődő szekvenciák is. Homofil és heterofil kötés kialakítására egyaránt képesek. Legismertebb képviselőjük a **neuronális sejtadhéziós molekula (neural cell adhesion molecule, NCAM)**, melynek extracelluláris N-terminális régiója öt immunglobulin és két III típusú fibronectin domént tartalmaz.

II. A neuronális sejtadhéziós molekula

1. A molekula szerkezete

Az NCAM molekulát Gerald Edelman és munkatársai fedezték fel az 1970-es években. A fehérje részt egyetlen gén kódolja, mely emberben a 11. (Nguyen, C. és munkatársai, 1986), egérben pedig a 9. kromoszómán található (D'Eustachio, P. és munkatársai, 1985).

Az NCAM fehérje expressziójának szabályozásában részt vesz a tiroxin, mivel az NCAM nagyobb mennyiségben termelődik tiroxin (T3) hiány esetén (Iglesias, T. és munkatársai, 1996). Ezen kívül a transzformáló növekedési faktor $\beta 1$ és $\beta 2$ szintén szerepet játszhat a fehérje transzkripciós szabályozásában (Satoh, M. és munkatársai, 1995). A génről alternatív "splicing" révén három főbb izoforma, egy 120 kD, egy 140 kD és egy 180 kD molekulásúlyú fehérje íródik át. Ezek a C-terminális régióban térnek el, az extracelluláris N-

terminális régió mindhárom formában megegyezik (Cunningham, B.A. és munkatársai, 1987; Cunningham, B.A. 1995). Az NCAM 180 molekulának igen nagy citoplazmatikus doménje van. Feltehetően ez az izoforma stabilizálja a sejt-sejt kapcsolatokat és a nem osztódó idegsejteken expresszálódik (Pollerberg, E.G. és munkatársai, 1987; Becker, C.G. és munkatársai, 1993; Paz, D.A. és munkatársai, 1995). A 140 kD-os forma a membrán síkjában elmozdulhat, intracelluláris doménje a 180 kD-os formáénál kisebb (Pollerberg, E.G. és munkatársai, 1986). A 120 kD-os NCAM molekulának nincs intracelluláris doménje, egy glikozil-foszfátidil csoporttal kapcsolódik a membránhoz (He, H.T. és munkatársai, 1987). Jelenleg a molekulának még egy, szintén alternatív "splicing" útján kialakuló variációja ismert: bizonyos sejteken az NCAM negyedik immunglobulin doménjén belül megjelenhet egy 30 bázispárból álló VASE nevű exon, mely növeli a sejtek adhézióját. Azok a sejtek, amelyek az NCAM ezen formáját expresszálják, hajlamosak aggregátumokat képezni, míg azok a sejtek, melyek felszínén a VASE-t nem tartalmazó NCAM jelenik meg, inkább szegregálódnak (Chen, A. és munkatársai, 1994).

A molekulának szinte valamennyi része hozzájárul a sejt-sejt kötés kialakításához, de a két, N-terminálison található III típusú fibronectin domén és az ötödik immunglobulin domén különösen fontos ebből a szempontból. A III típusú fibronectin doménekben az alternatív "splicing" következtében megjelenhet egy prolinban gazdag szekvencia, mely jelentősen befolyásolja a molekula adhézív tulajdonságait (Kasper, C. és munkatársai, 1996). A homofil kötésért elsősorban a harmadik immunglobulin doméneken belül egy tíz aminosavból álló szekvencia felelős (Sandig, M. és munkatársai, 1994; Rao, Y. és munkatársai, 1992). Az ötödik immunglobulin doméneken történik a poszttranszlációs modifikálások zöme (Crossin, K.L. és munkatársai, 1984). Ez lehet foszforilálás, szulfát- vagy mirisztil csoport hozzáadása (Regan, C.M., 1991), de a leginkább jellemző poszttranszlációs reakció egy, az élővilágban

viszonylag ritkán előforduló lineáris homopolimer, az α 2,8-kötésű polisziálsav hozzákapcsolása az NCAM ötödik immunglobulin doménjéhez (Finne, J. és munkatársai, 1983). Az α 2,8-as kötésű sziaálsav ritka, mivel az esetek többségében egyetlen, α 2,3 vagy α 2,6 kötéssel galaktozil csoportokhoz kapcsolódó N-acetil-neuraminsav található a szénhidrátok nem redukáló végén. Az α 2,8 kötésű polisziálsav a magasabbrendű élő szervezetekben két fehérjén található meg: a Na-csatorna α alegységén és az NCAM molekulán (Rougon, G. és munkatársai, 1986; Zuber, C. és munkatársai, 1992). Az NCAM poliszialilálását aktivált citidin monofoszfát – sziaálsav egységekből kiindulva a poliszialil transzferáz végzi (Mühlenhoff, M. és munkatársai, 1996). Az enzimet egérben, hörcsögben, emberben és legutóbb patkányban (Wood, G.K. és munkatársai, 1997) klónozták meg. Jelenleg két poliszialil transzferázt különítenek el: ST8Sia II-öt és ST8Sia IV-et. Az ST8Sia II elsősorban embrióban termelődik, mennyisége jelentősen csökken a születés után. Ez a forma valószínűleg megegyezik a korábban szialiltranszferáz X (STX) néven ismert enzimmel. Az ST8Sia IV, más néven PST, szintén megtalálható az embrióban, de az előbbivel ellentétben ennek expressziója a felnőtt agyban is fennmarad (Hildebrandt, H. és munkatársai, 1998; Ong, E. és munkatársai, 1998). A polisziálsav megjelenése az NCAM fehérjén a poliszialiltranszferáz transzkripció szintjén szabályozódik (Hildebrandt, H. és munkatársai, 1998). Ennek megfelelően felnőtt agyban főleg azokon a területeken mutatták ki a PST/ST8sia IV mRNS-t, ahol állandó szinaptikus átrendeződés történik, így pl. a hipokampuszban és a szaglőrendszerben (Phillips, G.R. és munkatársai, 1997). Azonban az in situ hibridizáció és az immunhisztokémia eredményei nem egyeznek meg teljesen, ezért feltehetően még további poliszialil transzferázok is léteznek (Hildebrandt, H. és munkatársai, 1998). A polisziálsav fehérjéhez kapcsolása egérben a 11. embrionális napon kezdődik, a poliszialil transzferáz aktivitása a 11. és 15. nap között a legnagyobb. Amennyiben már

korábban aktivizálódik az enzim, patológiás elváltozások következnek be (Neale, S.A. és munkatársai, 1994). A polisziálil transzferáz működésének előfeltétele egy autofoszforilációs lépés (Mühlenhoff, M. és munkatársai, 1996).

Az NCAM fehérjén levő polisziálsav különböző hosszúságú lehet: embrióban a molekula össztömegének mintegy 30%-át teszi ki a polisziálsav (polysialic acid, PSA) rész, ezért az embrionális NCAM molekulát PSA-NCAM-nak is nevezik. A felnőttre jellemző forma viszont csak 10% polisziálsavat tartalmaz. Az embrionális forma a születést követő első három hétben elveszti polisziálsav tartalmának nagy részét, azaz kialakul a felnőtt típusú NCAM molekula (Chuong, C.M. és Edelman, G.M. 1984).

A PSA jelentőségét az adja, hogy negatív töltése és nagy hidrátburokja révén a sejtek egymáshoz tapadását gyengíti. Ez különösen alacsony ionerősségű oldatban figyelhető meg, ahol a töltés és a hidratálás növeli a polimer méretét (Yang, P. és munkatársai, 1994). A PSA kétféleképpen tudja csökkenteni a membrán-membrán kölcsönhatás erősségét: gátolhatja a transz kölcsönhatásokat a szomszédos sejtek között, illetve ugyanazon sejt felszínén a cisz kölcsönhatásokat NCAM-NCAM vagy NCAM és egyéb sejtadhéziós molekula (pl. L1, neurocan, agy-specifikus kondroitin szulfát proteoglikán) között (Storms, S.D. és munkatársai, 1996; Rutishauser, U. és Landmesser, L. 1996). A PSA tehát a közvetlen érintkezésen alapuló sejt-sejt kapcsolatok általános szabályozója.

2. Az NCAM előfordulása

Az NCAM nemcsak az idegrendszerben fordul elő, hanem számos perifériás szövetben is, így a csontszövet őssejtjeiben (Fang, J. és Hall, B.K. 1995), kromaffin sejtekben (Moftaquir, A. és munkatársai, 1996), a fog őssejtjeiben (Obara, N. és Takeda, M. 1993) a

fejlődő vázizom (Moore, S.E. és Walsh, F.S. 1985), szívizom (Wharton, J. és munkatársai, 1989) és simaizom sejtekben (Akeson, R. A. és munkatársai, 1988).

Mindezek ellenére az NCAM expresszió leginkább az idegrendszerre jellemző. Az idegsejtekben elsősorban az NCAM 180 és 140 kD-os formája van jelen, míg az NCAM-120 a gliasejtekre jellemző (Regan, C.M. 1991). A gliasejtek közül a reaktív asztrociták (Chazal, G. és munkatársai, 2000), a radiális glia (Bonfanti, L. és munkatársai, 1993) és tenyészetben az O2A látóideg oligodendroglia sejtek (Grinspan, J.B. és munkatársai, 1995) mutatnak PSA-NCAM immunreaktivitást.

Beágyazást követő immunogold jelöléssel kimutatták, hogy maga az NCAM fehérje egyenletesen oszlik el a sejtek felszínén, míg a PSA-NCAM hajlamos 200 nm méretű csoportokba tömörülni (Rusakov, D.A. és munkatársai, 1995). A gliasejteken a PSA-NCAM csak az idegsejt felé néző felszínen jelenik meg (Kiss, J.Z. és munkatársai, 1993).

3. A PSA-NCAM gyakorlati jelentősége

A PSA-NCAM expressziót egyben diagnosztikai jelnek is tekintik a rákkutatásban (Dubois, C. és munkatársai, 1995; Figarella-Branger, D. és munkatársai, 1996; Nadasdy, T. és munkatársai, 1993). A PSA-NCAM antiadhéziós tulajdonságait figyelembe véve érthető, hogy a molekula szerepet játszik a daganat áttétel kialakulásában (Michalides, R. és munkatársai, 1994). Ezen kívül egyéb patológiás folyamatokban is részt vesz: depressziós és skizofrén betegek agy-gerincvelői folyadékában megnő az NCAM-immunreaktív fehérjék, különösen a 120 kD-os izoforma elleni antitestek koncentrációja (Poltorak, M. és munkatársai, 1996). Ezzel összhangban a skizofrén betegek agyában a PSA-NCAM immunreaktív sejtek száma 20-95 %-kal csökken (Barbeau, D. és munkatársai, 1995). További patológiai vonatkozása a PSA-NCAM expressziónak, hogy nem lehet hatékony

vakcinát előállítani a B típusú Meningococcus által okozott agyhártyagyulladás ellen, mert a baktérium kapszuláris poliszacharidja is PSA-t tartalmaz, ez ellen viszont a szervezet saját PSA expressziója miatt nem jön létre immunválasz. (Hayrinen, J. és munkatársai, 1995).

Az embrionális fejlődés során a PSA-NCAM elsősorban az idegsejtek vándorlásában, az axonok célba érésében, az izmok beidegzésében, a szív ingerületvezető rendszerének kialakulásában és a csont- és porcszövetek fejlődésében játszik szerepet (Fredette, B. és munkatársai, 1993; Lee, Y.S. és Chuong, C.M. 1992; Paz, D.A. és munkatársai, 1995; Shults, C.W. és Kimber, T.A. 1992; Watanabe, M. és munkatársai, 1992;). Ebben a vonatkozásban a PSA-NCAM expressziót legrészletesebben az LHRH neuronoknak a szaglógödrből az agyba történő vándorlása kapcsán vizsgálták. Ezek a sejtek a terminális és a vomeronazális ideg PSA-NCAM pozitív ágai mentén érik el a bulbus olfactorius-t (Schwanzel-Fukuda, M. és munkatársai, 1992; Schwanzel-Fukuda, és munkatársai, 1996; Schwanzel-Fukuda, M. és Pfaff, D.W 1994; Yoshida, K. és munkatársai, 1995).

A kezdeti feltételezések szerint a PSA-NCAM kizárólag az embrionális és korai posztnatális fejlődésben vesz részt. Azonban bebizonyosodott, hogy a PSA-NCAM expressziója fennmarad a felnőtt agy azon területein, melyek nagyfokú szinaptikus átrendeződésekre képesek, mint pl. a szaglógumó, az oldalkamra laterális fala, a kamra alatti terület, a hipotalamo-neurohipofizeális rendszer és a ^phipokampusz (Bonfanti, L. és munkatársai, 1992; Bonfanti, L. és Theodosius, D.T. 1994; Cremer, H. és munkatársai, 1997; Miragall, F. és munkatársai 1988; Perera, A.D. és munkatársai, 1993; Theodosius, D.T. és munkatársai, 1991). A ^phipokampusz gyurus dentatus-ában a szemcsesejtek felnőtt állatban is folyamatosan termelődnek. Ezek a fejlődő szemcsesejtek és a radiális gliászterű sejtek PSA-NCAM expressziót mutatnak és gyakran közvetlenül érintkeznek egymással. Számuk az öregedés során csökken (Abrous, D.N. és munkatársai, 1997; Fox, G.B. és munkatársai, 1995; Seki, T. és Arai, Y. 1999).

up
Vp

Valószínűleg ugyanazok az elvek érvényesülnek az élet korai szakaszában az axonok növekedése, az idegpályák kialakulása és a szinaptikus kapcsolatok stabilizálása során, mint később a szinapszisok átrendeződésekor. Felnőtt állatban ilyen átrendeződést kiválthatnak különböző sérülések. Ezért léziókat követően is vizsgálták a PSA-NCAM expresszióját. A szenzomotoros kéreg elszívásos léziója után megnőtt a PSA-NCAM immunreaktív sejtek száma az oldalkamra alatti területen, ugyanakkor a brómdeoxi-uridinnel jelölt sejtek száma nem változott. Tehát a szubventrikuláris zóna sejtjei felnőtt állatban is megőrzik plasztikus képességüket (Szele, F.G. és Chesselet, M.F. 1996). A gerincvelő hátsó gyökerének átvágása szintén átmeneti PSA-NCAM expressziót indukál olyan neuronokban, amelyek normál körülmények között nem mutatnak PSA immunreaktivitást. A sérülés hatására megjelenő reaktív asztrociták szintén PSA-NCAM pozitívak, bár Dusart és munkatársainak kisagyban végzett léziós kísérleteinek tanúsága szerint a reaktív asztrocitáknak csak egy részében termelődik PSA-NCAM (Bonfanti, L. és munkatársai, 1996; Dusart, I. és munkatársai, 1999). A regenerációs folyamatokat transzplantációs kísérletekben is vizsgálták. In situ hibridizációval és immunhisztokémiai módszerekkel egyaránt kimutatták, hogy ha perifériás ideget ültettek a talamuszba, a beültetett szövet közelében olyan axon elágazások tűntek fel, melyek felszínén a normál esetre jellemző L1 és NCAM fehérjék mellett a PSA-NCAM is megjelent (Zhang, Y. és munkatársai, 1995). A regeneráció idős patkányban már kevésbé hatékony: denervált izmok újbóli beidegzése csak részlegesen megy végbe, valószínűleg a csökkent PSA-NCAM expresszió miatt (Olsen, M. és munkatársai, 1995).

4. A PSA-NCAM szerepe a neuronális plaszticitásban

A PSA-NCAM plasztikus folyamatokban betöltött szerepe a molekulaszervezet alapján kétféle kísérleti megközelítéssel tanulmányozható: a fehérje oldaláról és a PSA felől.

a) A molekula fehérje vázának egyik lehetséges megváltoztatási módja homozigóta mutáns egértörzsek létrehozása. A mutáció, mely az NCAM-180-ra jellemző 18. exont magába foglaló deléció, legszembetűnőbb következménye a redukált méretű bulbus olfactorius és az oldalkamra alatti területen a bulbus olfactorius-ba vándorló sejtek felhalmozódása (Tomasiewicz, H. és munkatársai, 1993). A szaglógumón belül a szemcsesejtek száma csökken, valamint kevesebb és kisebb glomerulusok figyelhetők meg (Treloar, H. és munkatársai, 1997). A mutáns egerek éretlen interneuronjainak bulbus olfactorius-ba irányuló vándorlása lelassul.

Másrészt az NCAM fehérjét felismerő antitest in vivo adszorbeáltatása is képes megzavarni a molekula funkcióját: ha vad típusú tíz napos egér embrió szaglógödrébe NCAM antitestet injektálnak, az LHRH neuronok perifériáról a szaglógumóba történő vándorlása gátlődik (Schwanzel-Fukuda, M. és munkatársai, 1994). Továbbá, ha in vivo folyamatosan az agykamrán keresztül NCAM elleni antitest kerül a kísérleti patkány agyába, a passzív elhárítási válasz nem rögzül a tanulási kísérletekben (Doyle, E. és munkatársai, 1992), valamint a térbeli tanulás is károsodik (Arami, S. és munkatársai 1996). Azonban az NCAM teljes fehérje vázát felismerő antitest hatása jóval általánosabb, mint az NCAM-180 delécióé, mivel ez az antitest az összes NCAM forma működését megzavarja. Az NCAM-180 mutáció sem elég specifikus, mert a molekulát valamennyi neuron expresszálja. Tehát a fehérje irányából kiinduló kutatások eredményeit nem lehet kizárólag a PSA-NCAM befolyásolásával értelmezni. A specifikus hatás helyének megtalálásához a molekulának azt a részét célszerű módosítani, ami a PSA-NCAM-ra jellemző: a hosszú poliszíálsavat.

b) A PSA lánc eltávolítható egy bakteriofágból izolált, az α 2,8 kötésű szíálsav egységeket specifikusan bontó enzim, az endoszialidáz (endo-N) segítségével (Finne, J. és Makela, P.H. 1985). Ennek az enzimnek a hipokampuszba injektálása kiváltja ugyanazokat a

hatásokat, mint az NCAM fehérjét felismerő antitest alkalmazása: károsítja a térbeli memóriát (Becker, C.G. és munkatársai, 1996), illetve organotipikus hipokampusz szelet tenyészeteken gátolja az LTP és az LTD kialakulását (Muller, D. és munkatársai, 1996). A szaglórendszerben is reprodukálhatók az endo-N segítségével azok a változások, melyek az NCAM-180 mutáns egerekben és anti-NCAM in vivo agyba juttatásával idézhetők elő. Ha újszülött egér agykamrájába endo-N-t injektálnak, nem megy végbe az éretlen idegsejteknek a szubventrikuláris zónából a bulbus olfactorius-ba történő vándorlása. Ezért az NCAM-180 deléció hatását elsősorban a PSA-NCAM expresszióban bekövetkező csökkenéssel magyarázzák (Ono, K. és munkatársai, 1994). Cremer H. és munkatársai szerint az NCAM-180 deléciós egerekben a kismértékű PSA-NCAM termelődés nem gátolja meg teljesen, csupán jelentősen megzavarja a neuronális prekursorok rostrális vándorlását, mivel a vándorlási láncok kialakításában részt vesznek a gliózis révén megjelenő reaktív asztrociták, melyekről ismert, hogy PSA pozitívak (Chazal, G. és munkatársai, 2000). A bulbus olfactorius-ba a szaglóhám felől is érkező idegsejtek, illetve axonok. Egész embrió tenyészetben, amennyiben a szaglóideg útvonalából endo-N enzimmel eltávolítják a PSA-t, az axonok zömmel a mesenchyma-ban maradnak, az axon növekedés, a célsejt megtalálása zavart szenved (Aoki, K. és munkatársai, 1999). Az axonális növekedés gátlása endo-N-nel más rendszerben is megfigyelhető. Hat és kilenc napos csirke embriók lábába injektálva az enzimet, az iliotibialis posterior izomba kevesebb idegi elágazás érkezik, vagyis kevesebb ideg-izom kapcsolat jön létre. Ennek következtében több motoneuron pusztul el (Tang, J. és Landmesser, L. 1993).

5. PSA-NCAM expresszió és az idegsejtek működése

Szoros kapcsolat figyelhető meg a PSA-NCAM és a neuronális aktivitás között, ugyanis PSA-NCAM csak a funkcionáló idegsejtekben termelődik. Ha az embrionális fejlődés során d-tubokurarinnel gátolják csirke miotubulusainak működését, nem expresszálódik PSA-NCAM (Fredette, B. és munkatársai, 1993). Organotipikus hipokampusz szelet tenyészetben endo-N-nel történő PSA emésztés hatására nem váltható ki LTP illetve LTD. Az enzim eltávolítása után újra megjelenik a PSA-NCAM immunreaktivitás, és visszatér az LTP és LTD indukálhatóság is. Azonban ha a neuronok működését tetrodotoxinnal és alacsony Ca^{2+} koncentrációval bénítják, a PSA expresszió nem áll helyre, melynek következtében a szinaptikus plaszticitás jelenségei sem válthatók ki (Muller, D. és munkatársai, 1996). A PSA-NCAM reexpresszióját hasonló módon lehet gátolni kérgi neuron tenyészetben is. Ebben az esetben extracelluláris Ca^{2+} jelenlétében K^{+} -indukált depolarizáció hatására még tetrodotoxin mellett is újratermelődik a PSA-NCAM (Kiss, J.Z. és munkatársai, 1994).

A látóidegben azonosított oligodendroglia-2 típusú asztrocita (O-2A) progenitor sejtek szintén PSA-NCAM immunreaktivitást mutatnak, érdekes módon már a rájuk jellemző O-2A gangliozid expresszió kezdete előtt (Grinspan, J.B. és munkatársai, 1995). Tenyészetben az endo-N enzimes kezelés megakadályozza ezeknek a glia prekursoroknak a neurohipofizeális explantátumból történő vándorlását (Wang, C. és munkatársai, 1994; Wang, C. és munkatársai, 1996). A neurohipofizeális O-2A sejtek működő NMDA receptorokat termelnek. Ezen receptorok farmakológiai úton való gátlása a PSA-NCAM szintézis megszűnéséhez vezet, melynek következtében az endo-N kezeléshez hasonlóan nem vándorolnak szét az explantátumból az O-2A sejtek. Valószínűleg az idegi aktivitás glutamát felszabadítás útján szabályozza a gliális prekursorok PSA-NCAM termelését, mely vándorlásuk előfeltétele (Kiss, J.Z. 1998).

A PSA-NCAM további komplex szerepe modellezhető patkány embrionális hipotalamuszból származó kevert neuron-glia tenyészetben. Ebben a rendszerben 17β -ösztadiol az asztrociták nyúlványosodását váltja ki, de csakis akkor, ha az idegsejtek felszínén jelen van a PSA-NCAM. A PSA enzimátikus eltávolítása esetén a 17β -ösztadiol hatása nem érvényesül. Tehát a PSA-NCAM részt vesz azon idegsejt-glia kölcsönhatásokban, melyek hormonális szabályozás alatt állnak és közvetlen membrán-membrán kapcsolatot igényelnek (Garcia-Segura, L.M. és munkatársai, 1995). Ennek alapján, valamint annak ismeretében, hogy a hipotalamusz nucleus arcuatus-ában egyes GnRH-t termelő sejtek felszínén is jelen van a PSA-NCAM (Perera, A.D. és munkatársai, 1993), feltehető, hogy a molekula a nemi érésben is szerepet játszik.

III. A nucleus arcuatus

1. A nucleus arcuatus általános jellemzése

A 17β -ösztadiol és más nemi hormonok hatására a központi idegrendszer egyik legérzékenyebb területe a hipotalamusz bazális részén, a harmadik agykamrával közvetlenül határos periventrikuláris régióban, az infundibulum felett elhelyezkedő nucleus arcuatus. Afferencióját az amigdala kortikomedialis részéből eredő stria terminalis adja. Az arcuatus azon neuronjai, melyek az agykamra ependyma sejtjeivel érintkeznek, axonjaikat a tuberohipofizeális, vagy más néven tuberoinfundibuláris pályán keresztül az eminencia mediana külső rétegébe küldik, ahol kollaterálisokat adnak le. A nucleus arcuatus egyéb idegsejtjeinek axonjai, illetve axon kollaterálisai a hipotalamusz más területeibe, valamint a talamuszba és az amigdalába érkeznek. Az amigdalába a nyúlványok a stria terminalis-on keresztül jutnak el. A fő efferens pálya, azaz a tractus tuberoinfundibularis „releasing”

hormonokat szállít, melyek az eminencia mediana külső részében bekerülnek a hipofízis portális keringésébe, majd a hipofízis elülső lebenyét elérve szabályozzák az adenohipofízis hormonjainak szintézisét és felszabadulását. Tehát a tractus tuberoinfundibularis jelenti a neurohumorális kapcsolatot a hipotalamusz és a hipofízis elülső lebenye között

A nucleus arcuatus ingerületátvivő anyagai közül elsőként a dopamint mutatták ki. Dopaminerg neuronok innerválják az eminencia mediana külső részét. A dopamin a portális kapillárisokba ürül és gátolja a hipofízis elülső lebenyéből történő prolactin felszabadulást. Ugyanakkor a prolactin gátolja a dopamin felszabadulását az eminencia mediana-ból. A prolactin-ra fiziológiai körülmények között a fő serkentő hatást az ösztrogén és a szoptatás fejt ki. A nucleus arcuatus élettani szerepe a luteinizáló hormon és a prolactin felszabadulás ellenőrzése (Chronwall, B.M. 1985).

Az arcuatus egyes neuronjaiban ACTH-t, β -lipotrofint és β -endorfint is kimutattak. Ezek a peptidek egy közös, 31 000 Da molekulásúlyú prekurzorból származnak. Az ACTH és a β -lipotrofin valószínűleg nem kolokalizál dopaminnal. A β -lipotrofinnak nincs δ -opioid aktivitása, de δ -opioid peptidek prohormonaként funkcionálhat. β -endorfin immunreaktív axonok elszórtan megtalálhatók a harmadik agykamra fala mentén, a nucleus supraopticus, periventricularis, paraventricularis és suprachiasmaticus területén, valamint néhány rost eljut a talamuszig. Súlyos stressz körülmények között mindhárom peptid, az ACTH, a β -lipotrofin és a β -endorfin is felszabadul a hipofízis elülső lebenyéből (Carpenter, M. B. 1991).

2. A nucleus arcuatus plasztikus változásai

A nucleus arcuatus számos ösztradiol receptort expresszáló neuront is tartalmaz (Pfaaf, D.W. és Keiner, M. 1973), melyek nagy részére GABAerg axon terminálisok érkezőnek

(Vincent, S.R. és munkatársai, 1982). Az agyterületet legrészletesebben morfológiai szempontból vizsgálták, mivel nemi hormonok hatására a mag szinaptikus szerveződése jelentősen átalakul (Garcia-Segura, L.M. és munkatársai, 1994). A női nemi ciklus alatt az ösztadiol koncentráció függvényében az axo-szomatikus szinapszisok száma ciklikus változást mutat: proösztusz napján, tehát nagy ösztadiol koncentráció esetén az axo-szomatikus szinapszisok száma drasztikusan csökken (Pérez, J. és munkatársai, 1990; Olmos, G. és munkatársai, 1989). A hormon hatása specifikusan a GABAerg axo-szomatikus szinapszisokat érinti, a nem GABAerg axo-szomatikus szinapszisok száma nem változik ösztadiol kezelést követően. A GABAerg szinapszisok száma proösztusz délutánján és az ösztusz nap reggelén jelentősen csökken, majd az ösztusz napjától kezdve ez a szám növekszik és a ciklus végére eléri a kiindulási állapotot. A nucleus arcuatus-ban az axo-szomatikus szinapszisok számának fluktuációja kísérletes körülmények között is megfigyelhető: ovariektomizált patkányokat 17β -ösztadiollal kezelve reprodukálható a fiziológiás ösztusz ciklus proösztusz délutánján bekövetkező GABAerg axo-szomatikus szinapszis szám csökkenés (Párducz, A. és munkatársai, 1993).

A szinaptikus átrendeződéssel párhuzamosan a nucleus arcuatus gliasejtjei is látványos morfológiai változáson mennek keresztül: nagyobb kiterjedésű GFAP immunreaktív nyúlványok jelennek meg és az idegsejtek szómájának glia lamellával borított területe megnő proösztusz délutánján és az ösztusz nap reggelén. Ovariektomizált állatokban ugyanezek a gyors és megfordítható gliális változások figyelhetők meg 17β -ösztadiol injekció után (Garcia-Segura, L.M. és munkatársai, 1994).

Hasonló ciklikus változás az eminencia mediana területén is bekövetkezik: alacsony ösztadiol koncentráció esetén nincs fizikai kapcsolat a GnRH pozitív axon terminálisok és a perikapillaris térben levő bazálmembrán között. Ezzel szemben proösztusz napján ilyen

kapcsolatok létrejönnek, melynek következtében a neurohormon könnyebben jut a hipofízis portális keringésébe (Prevot, V. és munkatársai, 1999).

Mіндеzen kísérleti eredményekre támaszkodva megpróbáltuk felderíteni, hogy milyen szerepet tölt be a PSA-NCAM a nucleus arcuatus területén 17β -ösztradiol hatására bekövetkező plasztikus átrendeződésben. Hagyományos morfológiai, morfometriai módszereket, a már számos kutatócsoport által használt endo-N enzimmel történő emésztést és a szakirodalomban eddig még nem leírt megközelítési módot, a PSA-t specifikusan felismerő antitest in vivo nucleus arcuatus-ba juttatását alkalmaztuk.

A finomszerkezeti átalakulás funkcionális következményeit elektrofiziológiai módszerekkel vizsgáltuk a JATE Összehasonlító Élettani Tanszékével kollaborációban.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

I. Kísérleti csoportok

1. Ovariectomizált és 17β -ösztradiollal illetve szezám olajjal kezelt felnőtt nőstény CFY patkányok, melyeken elektronmikroszkópos képanalízis segítségével a 17β -ösztradiol indukált plaszticitás membrán szintű jelenségeit és a szinaptikus szerveződésben megnyilvánuló hatásait vizsgáltuk.
2. A 17β -ösztradiol indukált membrán-membrán kölcsönhatások és a PSA-NCAM feltételezett kapcsolatát a következő állatcsoportokon elemeztük:
 - a) Ovariectomizált felnőtt nőstény CFY patkányok nucleus arcuatus-a közelébe endo-N enzimet, illetve kontrollként mesterséges agy-gerincvelői folyadékot injektáltunk, majd mindkét csoportot ketté osztottuk és 17β -ösztradiollal, illetve szezám olajjal kezeltük.
 - b) Ovariectomizált felnőtt nőstény CFY patkányok egyik oldali laterális agykamrájába egy miniozmotikus pumpa segítségével PSA-NCAM antitestet, valamint kontrollként irreleváns IgM-et, illetve mesterséges agy-gerincvelői folyadékot juttattunk.
3. Az elektrofiziológiai vizsgálatok ovariectomizált felnőtt CFY patkányokon történtek, melyek az elvezetés alatt kaptak 17β -ösztradiol injekciót.

II. Műtéti beavatkozások

1. Ovariektómia és ösztradiol kezelés

Két hónapos nőstény CFY patkányok mindkét oldali petefészket nembutil érzéstelenítés alatt eltávolítottuk, majd egy hónappal később 100 g testsúlyra számítva 100 µg szezám olajban oldott 17β-ösztradiollal, illetve a kontroll csoportot csak szezám olajjal i.p. kezeltük.

2. Endo-N injektálás

Nembutállal altatott ovariektomizált állatokat egy hónappal a petefészek eltávolítása után sztereotaxiás készülékbe helyeztünk és közvetlenül az egyik oldali nucleus arcuatus fölé 2 µl, mesterséges agy-gerincvelői folyadékkal 1:100 arányban hígított endo-N enzimet injektáltunk. Öt nappal az enzim injekció után 17β-ösztradiollal kezeltük az állatokat a fent ismertetett módon.

3. PSA-NCAM antitest *in vivo* laterális agykamrába juttatása

Szintén egy hónappal az ovariektómia után nembutállal érzéstelenítettük az állatokat, majd sztereotaxiás készülék segítségével egy kanült ültettünk az egyik oldali laterális agykamrába. 200 µl térfogatú ALZET miniozmotikus pumpát mesterséges agy-gerincvelői folyadékkal 1:50 arányban hígított PSA-NCAM antitesttel töltöttünk fel, majd a pumpát egy katéter segítségével a kanülhöz csatlakoztattuk, a pumpát pedig a patkány bőre alá ültettük. Az antitest öt napig diffundált az oldalkamrába, majd a kísérleti állatok ösztradiol kezelést kaptak. A kontroll állatokon ugyanilyen műtétet végeztünk, csak a miniozmotikus pumpa az egyik kontroll csoportban mesterséges agy-gerincvelői folyadékot, a másik kontroll csoportban az előbbi oldatban 1: 50 arányban hígított irreleváns IgM-et tartalmazott.

III. Fénymikroszkópos immunhisztokémia

PSA-NCAM immunfestés céljára 0.1 M foszfát pufferben (pH: 7.4) oldott 4%-os paraformaldehid oldattal szíven keresztül perfundáltuk az állatokat. Az agyakat egy éjszakán át ugyanilyen fixálóban utófixáltuk, majd vibratómmal (Oxford Vibratome) 50 μ m vastag metszeteket készítettünk. Az immunhisztokémiához TBS-ben mostuk a metszeteket, az aspecifikus kötéseket 20% normál kecske szérummal (Normal Goat Serum, Sigma) blokkoltuk, majd 0.25% BSA-t tartalmazó TBS-ben 1:6000 arányban hígított PSA-NCAM antitesttel 48 órán át 4 °C-on inkubáltuk a metszeteket. Másodlagos antitestként peroxidázzal konjugált anti egér IgM 1:50 hígítását alkalmaztuk. A peroxidáz reakció termékét 3,3'-diaminobenzidinnel és NiCl_2 -dal tettük láthatóvá.

IV. Elektronmikroszkópos vizsgálatok

Az állatokat a GABA immunhisztokémiai eljárás követelményei alapján 0.1 M foszfát pufferben (pH: 7.4) oldott 1% paraformaldehid és 1% glutáraldehid tartalmú fixálóval rögzítettük, majd ugyanilyen oldattal 4°C-on három órán át tovább fixáltuk az agyakat. Ezt követően 300 μ m vastag metszeteket készítettünk vibratómmal (Oxford Vibratome). Ezekből a nucleus arcuatus középső részét kivágtuk, foszfát pufferes mosást követően 1% OsO_4 -dal utófixáltuk, majd felszálló alkoholsorral víztelenítettük és Araldite-ba ágyaztuk. Reichert Ultracut E típusú ultramikrotómmal ultravékony metszeteket készítettünk, melyeket GABA immunhisztokémia céljára nikkell és arany rostélyokra vettünk fel.

A GABA immunfestést Somogyi és Hodgson módszere (Somogyi, P. és Hodgson, A.J. 1985) alapján végeztük. A metszetekből a mügyantát és az ozmiumot 5 percig tartó 1 % perjódsvavas illetve 1% Na-metaperjódsvavas maratással távolítottuk el. Az aspecifikus kötések

blokkolására normál kecskesavót használtunk (Normal Goat Serum, Sigma, 1:5, 30 perc). A primer antitestet 1:1000 arányban hígítottuk 100 mM TRIS, 100 mM PBS 10% kecske szérum és 0.1% Triton X 100 összetételű oldatban. A metszeteket szobahőn két órán át inkubáltuk az anti-GABA oldattal, majd pufferes mosás után újabb két órán át a másodlagos antitesttel (15 nm-es arany szemcsékkel jelölt kecskében termelt anti nyúl IgG, 1:20, Janssen, Aurion). A metszeteket uranil acetáttal és ólom citráttal tettük kontrasztosabbá, majd Zeiss EM 902 elektronmikroszkóppal analizáltuk.

V. Exo-endocitótikus aktivitás vizsgálata

Az elektronmikroszkópos metszeteken IBAS képanalizáló rendszer segítségével megmértük tizenöt véletlenül kiválasztott neuronális sejttest területét, valamint megszámoltuk a hozzá tartozó GABA-pozitív és GABA-negatív axo-szomatikus szinapszisokat, a tüskés vezikulákat és az exo-endocitózisra utaló membrán lefűződéseket. A kvantitatív adatok statisztikai elemzéséhez minden esetben a Mann-Whitney próbát használtuk.

VI. A szinapszisok számának meghatározása

Az elektronmikroszkópos metszeteken a szinapszisok sűrűségét a diszektor módszerrel (Sterio, D.C., 1984) állapítottuk meg. 90 nm vastag sorozatmetszeteket használva meghatároztuk a szinapszisok átlagos kivetített magasságát mind az axo-szomatikus, mind az axo-dendritikus szinapszisok esetében. Ennek az értéknek a 30%-át tekintettük a diszektor magasságának. Mivel az axo-szomatikus szinapszisok az axo-dendritikusoknál lényegesen

nagyobbak, itt a diszektor magassága is meghaladta az axo-dendritikus szinapszisoknál alkalmazott értéket: egymástól kb. 270 nm távolságra levő párhuzamos metszeteken 12-15 perikariont hasonlítottunk össze az axo-szomatikus szinapszisok esetében, az axo-dendritikus szinapszisok vizsgálatakor pedig kb. 180 nm távolságra lévő párhuzamos metszeteken analizáltunk metszetenként 50-60 szinapszist. Szinapszisnak azt a struktúrát tekintettük, mely posztszinaptikus denzitást és legalább három szinaptikus vezikulát tartalmazott. A szinapszisok számát a

$$N_v = \Sigma Q / V_{dis}$$

képlet alapján számoltuk ki, ahol

ΣQ jelenti azon szinapszisok számát, melyek az egyik metszeten megtalálhatóak, ugyanakkor a vele párhuzamos metszeten már nem. V_{dis} a diszektor térfogata, mely az analizált perikarion területe és a két párhuzamos metszet közti távolság szorzata.

VII. Elektrofiziológiai vizsgálatok

Ketavet (10 mg / 100 g) és Rompun (xilazine, 0.8 mg / 100 g) 2:5 arányú keverékével altatott ovariektomizált patkányokat sztereotaxiás készülékbe helyeztünk és 2.5 M NaCl oldattal feltöltött üveg elektródával elértük a nucleus arcuatus területét. A műtét után egy órán át pihent az állat, majd megkezdtük az idegsejt aktivitásának regisztrálását. Az elektromos elvezetés extracellulárisan történt, állatonként egyetlen sejtről legalább 25-30 percen keresztül. Az elektromos aktivitás rögzítése alatt i.p. 17 β -ösztradiolt (100 μ g / 100 g) injektáltunk a kísérleti állatba.

A nucleus arcuatus funkcionális kapcsolatainak feltárása céljából kétféle érző bemenet ingerlésének hatását is megvizsgáltuk: egyrészt a bajuszpárnát, másrészt a járulékos

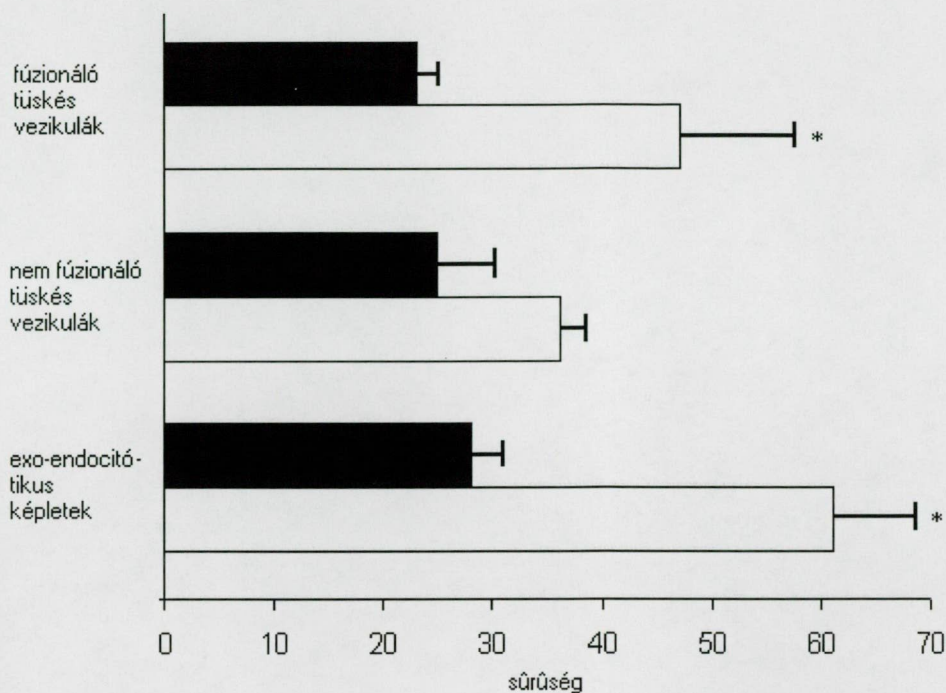
szaglógumót (*bulbus olfactorius accesorius*) ingereltük és ezt kombináltuk az ösztradiol kezeléssel. A bajuszpárnát bipoláris tü elektródokkal (1 Hz, 0.3 ms , 150-200 μ A), a járulékos szaglógumót pedig bipoláris wolfram elektródokkal (2 Hz, 0.3 ms, 50-100 μ A) ingereltük. Az elektródokat Narishige hidraulikus mikromanipulátor segítségével 3-5 μ m-es lépésekben mozgattuk. A jelek 1 Hz alsó és 10 kHz felső küszöbű differenciális erősítőn keresztül Tektronix tároló oszcilloszkópra illetve számítógépre kerültek. A kísérlet után az állatokat 4 %-os paraformaldehid oldattal szíven keresztüli perfúzióval fixáltuk, és az elektródák helyét krezil ibolyával festett, vibratómmal készült metszeteken ellenőriztük.

EREDMÉNYEK

I. Az exo-endocitotikus aktivitás változása

A 17β -ösztadiol indukált plaszticitás részletes elemzéséhez a finomszerkezet vizsgálata jelentette a kiinduló pontot. Az elektronmikroszkóphoz kapcsolt képanalizáló rendszer segítségével meghatároztuk a GABAerg és nem GABAerg axo-szomatikus szinapszisok számát a neuronális sejttest membránjának 1000 m-ére vonatkoztatva. 24 órával az ösztadiol kezelés után a GABA immunpozitív axo-szomatikus szinapszisok előfordulási gyakorisága csökkent, míg a nem GABAerg szinapszisok száma nem változott szignifikánsan.

A nucleus arcuatus neuronjainak perikarionjában számos tüskés vezikula volt megfigyelhető. Ezek közül a kvantitatív analízishez csak azokat vettük számításba, melyek a sejtet határoló membrántól maximum 500 nm távolságra helyezkedtek el. Külön figyelmet fordítottunk a membránnal éppen fúzionáló tüskés vezikulákra (coated pit), mivel ezek számából a sejt exo-endocitotikus aktivitására lehet következtetni. Ezek a lefűzések ugyanolyan gyakorisággal fordultak elő az asztrocita nyúlványokkal szemközti membrán területeken, mint a posztszinaptikus denzitásoknál. Az ösztadiol kezelés hatására az exo-endocitotikus aktivitásra utaló lefűzések 1000 m membránra vonatkoztatott száma megközelítőleg a hormon injekció előtti érték kétszeresére nőtt. A vezikulák sűrűsége az ösztadiol hatására szintén növekedett, bár a különbség nem volt szignifikáns (1. ábra).

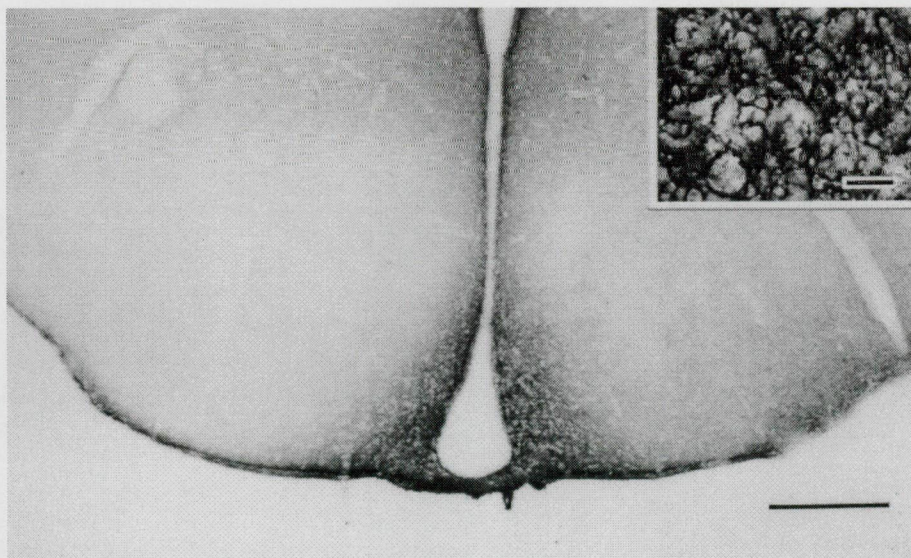


1. ábra. A plazmamembránról lefűződő tüskés vezikulák száma a plazmamembrán 1000 μm^2 -ére vonatkoztatva és a membránnal nem fúzionáló tüskés vezikulák száma a citoplazma 100 μm^2 -ében, valamint az exo-endocitotikus képletek összesített sűrűsége. A fekete oszlopok a kontroll, a fehérek az ösztradiollal kezelt állatokra jellemző értékek.

Az ösztradiol által indukált strukturális átrendeződés tehát nemcsak a szinapszisok szintjén, hanem a membránban lejátszódó átalakulásokban is tetten érhető. A folyamat molekuláris mechanizmusában ezért feltehetően a sejt felszínén elhelyezkedő sejtadhéziós molekulák is részt vesznek. Figyelmünket a PSA-NCAM felé fordítottuk, mivel a molekula a nucleus arcuatus-ban felnőtt korban is expresszálódik, és számos kutatócsoport bizonyította, hogy elősegíti a membrán részek egymáshoz képest történő elmozdulását. A PSA-NCAM szerepének vizsgálatához alapfeltétel a molekula megbízható, reprodukálható módon történő immunhisztokémiai kimutatása fénymikroszkópos szinten.

II. A PSA-NCAM immunhisztokémiai reakció jellegzetességei

Kontroll körülmények között a PSA láncot specifikusan felismerő antitesttel végzett immunhisztokémiai reakció során reprodukálni tudtuk az irodalomban részletesen dokumentált festődési mintázatot: intenzív, jellegzetesen ponszerű jelölődést mutattak a hipokampuszban a gyrus dentatus szemcsesejtjei és az elsődleges szaglókéreg principális neuronjai, míg a kéreg egyéb területein csak elszórtan volt megfigyelhető néhány hasonlóképpen foltosan festődő idegsejt. A hipotalamuszban önálló neuronok nem különíthetők el, az idegsejtek teste fehéren rajzolódik ki az erős immunhisztokémiai jelet adó neuropilben. Ez karakterisztikus habszerű mintázatot eredményez a nucleus supraopticus-ban, paraventricularis-ban és a bennünket foglalkoztató nucleus arcuatus-ban is (2. ábra). A PSA-NCAM immunreakció a neuronoktól eltérő formában jelenik meg az oldalkamra falát alkotó ependyma sejtekben és a nucleus supraopticus-ba benyúló radiális gliában, ugyanis itt a reakciótermék nem ponszerű jelet ad, hanem az egész sejtet egyenletesen kitölti. *Valm?*



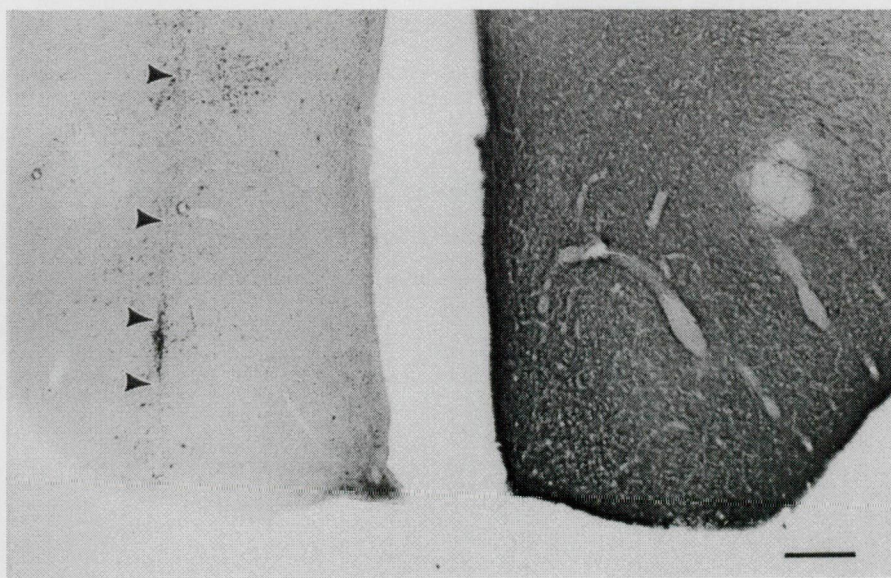
2. ábra. PSA-NCAM immunreakció kontroll állat nucleus arcuatus-ában.

Lépték: 1 mm

A PSA-NCAM molekulának az ösztradiol indukált neuronális plaszticitásban betöltött szerepét a PSA lánc kétféle módon történő befolyásolásával vizsgáltuk meg. A beavatkozásoknak magára a PSA-NCAM molekulára gyakorolt hatását minden esetben a PSA-NCAM fénymikroszkópos immunreakciója segítségével ellenőriztük. A PSA lánc módosításainak következményeit az alábbiakban foglalom össze.

III. Az endo-N injektálás hatása

A PSA-NCAM fénymikroszkópos immunhisztokémiai reakciója alapján az ovariectomizált patkányok nucleus arcuatus-a fölé történő egyszeri endo-N injekció sikeresen eltávolította a hosszú polisziálsav láncot, mivel az injektálás oldalán nem volt festődés, a kontralaterális oldalon viszont a kontroll állapotra jellemző PSA-NCAM immunreakció volt megfigyelhető: a neuropil diffúz, pontszerű, erős jelet mutatott, maguk a sejtestek pedig fehéren rajzolódtak ki, nem jelölődtek (3. ábra).

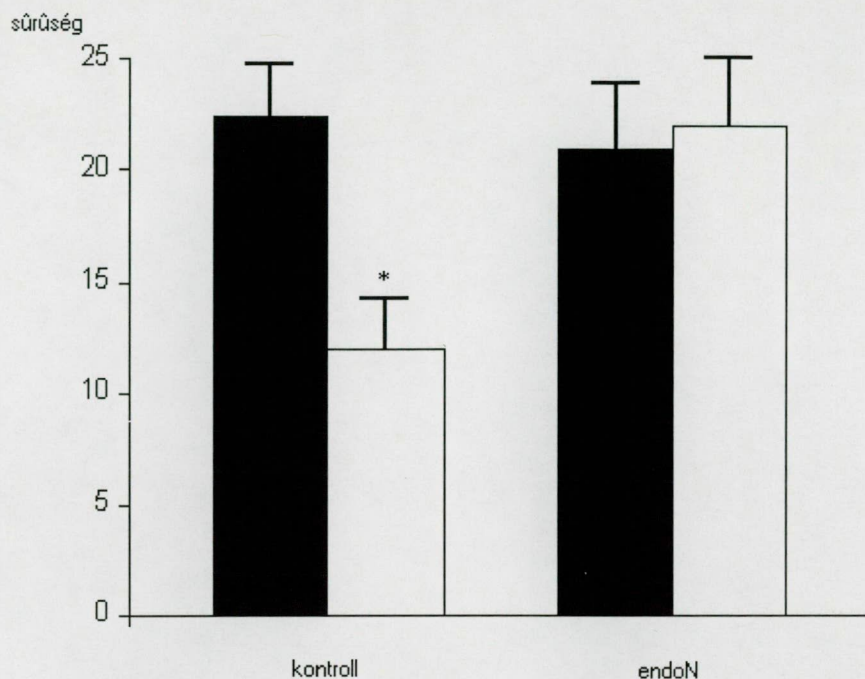


3. ábra. Endo-N injekció hatása a nucleus arcuatus-ban. A nyílhegyek a szűrőcsatornát jelölik.

Lépték: 0,75mm

A finomszerkezeti vizsgálatok tanúsága szerint maga az endo-N injekció, vagy az enzimes emésztés nem okozott szöveti károsodást, nekrotikus jelek nem voltak kimutathatóak. A nucleus arcuatus-ban az axo-szomatikus szinapszisok többsége GABAerg (Párducz, A. és munkatársai, 1993). Mind a GABA immunreaktivitást mutató, mind a nem GABAerg szinapszisokban előfordultak világos és ún. sötét magvú (dense-core) vezikulák. A kolloidális arany szemcsék minden esetben a világos vezikulák fölött voltak jelen, a sötét vezikulák soha nem jelölődtek. A nem GABAerg szinapszisok a GABAergekhez hasonlóan szimmetrikus kapcsolatokat képeztek, bár kisebb számban előfordultak aszimmetrikus axo-szomatikus és axo-dendritikus szinapszisok is.

A szinaptikus denzitások meghatározása arra utalt, hogy a 17β -ösztradiol kezelés hatása nem érvényesült az endo-N injekcióval azonos oldali nucleus arcuatus-ban: a GABAerg szinapszisok denzitása nem tért el szignifikánsan a kontroll, csak szezám olajjal kezelt állatra jellemző értéktől. Ugyanakkor azon oldali nucleus arcuatus-ban, ahonnan enzimátikus úton nem távolítottuk el az NCAM molekuláról a polisziálsavat, 17β -ösztradiollal szignifikáns GABAerg szinapszis szám csökkenés volt indukálható. A nem GABAerg szinapszisok száma egyik kísérleti csoportban sem változott jelentősen (4. ábra).

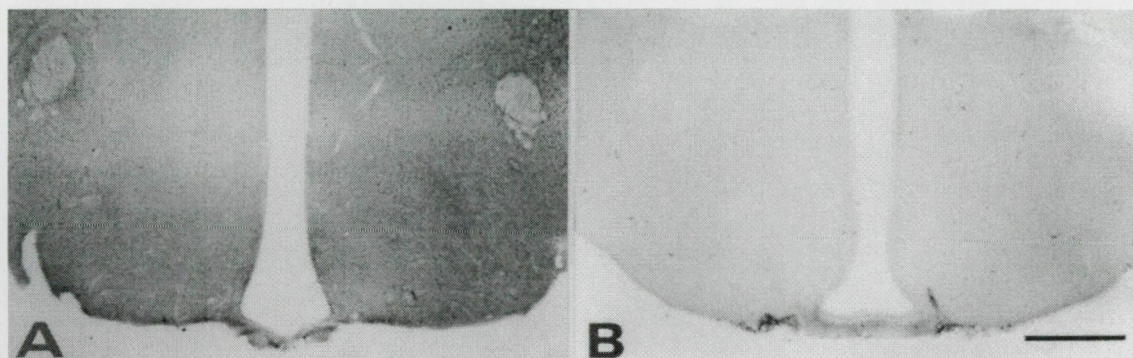


4. ábra. GABAerg axo-szomatikus szinapszisok sűrűségének változása ösztradiol injekció hatására ovariectomizált patkány nucleus arcuatus-ában, kontroll és endo-N-nel kezelt állat esetében. A fekete oszlopok az ösztradiol kezelés előtti, a fehérek az ösztradiol kezelés utáni állapotot jelölik.

IV. A PSA-NCAM antitest oldalkamrába juttatásának következménye

Az antitest öt nap alatt az oldalkamrától távoli területekre diffundált, elérte a nucleus arcuatus-t is. A diffúzió kiterjedését olyan módosított fénymikroszkópos immunhisztokémiai eljárással ellenőriztük, melyben csak a másodlagos antitesttel inkubáltuk a metszeteket. A nucleus arcuatus síkjában készített koronális metszeteken a normál PSA-NCAM immunreakcióval összevethető, bár kevésbé specifikus és gyengébb festődés volt látható, míg a kontroll, csak mesterséges agy-gerincvelői folyadékot kapott állat esetében nem kaptunk immunhisztokémiai jelet. A másik kontroll csoport, ahol irreleváns IgM diffúziója történt, a

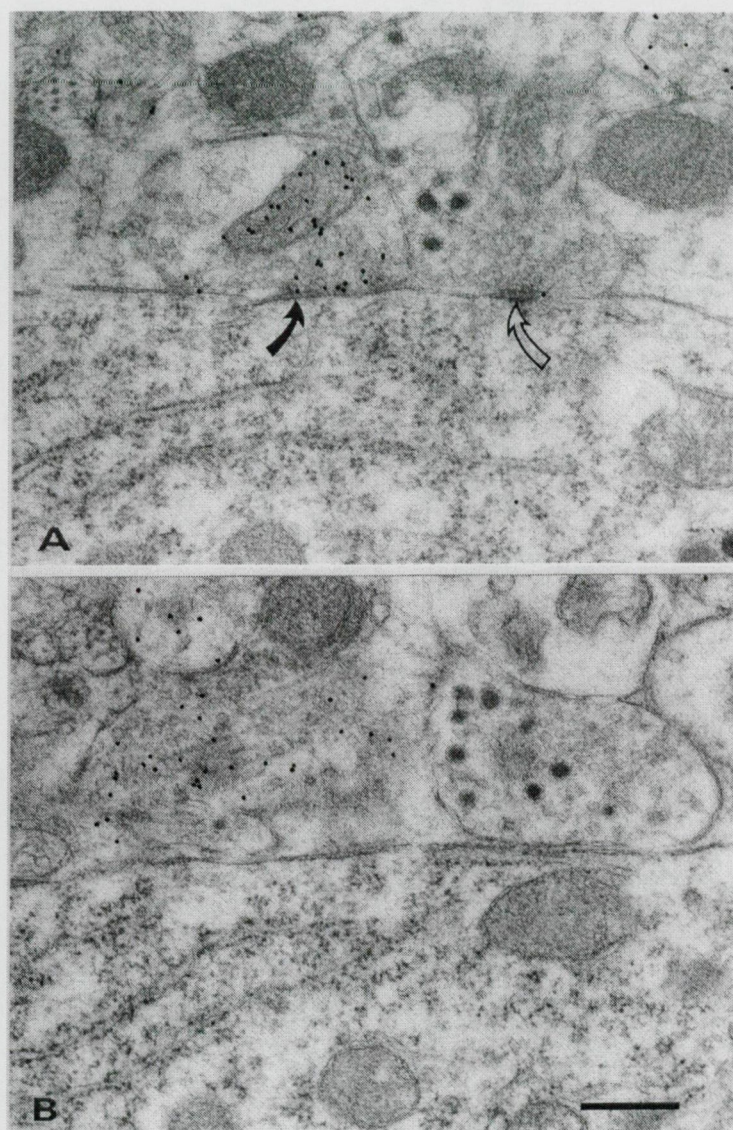
peroxidázzal konjugált anti-IgM ellenanyaggal való reakciót követően diffúz, aspecifikus jelölődést mutatott, mely kiterjedt a nucleus arcuatus területére is (5. ábra).



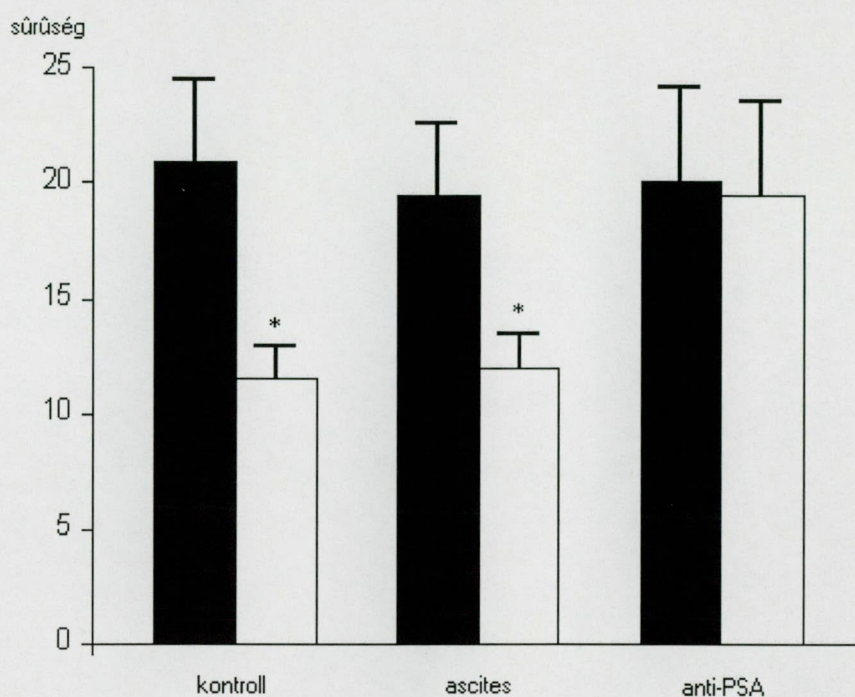
5. ábra. Koronális metszetek olyan állat nucleus arcuatus-ából, melynek oldalkamrájába miniozmotikus pumpa segítségével polisztiálsavat felismerő antitest (A), illetve kontrollként mesterséges agy-gerincvelői folyadék (B) diffundált. A módosított PSA-immunfestéssel kimutatható, hogy az antitest eljutott a nucleus arcuatus-ba, míg a kontroll esetben nem kaptunk immunreakciót. Lépték: 0,5 mm

Elektronmikroszkóppal vizsgálva a metszeteket itt sem találtunk a műtéti eljárás vagy az ösztadiol injekció által esetlegesen kiváltott degenerációra utaló nyomokat. A nucleus arcuatus finomszerkezete ugyanazokat a jellegzetességeket mutatta, mint a korábbi csoportokban. Az endo-N kezelést kapott állatokhoz hasonlóan a diszektor módszer segítségével meghatároztuk a GABAerg és nem GABAerg axo-szomatikus szinapszisok sűrűségét a PSA-NCAM antitesttel kezelt és mindkét kontroll csoportban, ösztadiol injekciót követően (6. ábra). A 17β -ösztadiol hatására szignifikánsan csökkent a GABAerg axo-szomatikus szinapszisok száma a kontroll állatok nucleus arcuatus-ában, vagyis sem a mesterséges agy-gerincvelői folyadék, sem az irreleváns IgM nem befolyásolta a már

korábban dokumentált ösztadiol indukált szinaptikus átrendeződést. Ezzel szemben a PSA-NCAM antitesttel kezelt patkányokban a GABAerg axo-szomatikus szinapszisok denzitása nem változott a 17β -ösztadiol injekció után, tehát a PSA-NCAM antitest in vivo nucleus arcuatus-ba juttatása meggátolta a kontroll csoportokban megfigyelhető ösztadiol hatás kialakulását (7. ábra).



6. ábra. Anti-PSA-val kezelt patkány nucleus arcuatus-ából készült sorozatmetszetek. A vonatkoztatási metszeten (A) egy GABA immunopozitív (fekete nyíl), és egy GABA immunonegatív (üres nyíl) szinaptikus végződés látható, melyek a párhuzamos metszeten (B) már nem képeznek funkcionális kapcsolatot. Lépték: $0,5\mu\text{m}$



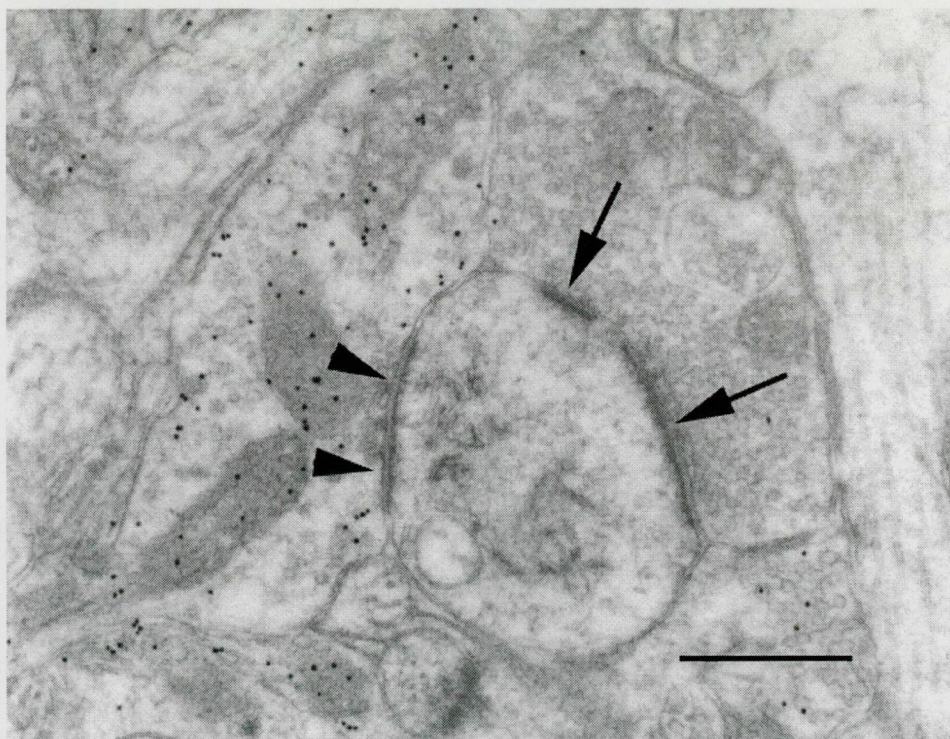
7. ábra. Axo-szomatikus GABAerg szinapszisok sűrűségének változása ösztadiol injekció hatására, mesterséges agy-gerincvelői folyadékkal, ascitesszel és anti-PSA-val kezelt patkányok nucleus arcuatus-ában.

A PSA lánc bármelyik módon történő módosítása, azaz a PSA enzimatisz eltávolítása, vagy az ellenkező irányú megközelítés, vagyis a PSA leárnyékolása a megfelelő specifikus antitesttel egyaránt azt eredményezi, hogy a 17β -ösztadiol nem képes szinaptikus plaszticitást indukálni a nucleus arcuatus-ban: a GABAerg axo-szomatikus szinapszisok száma nem változik.

Az axo-szomatikus szinapszisok viselkedésének tanulmányozását követően megvizsgáltuk a másik oldalt: az axo-dendritikus szinapszisok számának alakulását 17β -ösztadiol kezelés után.

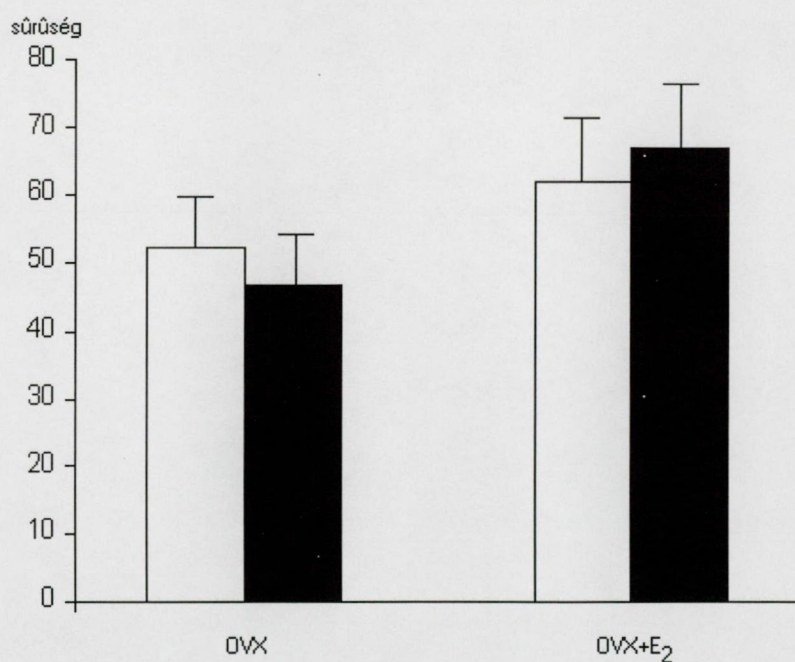
V. 17β -ösztradiol hatása az axo-dendritikus szinapszisok számára

Az axo-szomatikus szinapszisokhoz hasonlóan az axo-dendritikus szinapszisok sűrűségét is a diszektor módszerrel határoztuk meg beágyazás utáni GABA immunreakciót követően. Az axo-dendritikus szinapszisok között is találunk GABAerg és nem GABAerg szinapszisokat, melyek az axo-szomatikusokhoz hasonlóan egyaránt tartalmaznak világos és „dense core” vezikulákat, bár ez utóbbiak kisebb gyakorisággal fordulnak elő. A kolloidális arany szemcsék kizárólag a világos vezikulák fölött helyezkedtek el. Az axo-szomatikus szinapszisoktól eltérően az axo-dendritikus szinapszisok között megközelítőleg egyenlő arányban voltak jelen GABAerg és nem GABAerg axon terminálok. Az axo-dendritikus szinapszis kategórián belül külön osztályba soroltuk a dendrittűskén található szinapszisokat (8. ábra).

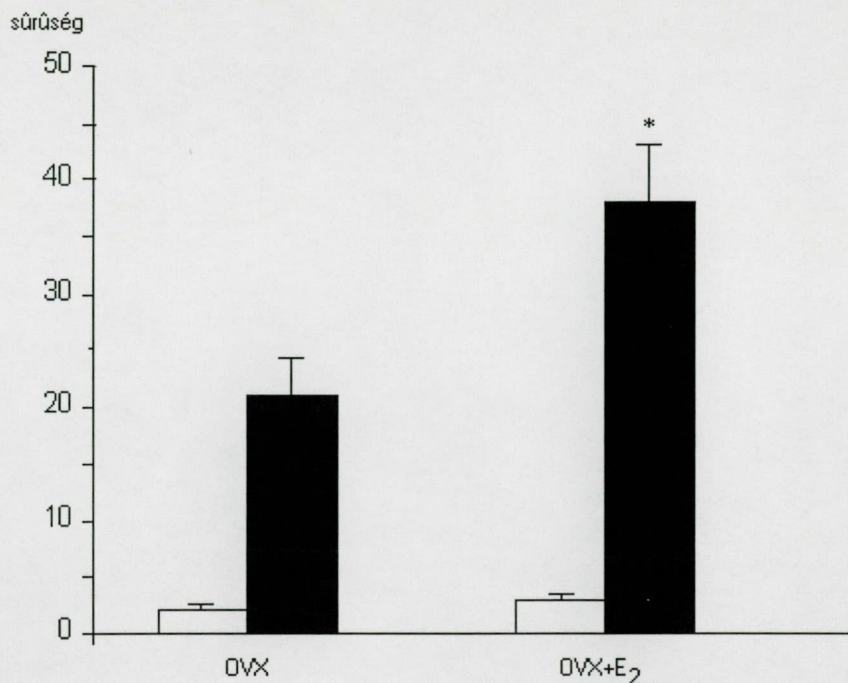


8. ábra. Patkány nucleus arcuatus-ban található dendrittűskén szinaptizáló GABAerg (nyílhegyek), és nem GABAerg végződés (nyilak). Lépték: $0,5\mu\text{m}$

Érdekes módon a 17β -ösztadiol kezelés hatására ugyan némiképp megnőtt az összesített nem GABAerg axo-dendritikus szinapszisok száma, de ez a változás statisztikailag nem volt szignifikáns. A GABAerg axo-dendritikus szinapszisok egészét tekintve pedig még ez az enyhe növekedési tendencia is alig figyelhető meg. Tehát a dendrittűskén levő és a tűskén kívüli szinaptikus sűrűségeket együttesen vizsgálva a 17β -ösztadiolnak nem volt jelentős hatása a szinapszisok számára (9. ábra). Annál meglepőbb viszont, hogy a dendrittűske szinapszisokat önállóan elemezve látványos növekedés figyelhető meg a nem GABAerg axo-dendritikus szinapszisok sűrűségében 17β -ösztadiol adását követően. A GABAerg tűskeszinapszisok nem mutattak szignifikáns változást (10. ábra).



9. ábra. Axo-dendritikus szinapszisok sűrűségének változása ösztadiol kezelés (E_2) hatására ovariektomizált (OVX) patkány nucleus arcuatus-ában. A fehér oszlop a GABAerg, a fekete a nem GABAerg szinapszisokat jelöli.



10. ábra. Dendrittüske szinapszisok sűrűségének változása ovariektomizált (OVX) patkány nucleus arcuatus-ában ösztadiol (E₂) kezelés hatására. A fehér oszlop a GABAerg, a fekete a nem GABAerg szinapszisokat jelöli.

Ha figyelembe vesszük, hogy mindez az axo-szomatikus szinapszisok átrendeződésével párhuzamosan, a 17 β -ösztadiol injekció után 24 órán belül következik be, a hormonkezelés komplex hatásával kell számolnunk, mely egyrészt növeli az axo-dendritikus szinapszisokon keresztül az ingerlő bemenetet, másrészt csökkenti a neuronális sejttestre érkező gátlást. Tehát két oldalról is adottak a feltételek ahhoz, hogy a neuron aktivitása fokozódjon, amennyiben az axo-szomatikus és axo-dendritikus szinapszisok összehangolt átrendeződése ugyanazon neuront érinti. Ezt a feltételezést vizsgáltuk meg elektrofiziológiai módszerekkel.

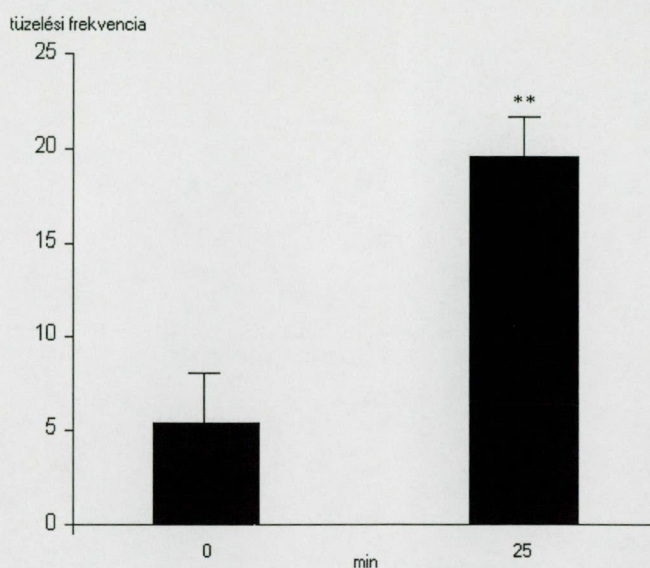
VI. Az elektrofiziológiai vizsgálatok eredményei

A nucleus arcuatus idegsejtjei kontroll, ösztadiol-mentes állapotban viszonylag mérsékelt spontán aktivitást mutattak: egyenletes, nagyobb ingadozásoktól mentes tüzelési mintázat volt megfigyelhető mintegy 25-30 percen keresztül. Ez a nyugodt működési mód drámaian megváltozott 17β -ösztadiol hatására. A hormon i.p. injektálását követő 25 perc után az idegsejtek tüzelési aktivitása a kontroll értéknek megközelítőleg négyszeresére növekedett (11. ábra). Ez alátámasztja a morfológiai módszerekkel kimutatott finomszerkezeti átrendeződést, mely szerint a nucleus arcuatus neuronjainak egyrészt csökken a sejttestre irányuló gátló afferentációja, másrészt a tüskeszinapszisokon keresztül a serkentő bemenet fokozódik ösztadiol kezelést követően.

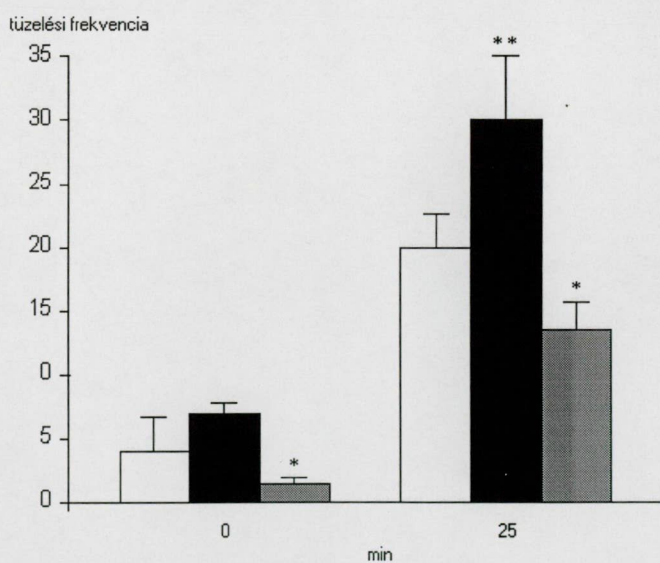
A nucleus arcuatus funkcionális kapcsolatainak felderítésére irányuló kísérletek elgondolkodtató eredményre vezettek. Kiderült, hogy a kétféle szenzoros afferentáció ingerlése ellentétesen módosította az arcuatus neuronjainak elektromos aktivitását: a trigeminális bemenet, azaz a bajuszpárna stimulálása fokozta az idegsejtek tüzelési frekvenciáját, míg a járulékos szaglógumó ingerlésére ugyanezek a neuronok alacsonyabb tüzelési aktivitással válaszoltak.

Mivel az előzetes adatok ismeretében a 17β -ösztadiol jelentős szinaptikus átrendeződéseket eredményez a nucleus arcuatus-ban, melynek funkcionális következménye a spontán elektromos aktivitás gyors növekedése, felmerült a kérdés, hogy ez a hatás mennyire specifikus, azaz érint-e olyan rendszereket is, melyek a hormonális szabályozásban nem vesznek részt. Ezért a kétféle afferentáció ingerlését kombináltuk az ösztadiol kezeléssel. Eredményeink azt mutatják, hogy ugyan az alapaktivitás fokozódás bekövetkezett 17β -ösztadiol hatására, de sem a trigeminális stimuláció által kiváltott aktivitás növekedés, sem a

szaglórendszerből érkező ingerület okozta csökkent tüzelési frekvencia nem tért el lényegesen ösztadiol jelenlétében a hormon injektálás előtt regisztrált változástól (12. ábra).



11. ábra. Nucleus arcuatus neuronjainak spontán aktivitása ösztadiol injekció előtt (0 perc) és után (25 perc). ** $p < 0,01$



12. ábra. A bajuszpárna (fekete oszlopok) és a járulékos szaglógumó (szürke oszlopok) ingerlésének hatása a nucleus arcuatus neuronjainak spontán aktivitására (fehér oszlopok) ösztadiol kezelés előtt (0 perc) és után (25 perc). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

Kísérleteink eredményei egyrészt összhangban vannak a nucleus arcuatus-ban ösztadiol hatására végbemenő, már korábban dokumentált változásokkal, másrészt újabb adatokat szolgáltatnak az ösztadiol hatásmechanizmusával kapcsolatban.

I. Membrán szintű változások

Az ösztadiol membránt érintő hatása sokrétű: befolyásolja a membrán transzportot (Pietras, R.J. és Szego, C.M. 1975) és bizonyos neurotranszmitter receptorokat (Biegon, A. és munkatársai, 1982), megváltoztatja az idegsejtek ingerelhetőségét (Teyler, T.J. és munkatársai, 1980), valamint a plazmamembránban igen gyorsan bekövetkező finomszerkezeti változásokat hoz létre (Rambo, C.O. és Szego, C.M. 1983).

A membrán szerkezetét érintő, ösztadiol kiváltotta átalakulásokat részletesen L.M. Garcia-Segura és munkatársai tanulmányozták. Fagyasztva töréses módszerrel kimutatták, hogy az intramembrán partikulumok száma a patkány nucleus arcuatus-ban az ösztroz ciklus során változik: proösztroz és ösztroz alatt a 10 nm-nél kisebb partikulumok száma csökkent, a 10 nm-nél nagyobbaké pedig növekedett a diösztroz napján megfigyelhető állapothoz képest. Ugyanakkor a diösztrozhoz viszonyítva proösztroz napján a perikarion plazmamembránjában jelentősen nagyobb számban voltak jelen exo-endocitotikus aktivitásra utaló képletek (Garcia-Segura, L.M. és munkatársai, 1988). Ovariectomizált patkányokat ösztadiollal kezelve és a nucleus arcuatus-t fagyasztva töréses módszerrel vizsgálva időben nyomon követhető volt a 17β -ösztadiol hatása. Szignifikánsan megnövekedett a membránba beolvadó vezikulák száma 25 perccel az ösztadiol injekció után, mely maximumát 30 perc alatt érte el és ez a szint 24 óra elteltével is fennmaradt (Párducz, Á. és munkatársai, 1996).

In vitro kísérletek további bizonyítékot szolgáltatottak az ösztadiol endocitotikus aktivitást fokozó hatására: nucleus arcuatus-t tartalmazó agyszeletet torma peroxidázzal inkubáltak és kimutatták, hogy az enzimet az agyszelet nagyobb mértékben vette fel ösztadiol jelenlétében (Garcia-Segura, L.M. és munkatársai, 1987).

Ezen fokozott membrán működést munkacsoportunk transzmissziós elektronmikroszkópai módszerekkel igazolta. Kimutattuk, hogy 24 órával az ösztadiol kezelést követően a vezikula lefűződésének száma szignifikánsan megnövekszik és a tüskés vezikulák száma hasonló tendenciát mutat. Nem publikált megfigyeléseink szerint a Golgi komplex is kiterjedtebb, aktívabb működést sejtető formában van jelen ösztadiol injekció után.

A kísérleti adatok tehát arra utalnak, hogy az ösztadiol hatásának kifejtésében közreműködik egy- vagy többféle, a sejtek felszínén található molekula. Ennek kémiai természete valószínűleg glikoprotein, mivel a kisméretű intramembrán partikulumokról bebizonyosodott, hogy concanavalin A-t képesek adszorbeálni (Garcia-Segura, L.M. és munkatársai, 1989). Ezt figyelembe véve az ösztadiollal kapcsolatba hozható membránalkotó molekulák első számú jelöltjének a nucleus arcuatus-ban felnőtt korban is expresszálandó különleges glikoproteint, a PSA-NCAM-et tekintettük.

II. A PSA-NCAM és az ösztadiol hatás közti összefüggés

Az embrióban általánosan előforduló PSA-NCAM felnőtt korban is nagy mennyiségben van jelen a különböző fiziológiai ingerekre reverzibilis morfológiai átrendeződéssel válaszoló agyterületeken. Az egyik legjobban jellemzett ilyen terület a hipotalamuszban található nucleus supraopticus és paraventricularis (Theodosius, D.T. és Poulain, D.A. 1993). Elektronmikroszkópos vizsgálatok tanúsága szerint ezen nagysejtes

magokban a PSA-NCAM expresszálódik mind a neuronok, mind az asztrociták nyúlványain. Oxitocin illetve vazopresszin hatására az idegsejteket és az asztrogliaikat egyaránt érintő reverzibilis finomszerkezeti átalakulás megy végbe: laktáció illetve krónikus ozmotikus stressz alatt a neuronok glia borítása csökken és nagyobb számban jelennek meg közös (shared) szinapszisok, azaz ugyanaz az axon terminál^{is} egyszerre két idegsejt szómájával alkot szinapszist. Az inger megszűnését követően a szinapszisok a kontrollnak megfelelő állapotra rendeződnek vissza (Theodosius, D.T. és Poulain, D.A. 1984; Theodosius, D.T. és munkatársai, 1998). Azonban ha in vivo endo-N enzim injektálásával az egyik oldali nucleus supraopticus-ban eltávolítják a PSA-t, a laktáció és a dehidráció által kiváltott szinaptikus változások nem játszódnak le. Ugyanakkor az ellenoldali nucleus supraopticus, ahol továbbra is jelen van a nyúlványok felszínén a PSA-NCAM, a korábban dokumentált módon reagál az említett fiziológiás ingerekre (Theodosius, D.T. és munkatársai, 1999).

A hipotalamusz egy másik magja, a munkacsoportunk által régóta tanulmányozott nucleus arcuatus sok tekintetben rokon a nucleus supraopticus-szal. Az arcuatus-ban is reverzibilis szinapszis szám változás történik hormonális indukció hatására. Ez a terület azonban nem oxitocinra és vazopresszinre, hanem ösztradiolra érzékeny. Az ösztradiol szint emelkedése a nucleus supraopticus szinaptikus változásaival ellentétes irányú átrendeződést vált ki: az idegsejtek asztrocita borítása kiterjedtebbé válik, ezzel párhuzamosan a GABAerg axo-szomatikus szinapszisok száma csökken (Párducz, Á. és munkatársai, 1993). A nucleus arcuatus-ban is fennmarad a PSA-NCAM termelődése felnőtt korban, de itt még nem tisztázott, hogy az idegsejtek mellett az asztrociták felszínén is jelen van-e a molekula. Kísérleteink - melyekben egyrészt endo-N in vivo injektálásával eltávolítottuk az egyik oldali nucleus arcuatus-ból a PSA láncot, másrészt szintén in vivo a hosszú poliszíálsavat specifikusan felismerő antitestet kötöttünk a PSA-NCAM-hez - a nucleus supraopticus-ban

végzett vizsgálatokkal teljesen összhangban arra engednek következtetni, hogy a plaztikus változások lejátszódásához nélkülözhetelen a PSA-NCAM jelenléte az érintett sejtek felszínén. A PSA-NCAM molekulán belül a legfontosabb rész a hosszú polisziálsav lánc. Amennyiben ezt enzimatikusan eltávolítjuk a fehérjéről, miközben maga a fehérje váz érintetlen marad, illetve specifikus antitesttel leárnyékoljuk, a PSA-NCAM sejtadhéziót csökkentő hatása nem érvényesül. Ebből következően az egymással érintkező membrán felszínek nem tudnak elmozdulni, a meglévő sejt-sejt kapcsolatok elvesztik átrendeződésre való képességüket. Fontos kiemelni, hogy a szinaptikus változások a PSA-NCAM normál sejt felszíni jelenléte esetén csakis akkor játszódnak le, ha valamilyen inger kiváltja azokat. A nucleus arcuatus esetében ez az indukáló tényező az ösztadiol. Az ösztadiol hatását azonban csak a PSA-NCAM segítségével képes kifejteni, mivel a hosszú PSA lánc teszi lehetővé a membránok közti fizikai kapcsolatok átalakulását. A nucleus arcuatus ciklikus szinapszis szám változásához tehát legalább két faktor együttes jelenléte szükséges: az ösztadiol, mely előidézi a szinapszis szám csökkenést, valamint a PSA-NCAM molekuláé, mely permisszív szerepet tölt be a folyamatban. A PSA-NCAM elektronmikroszkópos lokalizációja közvetlenül bizonyíthatja, hogy a burkolt lefűződések által jelzett membránszerkezeti átalakulás érinti ezt a sejt felszíni molekulát, de elképzelhető egyéb, szintén a sejtek felszínén megtalálható molekulák részvétele is.

III. A PSA-NCAM permisszív szerepe a neuronális plaszticitásban

A PSA-NCAM szerkezeti átrendeződéseket megengedő funkciója arra utal, hogy a molekula nemcsak a hipotalamusz, hanem az egész idegrendszer plasztikus változásainak egyik alapfeltétele lehet. Gyakorlati szempontból különösen lényeges a sérülés utáni regenerációban betöltött szerepe. Ebben a tekintetben ígéretesnek tűnik a bulbus olfactorius PSA-NCAM immunreaktív struktúráinak reverzibilis kémiai deafferentációt követő tanulmányozása. Ilyen irányú kísérletek a közelmúltban kezdődtek meg munkacsoportunkban.

IV. Ösztradiol által kiváltott finomszerkezeti átrendeződések

Az ösztradiolnak már az embrionális illetve korai posztnatális élet során kulcsszerepe van az idegrendszer nemi különbségeinek kialakításában. Ezen eltérések az idegsejtek, sőt az asztrociták morfológiai átalakulásaiban nyilvánulnak meg, melyeknek természetesen működésbeli következményei vannak. A nucleus arcuatus területén észlelhető szexuális különbségek a neuronok számában, a mag térfogatában, valamint az axo-szomatikus és az axo-dendritikus szinapszisok számában nyilvánulnak meg. Hím felnőtt patkányban a nucleus arcuatus idegsejtjeinek száma, valamint ezzel összhangban a mag térfogata szignifikánsan nagyobb, mint a nőstényekben (Leal S. és munkatársai, 1998). A szinaptikus kapcsolatokat tekintve érdekes különbség figyelhető meg a két nem között: az axo-szomatikus szinapszisok száma kétszer annyi hímekben, mint nőstényekben, ugyanakkor az axo-dendritikus tüske szinapszisok száma a hímekben csak fele a nőstényekben kapott értéknek. Ez a különbség a nucleus arcuatus-ra specifikusan jellemző, a közvetlenül szomszédos ventromediális magban már nem figyelhető meg (Mong J.A. és munkatársai, 1999a). Az idegsejtek közti funkcionális kapcsolatokban jelentkező eltérések az asztrociták morfológiai változásaival pontos korrelációt mutatnak. Ha a születést követő második napon tesztoszteronnal kezelik a kísérleti

állatokat, a hím nemi hormon az aromatáz enzim segítségével ösztradiollá alakul át és a nucleus arcuatus-ban az asztrociták nyúlványosodását, azaz a jellegzetes csillag forma kialakulását idézi elő. Az asztrociták morfológiai átalakulásával párhuzamosan a dendrittüskék sűrűsége 37 %-kal csökken (Mong J.A. és munkatársai, 1999b).

A túskezinapszisok sokkal fogékonyabbak a plasztikus átrendeződésekre, mint a dendritek törzsén elhelyezkedők, ugyanis Matsumoto és munkatársai által végzett hasonló tesztoszteron kezelés nem befolyásolta a nem tuskén található axo-dendritikus kapcsolatokat. Ezzel szemben a dendrittüske szinapszisok száma ennek a munkacsoportnak az adatai szerint is szignifikánsan csökkent (Matsumoto A és Arai Y, 1981).

Az ösztradiol nemcsak az élet korai szakaszában vesz részt az idegsejtek és a velük kapcsolatban levő asztroglia morfológiájának alakításában, hanem jelentős finomszerkezeti átalakulásokat indukál felnőtt nőstény patkányokban is fiziológias körülmények között, mely jól modellezhető a munkacsoportunk által is alkalmazott ovariektomizált állatok 17 β -ösztradiollal történő kezelésével. Ezen szerkezeti átrendeződések egyrészt az axo-szomatikus szinapszisokat, másrészt az axo-dendritikus szinapszisokon belül a túskezinapszisokat érintik. Érdekes módon a neuronok sejttestjére érkező különféle transzmittereket tartalmazó axon terminálok^{is} közül kizárólag a gátló, azaz a GABAerg szinapszisok száma változik szignifikánsan, mégpedig csökken. Ezt a már 1993 óta ismert eredményt egészítettük ki jelen vizsgálatainkkal, melyek a 17 β -ösztradiolnak az axo-dendritikus szinapszisokra kifejtett hatását állították a figyelem középpontjába. Az axo-szomatikus szinapszisokkal ellentétben a az axo-dendritikus túske szinapszisok esetében éppen a nem GABAerg, azaz a serkentő szinaptikus bemenetek száma változik, és a folyamat iránya is ellentétes az axo-szomatikus szinapszisoknál megfigyelthez képest, mivel itt növekedés regisztrálható. Az elektrofiziológiai vizsgálatok eredményei egyértelműen arra utalnak, hogy ez az összehangolt

szinaptikus átrendeződés ugyanazon neuron szómáját és dendritfáját érinti. Az ingerlő bemenet fokozódása és a gátló afferentáció csökkenése következtében a nucleus arcuatus idegsejteinek aktivitása magas ösztadiol koncentráció esetében az alapszintű működéshez képest szignifikánsan megnő, melynek valószínűleg a luteinizáló hormon felszabadulásában lehet szerepe. Figyelemre méltó, hogy a serkentő afferentáció növekedéséhez csak a tüskeszinapszisok járulnak hozzá, melyek száma a dendritörzsön található szinapszisokhoz viszonyítva elenyésző, ugyanis az összesített axo-dendritikus szinapszis sűrűségben nem találtunk szignifikáns eltérést. Tehát a tüskeszinapszisok számának változása beleolvadt a jóval nagyobb arányban jelenlévő és az ösztadiolra nem reagáló dendritörzsön elhelyezkedő szinapszisok adataiba. A dendritörzs szinapszisainak általunk kimutatott viszonylagos merevsége és a tüskeszinapszisok nagyfokú plaszticitásra való hajlama összhangban van a korábbi irodalmi adatokkal.

A szinaptikus átrendeződés mechanizmusát tekintve az axo-szomatikus szinapszisok esetében igazoltuk, hogy a folyamatban nélkülözhetetlen szerepet tölt be a PSA-NCAM. Feltehető, hogy az axo-dendritikus szinapszisok is ennek analógiájára rendeződnek át, de ennek kísérletes bizonyítása a jövő feladata.

V. Az ösztadiol lehetséges hatásmechanizmusa

Az ösztadiol által kiváltott, az idegsejteket és az asztroglákat egyaránt érintő gyors és összehangolt szerkezeti átalakulás hatásmechanizmusa még számos tekintetben tisztázásra szorul. Jelen kísérleteink a membránszintű folyamatok lezajlásának módját világították meg részletesebben, elsősorban az egyik legjobban ismert sejtadhéziós molekula, a PSA-NCAM részvételének igazolásával.

Azonban az a régóta vitatott kérdés, mely szerint az ösztadiol elsődleges célpontjának a neuront vagy a gliát kell-e tekinteni, máig sem megoldott. Az idegsejtek dendritfájának morfológiai változásai, de főleg az ösztadiolnak a GABA szintézisét végző enzimre, a GAD-ra gyakorolt hatása (Krizbai, I. és munkatársai 2000), valamint az a tény, hogy az axonális növekedésben szerepet játszó GAP-43 expresszióját az ösztadiol fokozza (Lustig R.H. és munkatársai, 1991; Shughrue P.J. és Dorsa D.M. 1993), a neuronális célpontot látszik alátámasztani. Ugyanakkor a gliasejtek elsődleges szerepe mellett szólnak azok a kísérleti adatok, melyek szerint a 17β -ösztadiol növeli a GFAP expressziót, tenyészetben és in vivo is indukálja az asztrogliák nyúlványosodását, az asztrociták pedig olyan neuroaktív anyagokat bocsátanak ki, mint pl. az I. típusú inzulin-szerű növekedési faktor, melyről bizonyított, hogy részt vesz az ösztadiol indukált szinaptikus plaszticitásban (Garcia-Segura L.M. és munkatársai, 1999).

Az ösztadiol hatásmechanizmusának molekuláris szinten megoldandó problémája az a kérdés, hogy a szteroid hormonok hatásukat genomikus úton vagy közvetlenül a membránra gyakorolt hatással fejtik-e ki. A nem genomikus út hipotézist in vitro agyszeleten végzett elektrofiziológiai vizsgálatok eredményei támogatják (Li, C.S. és munkatársai, 1989; Yeoman, R.R. és Jenkins, A.J. 1989). Ezek a preparátumok krónikus ösztadiol kezelést kapott patkányokból készültek, ezért nem szolgáltatnak információt az ösztadiol hatásának időbeli lefolyására. Az általunk végzett elektrofiziológiai kísérletek a fagyasztva töréses morfológiai vizsgálatokkal összecsengően arra utalnak, hogy az ösztadiol hatása in vivo 25 perc alatt jelentkezik. Mosher és munkatársai (Mosher, K. és munkatársai, 1971) szerint a szteroidok igen gyorsan, 10-20 perc alatt képesek genomikus hatásukat kifejteni. Ennek alapján a nucleus arcuatus-on munkacsoportunk által végzett morfológiai és elektrofiziológiai kísérletek eredményei tükrözhetnek a genom szintjén bekövetkező változásokat. Ezek



közvetve vagy közvetlenül érinthetik a PSA-NCAM szintézisét, sejtfelszínre történő transzportját illetve internalizálódását, sőt, egyes neurotranszmitterek, mint pl. a GABA termelődését is.

KÍSÉRLETEINK EREDMÉNYEINEK RÖVID ÖSSZEGZÉSE

1. A 17β -ösztradiol hatása a patkány nucleus arcuatus-ban 25 perccel a kezelést követően már detektálható.
2. Egyszeri 17β -ösztradiol i.p. injekciót követően a nucleus arcuatus idegsejteinek membránjában szignifikánsan nagyobb számban jelennek meg vezikula lefűződések és a tüskés vezikulák száma is hasonló módon változik.
3. A 17β -ösztradiol csak PSA-NCAM jelenlétében képes indukálni a GABAerg axo-szomatikus szinapszisok visszahúzóását.
4. Az axo-szomatikus szinaptikus változással párhuzamosan a nem GABAerg axo-dendritikus tüskeszinapszisok száma 17β -ösztradiol hatására megnő.
5. A PSA-NCAM normál expressziója esetén a 17β -ösztradiol által kiváltott szinaptikus átrendeződések funkcionálisan a neuronok fokozott tüzelési aktivitásában nyilvánulnak meg.
6. A trigeminális illetve szaglórendszerből a nucleus arcuatus-ba érkező afferentáció az ösztradioltól függetlenül befolyásolja a neuronok tüzelési mintázatát.

IRODALMI HIVATKOZÁSOK

- Abrous, D.N., Montaron, M.F., Petry, K.G., Rougon, G., Darnaudery, M., Le-Moel, M., Mayo, W.: Decrease in highly polysialylated neuronal cell adhesion molecules and in spatial learning during ageing are not correlated. *Brain Res.* 1997, 744:285-292.
- Akeson, R.A., Wujek, J.R., Roe, S., Warren, S.L., Small, S.J.: Smooth muscle cells transiently express NCAM. *Mol. Brain Res.* 1988, 4:107-120.
- Aoki, K., Nakahara, Y., Yamada, S., Eto, K.: Role of polysialic acid on outgrowth of rat olfactory receptor neurons. *Mech Dev*, 1999, 85:103-110.
- Arami, S., Jucker, M., Schachner, M., Welzl, H.: The effect of continuous intraventricular infusion of L1 and NCAM antibodies on spatial learning in rats. *Behav. Brain Res.* 1996, 81:81-87.
- Barbeau, D., Liang, J.J., Robitalille, Y., Quirion, R., Srivastava, L.K.: Decreased expression of the embryonic form of the neural cell adhesion molecule in schizophrenic brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995, 92:2785-2789.
- Becker, C.G., Becker, T., Roth, G.: Distribution of NCAM-180 and polysialic acid in the developing tectum mesencephali of the frog *Discoglossus pictus* and the salamander *Pleurodeles waltl*. *Cell. Tiss. Res.* 1993, 272:289-301.
- Becker, C.G., Artola, A., Gerardy-Schachn, R., Becker, T., Welzl, H., Schachner, M.: The polysialic acid modification of the neural cell adhesion molecule is involved in spatial learning and hippocampal long-term potentiation. *J. Neurosci. Res.* 1996, 45:143-152.
- Biegón, A., Fischette, C.T., Rainbow, T.C., McEwen, B.S.: Serotonin receptor modulation by estrogen in discrete brain nuclei. *Neuroendocrinology* 1982, 35:287-291.
- Bonfanti, L., and Theodosis, D.T.: Expression of polysialylated neural cell adhesion molecule by proliferating cells in the subependymal layer of the adult rat, in its rostral extension and in the olfactory bulb. *Neuroscience* 1994, 62:291-305.
- Bonfanti, L., Poulain, D.A. and Theodosis, D.T.: Radial glia-like cells in the supraoptic nucleus of the adult rat. *J. Neuroendocrinol.*, 1993 5:1-5.
- Bonfanti, L., Olive, S., Poulain, D.A., Theodosis, D.T.: Mapping of the distribution of polysialylated neural cell adhesion molecule throughout the central nervous system of the adult rat: an immunohistochemical study. *Neuroscience*, 1992, 49:419-436.
- Bonfanti, L., Merighi, A., Theodosis, D.T.: Dorsal rhizotomy induces transient expression of the highly sialylated isoform of the neural cell adhesion molecule in neurons and astrocytes of the adult rat spinal cord. *Neuroscience* 1996, 74: 619-623.

- Carpenter, M. B.: The Hypothalamus. In : Core text of neuroanatomy., Ed. William & Wilkins, 1991.
- Chazal, G., Durbec, P., Jankovski, A., Rougon, G., Cremer, H.: Consequences of neural cell adhesion molecule deficiency on cell migration in the rostral migratory stream of the mouse. *J. Neurosci.* 2000, 20:1446-1457.
- Chen, A., Haines, S., Maxson, K., Akeson, R.A.: VASE exon expression alters NCAM-mediated cell-cell interactions. *J. Neurosci. Res.* 1994, 38:483-492.
- Chronwall, B.M.: Anatomy and physiology of the neuroendocrine arcuate nucleus. 1985, *Peptides*, 6, Suppl. 2, 1-11.
- Chuong, C.M. and Edelman, G.M.: Alterations in neural cell adhesion molecules during development of different regions of the nervous system. *J. Neurosci.* 1984, 4:2354-2368.
- Cremer, H., Chazal, G., Goridis, C., Represa, A.: NCAM is essential for axonal growth and fasciculation in the hippocampus. *Mol. Cell. Neurosci.* 1997, 8:323-335.
- Crossin, K.L., Edelman, G.M., Cunningham, B.A.: Mapping of three carbohydrate attachment sites in embryonic and adult forms of the neural cell adhesion molecule (NCAM). *J. Cell Biol.* 1984, 99:1848-1855.
- Cunningham, B.A., Hemperly, J., Murray, B.A., Prediger, A.E., Brackenbury, R., Edelman, G.M.: Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation and alternative RNA splicing. *Science* 1987, 236:799-806.
- Cunningham, B.A.: Cell adhesion molecules as morphoregulators. *Curr. Opinion in Cell Biol.* 1995, 7:628-633.
- D'Eustachio, P., Owens, G.C., Edelman, G.M. and Cunningham, B.A.: Chromosomal location of the gene encoding the neural cell adhesion molecule (N-CAM) in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1985, 82:7631-7635.
- Doyle, E., Nolan, P.M., Bell, R., Regan, C.M.: Intraventricular infusions of anti-neural cell adhesion molecules in a discrete posttraining period impair consolidation of a passive avoidance response in the rat. *J. Neurochem.* 1992, 59:1570-1573.
- Dubois, C., Okandze, A., Figarella-Branger, D., Rampini, C., Rougon, G.: A monoclonal antibody against Meningococcus group B polysaccharides used to immunocapture and quantify polysialylated NCAM in tissues and biological fluids. *J. Immunol. Methods* 1995, 181:125-135.
- Dusart, I., Morel, M.P., Wehrle, R., Sotelo, C.: Late axonal sprouting of injured Purkinje cells and its temporal correlation with permissive changes in the glial scar. *J. Comp. Neurol.* 1999, 408: 399-418.

- Fang, J. and Hall, B.K.: Differential expression of neural cell adhesion molecule (NCAM) during osteogenesis and secondary chondrogenesis in the embryonic chick. *Int. Dev. Biol.* 1995, 39:519-528.
- Figarella-Branger, D., Dubois, C., Chauvin, P., De-Victor, B., Gentet, J.C., Rougon, G.: Correlation between polysialic neural cell adhesion molecule levels in CSF and medulloblastoma outcomes. *J. Clin. Oncol.* 1996, 14:2066-2072.
- Finne, J., Finne, U., Deagostini-Bazin, H., Goridis, C.: Occurrence of alpha2,8-linked polysialosyl units in a neural cell adhesion molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1983, 112:482-487.
- Fredette, B., Rutishauser, U., Landmesser, L.: Regulation and activity-dependence of N-cadherin, NCAM isoforms and polysialic acid on chick myotubes during development. *J. Cell Biol.* 1993, 123:1867-1888.
- Fox, G.B., Kennedy, N., Regan, C.M.: Polysialylated neural cell adhesion molecule expression by neurons and astroglial processes in the rat dentate gyrus declines dramatically with increasing age. *Int. J. Dev. Neurosci.* 1995, 13:663-672.
- Garcia-Segura, L.M., Olmos, G., Tranque, P. and Naftolin, F.: Rapid effects of gonadal steroids upon hypothalamic neuronal membrane ultrastructure. *J. of Steroid Biochemistry*, 1987, 27:615-623.
- Garcia-Segura, L.M., Hernandez, P., Olmos, G., Tranque, P. A. and Naftolin, F.: Neuronal membrane remodelling during the oestrus cycle: a freeze-fracture study in the arcuate nucleus of the rat hypothalamus. *J. Neurocytology*, 1988, 17:377-383.
- Garcia-Segura, L.M., Pérez, J., Tranque, P.A., Olmos, G. and Naftolin, F.: Sex differences in plasma membrane concanavalin A binding in the rat arcuate neurons. *Brain Res. Bull.* 1989, 22:651-655.
- Garcia-Segura, L.M., Chowen, J.A., Párducz, A. and Naftolin, F.: Gonadal hormones as promoters of structural plasticity: cellular mechanisms. *Progress in Neurobiology*, 1994, 44:279-307.
- Garcia-Segura, L.M., Luquín, S., Párducz, A. and Naftolin, F.: Gonadal hormone regulation of glial fibrillary acidic protein immunoreactivity and glial ultrastructure in the rat neuroendocrine hypothalamus. *Glia*, 1994, 10:59-69.
- Garcia-Segura, L.M., Canas, B., Párducz, A., Rougon, G., Theodosis, D.T., Naftolin, F., Torres-Aleman, I.: Estradiol promotion of changes in the morphology of astroglia growing in culture depends on the expression of polysialic acid of neuronal membranes. *Glia*, 1995, 13:209-216.

- Garcia-Segura, L. M., Naftolin, F., Hutchison J.B., Azcoita, I., Chowen, J.A.: Role of astroglia in estrogen regulation of synaptic plasticity and brain repair. *J. Neurobiol.* 1999, 40:574-584.
- Grinspan, J.B. and Franceschini, B.: Platelet-derived growth factor is a survival factor for PSA-NCAM+ oligodendrocyte pre-progenitor cells. *J. Neurosci. Res.* 1995, 41:540-551.
- Hayrinen, J., Jennings, H., Raff, H.V., Rougon, G., Hanai, N., Gerardy-Schachn, R., Finne, J.: Antibodies to polysialic acid and its N-propyl derivate: binding properties and interaction with human embryonal glycopeptides. *J. Infect. Dis.* 1995, 171:1481-1490.
- He, H.T., Finne, J., Goridis, C.: Biosynthesis, membrane association and release of NCAM 120, a phosphatidylinositol-linked form of the neural cell adhesion molecule. *J. Cell. Biol.* 1987, 105:2489-2500.
- Hildebrandt, H., Becker, C., Müräu, M., Gerardy-Schahn, R., Rahmann, H.: Heterogeneous expression of the polysialyltransferases ST8Sia II and ST8Sia IV during postnatal rat brain development. *J. Neurochem.* 1998, 71:2339-2348.
- Iglesias, T., Caubin, J., Stunnenberg, H.G., Zaballos, A., Bernal, J., Munoz, A.: Thyroid hormone-dependent transcriptional repression of neural cell adhesion molecule during brain maturation. *EMBO J.* 1996, 15:4307-4316.
- Kasper, C., Stahlhut, M., Berezin, V., Maar, T.E., Edvarsen, K., Kiselyov, V.V., Soroka, V., Bock, E.: Functional characterization of NCAM fibronectin type III domains: demonstration of modulatory effects of the proline-rich sequence encoded by alternatively spliced exons. *J. Neurosci. Res.* 1996, 46:173-186.
- Kiss, J.Z., Wang, C., Rougon, G.: Nerve-dependent expression of high polysialic acid neural cell adhesion molecule in neurohypophysial astrocytes of adult rats. *Neurosci.* 1993, 53:213-222.
- Kiss, J.Z., Wang, C., Olive, S., Rougon, G., Lang, J., Baetens, D., Harry, D., Pralong, W.F.: Activity-dependent mobilization of the adhesion molecule polysialic NCAM to the cell surface of neurons and endocrine cells. *EMBO J.* 1994, 13: 5284-5292.
- Kiss, J.Z.: A role of adhesion molecules in neuroglial plasticity. *Mol. Cell Endocrinol.* 1998, 140:89-94.
- Krizbai, I., Katarova, Z., Szabo, G., Parducz, A., Wolff J.R.: Modulation of the truncated GAD25 by estrogen in the olfactory bulb of adult rats. *Neuroreport*, 2000, 11:791-794.
- Leal, S., Andrade, J.P., Paula-Barbosa, M.M. Madeira, M.D.: Arcuate nucleus of the hypothalamus: effects of age and sex. *J. Comp. Neurol.* 1998, 401:65-88.
- Lee, Y.S. and Chuong, C.M.: Adhesion molecules in skeletogenesis:I. Transient expression of neural cell adhesion molecules (NCAM) in osteoblasts during endochondral and intramembranous ossification. *J. Bone Miner. Res.* 1992, 7:1435-1446.

- Li, C.S., Kaba, H. and Saito, H.: Excitatory influence of the accessory olfactory bulb on tuberoinfundibular arcuate neurons of female mice and its modulation by oestrogen. *Neuroscience*, 1989, 29:201-208.
- Lustig, R.H., Sudol, M., Pfaff, D.W., Federoff, H.J.: Estrogenic regulation and sex dimorphism of growth-associated protein 43 kDa (GAP-43) messenger RNA in the rat. *Brain Res Mol Brain Res* 1991, 11:125-132.
- Matsumoto, A. and Arai, Y.: Effect of androgen on sexual differentiation of synaptic organization in the hypothalamic arcuate nucleus: an ontogenetic study. *Neuroendocrinology*. 1981, 33:166-169.
- Michalides, R., Kwa, B., Springall, D., van Zandwijk, N., Koopman, J., Hilkens, J., Mooi, W.: NCAM and lung cancer. *Int. J. Cancer Suppl.*, 1994, 8:34-37.
- Miragall, F., Kadmon, G., Husman, M., Schachner, M.: Expression of cell adhesion molecules in the olfactory system of the adult mouse: presence of the embryonic form of NCAM. *Dev. Biol.* 1988, 129:516-531.
- Moftaqir, A., Langley, K., Boutroy, M.J.: Immunocytochemical localization of NCAM and catecholamine-synthetising enzymes in rabbit intra- and extraadrenal chromaffin tissue. *Histochem. J.* 1996, 28:661-669.
- Mong, J.A., Glaser, E., McCarthy M.M.: Gonadal steroids promote glial differentiation and alter neuronal morphology in the developing hypothalamus in a regionally specific manner. *J. Neurosci.* 1999a, 19:1464-1472.
- Mong, J.A. and McCarthy, M.M.: Steroid-induced developmental plasticity in hypothalamic astrocytes: implications for synaptic patterning. *J. Neurobiol.* 1999b, 40:602-619.
- Moore, S.E. and Walsh, F.S.: Specific regulation of NCAM/D2-CAM cell adhesion molecule during skeletal muscle development. *EMBO J.* 1985, 4:623-630.
- Mosher, K., Young, D. and Munck, A.: Evidence for irreversible, actinomycin D-sensitive, and temperature-sensitive steps following binding of cortisol to glucocorticoid receptors and preceding effects on glucose metabolism in rat thymus cells. *J. Biol. Chem.*, 1971, 246:264-259.
- Mühlenhoff, M., Eckhardt, M., Bethe, A., Frosch, M., Gerardy-Schahn, R.: Polysialylation of NCAM by a single enzyme. *Current Biology*, 1996, 6:1188-1191.
- Mühlenhoff, M., Eckhardt, M., Bethe, A., Frosch, M., Gerardy-Schahn, R.: Autocatalytic polysialylation of polysialyltransferase-1. *EMBO J.* 1996, 15:6943-6950.
- Muller, D., Wang, C., Skibo, G., Toni, N., Cremer, H., Calaora, V., Rougon, G., Kiss, J.Z.: PSA-NCAM is required for activity-induced synaptic plasticity. *Neuron* 1996, 17:413-422.

- Nadasdy, T., Johnson, D.L., Bane, B.L., Weinberg, A., Verani, R., Silva, F.G.: Congenital mesoblastic nephroma: an immunohistochemical and lectin study. *Hum. Pathol.* 1993, 24:413-419.
- Neale, S.A. and Trasler, D.G.: Early sialylation on NCAM in *spotch* neural tube defect mouse embryos. *Teratology* 1994, 50:118-124.
- Nguyen, C., Mattei, M.G., Mattei, J.F., Santoni, M.J., Goridis, C. and Jordan, B.R.: Localization of the human NCAM gene to band q23 of chromosome 11: the third gene coding for a cell interaction molecule mapped to the distal portion of the long arm of chromosome 11. *J. Cell Biol.* 1986, 102: 711-715.
- Obara, N. and Takeda, M.: Expression of the neural cell adhesion molecule (NCAM) during second- and third-molar development in the mouse. *Anat. Embryol. Berl.* 1993, 188:13-20.
- Olmos, G., Naftolin, F., Perez, J., Tranque, P.A. and Garcia-Segura, L.M.: Synaptic remodeling in the rat arcuate nucleus during the estrous cycle. *Neurosci.*, 1989, 32:663-667.
- Olsen, M., Zuber, C., Roth, J., Linnemann, D., Bock, E.: The ability to re-express polysialylated NCAM in soleus muscle after denervation is reduced in aged rats compared to young adult rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* 1995, 13:97-104.
- Ong, E., Nakayama, J., Angata, K., Reyes, L., Katsuyama, T., Arai, Y., Fukuda, M.: Developmental regulation of polysialic acid synthesis in mouse directed by two polysialyltransferases, PST and STX. *Glycobiology*, 1998, 8: 415-424.
- Ono, K., Tomasiewicz, H., Magnuson, T., Rutishauser, U.: N-CAM mutation inhibits tangential neuronal migration and is phenocopied by enzymatic removal of polysialic acid. *Neuron*, 1994, 13: 595-609.
- Paz, D.A., Alonso, D.G., Pisano, A., Casco, V.H., Knudsen, K.A., Peralta-Soler, A.: Expression of isoforms of the neural cell adhesion molecule (NCAM) and polysialic acid during the development of the *Bufo arenarum* olfactory system. *Int. Dev. Biol.* 1995, 39:1005-1013.
- Párducz, A., Pérez, J. and Garcia-Segura, L.M.: Estradiol induces plasticity of GABAergic synapses in the hypothalamus. *Neuroscience*, 1993, 53:395-401.
- Párducz, Á., Szilágyi, T., Hoyk, S., Naftolin, F. and Garcia-Segura, L.M.: Neuroplastic changes in the hypothalamic arcuate nucleus: the estradiol effect is accompanied by increased exoendocytotic activity of neuronal membranes. *Cell. Mol. Neurobiology*, 1996, 16:259-269.
- Perera, A.D., Lagenaur, C.F., Plant, T.M.: Postnatal expression of polysialic acid-neural cell adhesion molecule in the hypothalamus of the male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Endocrinology*, 1993, 133:2729-2735.

- Pfaff, D.W. and Keiner, M.: Atlas of estradiol concentrating cells in the central nervous system of the female rat. *J. Comp. Neurol.*, 1973, 151: 121-158.
- Phillips, G.R., Krushel, L.A., Crossin, K.L.: Developmental expression of two rat sialyltransferases that modify the neural cell adhesion molecule, N-CAM. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 1997, 102:143-155.
- Pietras, R.J. and Szego, C.M.: Endometrial cell calcium and oestrogen action. *Nature*, 1975, 253:357-359.
- Pollerberg, E.G., Schachner, M., Davoust, J.: Differentiation state-dependent surface mobilities of two forms of the neural cell adhesion molecule. *Nature* 1986, 324:462-465.
- Pollerberg, E.G., Burridge, K., Krebs, K.E., Goodman, S.R., Schachner, M.: The 180 kD component of the neural cell adhesion molecule NCAM is involved in cell-cell contacts and cytoskeleton-membrane interactions. *Cell Tiss. Res.* 1987, 250:227-236.
- Poltorak, M., Frye, M.A., Wright, R., Hemperly, J.J., George, M.S., Payaglia, P.J., Jerrels, S.A., Post, R.M., Freed, W.J.: Increased neural cell adhesion molecule in the CSF of patients with mood disorder. *J. Neurochem.* 1996, 66:1532-1538.
- Prevot, V., Croix, D., Bouret, S., Dutoit, S., Tramu, G., Stefano, G.B., Beauvillain, J.C.: A definitive evidence for the existence of morphological plasticity in the external zone of the median eminence during the rat estrous cycle: implication of neuro-glio-endothelial interactions in gonadotropin-releasing hormone release. *Neuroscience* 1999, 94:809-819.
- Rao, Y., Wu, X.F., Gariepy, J., Rutishauser, U., Siu, C.H.: Identification of a peptide sequence involved in homophilic binding in the neural cell adhesion molecule NCAM. *J. Cell Biol.*, 1992, 118:937-949.
- Rambo, C.O. and Szego, C.M.: Estrogen action at endometrial membranes: alterations in luminal surface detectable within seconds. *J. of Cell Biology* (1983) 97:679-685.
- Regan, C.M.: Regulation of neural cell adhesion molecule sialylation state. *Int. J. Biochem.*, 1991, 23:513-523.
- Rosen, S.D. and Bertozzi, C.R.: The selectins and their ligands. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1994, 6:663-673.
- Rougon G, Dubois C, Buckley N, Magnani JL, Zollinger W: A monoclonal antibody against meningococcus group B polysaccharides distinguishes embryonic from adult NCAM *J. Cell. Biol.*, 1986, 103: 2429-2437.

- Rusakov, D.A., Davies, H.A., Stewart, M.G., Schachner, M.: Clustering and co-localization of immunogold double labelled neural cell adhesion molecule isoforms in chick forebrain. *Neurosci. Lett.* 1995, 183: 50-53.
- Rutishauser, U. and Landmesser, L: Polysialic acid in the vertebrate nervous system: a promoter of plasticity in cell-cell interactions. *Trends Neurosci.*, 1996, 19:422-427.
- Sandig, M., Rao, Y., Siu, C.H.: The homophilic binding site of the neural cell adhesion molecule NCAM is directly involved in promoting neurite outgrowth from cultured neural retinal cells. *J. Biol. Chem.*, 1994, 269:14841-14848 .
- Satoh, M. and Takeuchi, M.: Induction of NCAM expression in mouse olfactory keratin-positive basal cells in vitro. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 1995, 87:111-119.
- Schwanzel-Fukuda, M., Abraham, S., Crossin, K.L., Edelman, G.M., Pfaff, D.W.: Immunocytochemical demonstration of neural cell adhesion molecule (NCAM) along the migration route of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons in mice. *J. Comp. Neurol.* 1992, 321:1-18.
- Schwanzel-Fukuda, M. and Pfaff, D.W.: Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and neural cell adhesion molecule (NCAM) immunoreactivity in development of the forebrain and reproductive system. *Ann. Endocrinol. Paris*, 1994, 55:235-241.
- Schwanzel-Fukuda, M., Reinhard, G.R., Abraham, S., Crossin, K.L., Edelman, G.M., Pfaff, D.W.: Antibody to neural cell adhesion molecule can disrupt the migration of luteinizing hormone-releasing hormone neurons into the mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 1994, 342:174-185.
- Schwanzel-Fukuda, M., Crossin, K.L., Pfaff, D.W., Bouloux, P.M., Hardelin, J.P., Petit, C.: Migration of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons in early human embryos. *J. Comp. Neurol.* 1996, 366:547-557.
- Seki, T. and Arai, Y.: Temporal and spacial relationships between PSA-NCAM-expressing, newly generated granule cells, and radial glia-like cells in the adult dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 1999, 410:503-513.
- Shapiro, L., Fannon, A.M., Kwong, P.D., Thompson A., Lehman MS, Grübel G., Legrand JF, Als-Nielsen J, Colman DR, Hendrickson WA: structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature* 1995, 374:327-337.
- Shults, C.W. and Kimber, T.A.: Mesecephalic dopaminergic cells exhibit increased density of neural cell adhesion molecule and polysialic acid during development. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 1992, 65:161-172.
- Shughrue, P.J. and Dorsa, D.M.: Estrogen modulates the growth-associated protein GAP-43 (Neuromodulin) mRNA in the rat preoptic area and basal hypothalamus. *Neuroendocrinology.* 1993, 57:439-447.

- Somogyi, P. and Hodgson, A.J. : Antisera to γ -aminobutyric acid. III. Demonstration of GABA in Golgi-impregnated neurons and in conventional electron microscopic sections of cat striate cortex. *J. Histochem. Cytochem.* 1985, 33, 249-257.
- Sterio, D.C.: The unbiased estimation of number and sizes in arbitrary particles using the disector. *J. Microscopy*, 1984. 134, 127-136.
- Storms, S.D., Anvekar, V.M., Adams, L.D., Murray, B.A.: Heterophilic Ncam-mediated cell adhesion to proteoglycans from chick embryonic brain membranes. *Exp. Cell. Res.* 1996, 223: 385-394.
- Szele, F.G., Chesselet, M.F.: Cortical lesions induce an increase in cell number and PSA-NCAM expression in the subventricular zone of adult rats. *J. Comp. Neurol.* 1996, 368:439-454.
- Tang, J. and Landmesser, L.: Reduction of intramuscular nerve branching and synaptogenesis is correlated with decreased motoneuron survival. *J. Neurosci.* 1993, 13: 3095-3103.
- Teyler, T.J., Vardaris, R.M., Lewis, D. and Rawitch, A.B.: Gonadal steroids: effects on excitability of hippocampal pyramidal cells. *Science* (1980) 209:1017-1019.
- Theodosis, D.T. and Poulain, D.A.: Evidence for structural plasticity in the supraoptic nucleus of the rat hypothalamus in relation to gestation and lactation. *Neuroscience*, 1984, 11: 183-193.
- Theodosis, D.T., Rougon, G., Poulain, D.A.: Retention of embryonic features by an adult neuronal system capable of plasticity: Polysialylated neural cell adhesion molecule in the hypothalamo-neurohypophysial system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, 88:5494-5498.
- Theodosis, D.T. and Poulain, D.A.: Activity-dependent neuronal-glia and synaptic plasticity in the adult mammalian hypothalamus. *Neuroscience* (1993) 57:501-533.
- Theodosis, D.T., El Majdoubi, M., Pierre, K., Poulain, D.A.: Factors governing activity-dependent structural plasticity of the hypothalamo-neurohypophysial system. *Cell. Mol. Neurobiol.* , 1998, 18: 285-298.
- Theodosis, D.T., Bonhomme, R., Vitiello, S., Rougon, G., Poulain, D.A.: Cell surface expression of polysialic acid on NCAM is a prerequisite for activity-dependent morphological neuronal and glial plasticity. *J. of Neuroscience* ,1999, 19:10228-10236.
- Tomasiewicz, H., Ono, K., Yee, D., Thompson, C., Goridis, C., Rutishauser, U., Magnuson, T.: Genetic deletion of a neural cell adhesion molecule variant (N-CAM-180) produces distinct defects in the central nervous system. *Neuron* 1993, 11:1163-1174.

- Treloar, H., Tomaszewicz, H., Magnuson, T., Key, B.: The central pathway of primary olfactory axons is abnormal in mice lacking the N-CAM-180 isoform. *J. Neurobiol.*, 1997,32:643-658.
- Vincent, S.R., Hökfelt, T., Wu, J.-Y.: GABA neuron systems in hypothalamus and the pituitary gland. *Neuroendocrinology*, 1982, 34:117-125.
- Wang, C., Rougon, G., Kiss, J.Z.: Requirement of polysialic acid for the migration of the O-2A glial progenitor cell from neurohypophyseal explants. *J. Neurosci.*, 1994, 14:4446-4457.
- Wang, C., Pralong, W.F., Schulz, M.F., Rougon, G., Aubry, J.M., Pagliusi, S., Robert, A., Kiss, J.Z.: Functional N-methyl-D-aspartate receptors in O-2A glial precursor cells: a critical role in regulating polysialic acid-neural cell adhesion molecule expression and cell migration. *J. Cell. Biol.*, 1996, 135:1565-1581.
- Watanabe, M., Timm, M., Fallah-Najmabadi, H.: Cardiac expression of polysialylated NCAM in the chicken embryo: correlation with the ventricular conduction system. *Dev. Dyn.* 1992, 194:128-141.
- Wharton, J., Gordon, L., Walsh, F.S., Flanigan, T.P., Moore, S.E., Polak, J.M.: Neural cell adhesion molecule (N-CAM) expression during cardiac development in the rat. *Brain Res.* 1989, 483:170-176.
- Wood, G.K., Liang, J.J., Flores, G., Ahmad, S., Quirion, R., Srivastava, L.K.: Cloning and in situ hybridization analysis of the expression of polysialyltransferase mRNA in the developing and adult rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1997, 51:69-81.
- Yang, P., Major, D., Rutishauser, U.: Role of charge and hydration in effects of polysialic acid on molecular interactions and between cell membranes. *J. Biol. Chem.* 1994, 269: 23039-23044.
- Yeoman, R.R. and Jenkins, A.J.: Arcuate area of the female rat maintained in vitro exhibits increased afternoon electrical activity. *Neuroendocrinol.* 1989, 49:144-149.
- Yoshida, K., Tobet, S.A., Crandall, J.E., Jimenez, T.P., Schwarting, G.A.: The migration of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in the developing rat is associated with a transient, caudal projection of the vomeronasal nerve. *J. Neurosci.* 1995, 15:7769-7777.
- Zhang, Y., Campbell, G., Anderson, P.N., Martini, R., Schachner, M., Lieberman, A.R.: molecular basis of interactions between regenerating adult rat thalamic axons and Schwann cells in peripheral nerve grafts I. Neural cell adhesion molecules. *J. Comp. Neurol.* 1995, 361:193-209.
- Zuber, C., Lackie, P.M., Catterall, W.A., Roth, J.: Polysialic acid associated with sodium channels and neural cell adhesion molecule NCAM in adult rat brain. *J. Biol. Chem.* 1992, 267: 9965-9971.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ SAJÁT KÖZLEMÉNYEK ÉS ELŐADÁSOK

I. Közlemények

- Párducz, Á., Szilágyi, T., Hoyk, S., Naftolin F & Garcia-Segura, L.M.: Neuroplastic changes in the hypothalamic arcuate nucleus: the estradiol effect is accompanied by increased exoendocytotic activity of neuronal membranes.
Cellular and Molecular Neurobiology, 16: 259-269 (1996)
- Kis, Zs., Horváth, Sz., Hoyk, Zs., Toldi, J. & Párducz, Á.: Estrogen effects on arcuate neurons in rat. An in situ electrophysiological study.
Neuroreport, 10: 3649-3652 (1999)
- Hoyk, Zs., Párducz, Á. & Theodosis, D.T.: The highly sialylated isoform of the neural cell adhesion molecule is required for estradiol-induced morphological synaptic plasticity in the adult arcuate nucleus.
European Journal of Neuroscience, közlésre benyújtva.

II. Előadások

- Hoyk, Zs., Párducz, Á., Poulain, D.A. & Theodosis, D.T.: Transient neuronal and glial expression of the polysialylated isoform of the neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM) following stab wounds to the adult brain.
2nd Meeting of European Neuroscience, (1996) Strasbourg, France
- Hoyk, Zs., Párducz, Á., Garcia-Segura, L.M. & Theodosis, D.T.: The role of PSA-NCAM in estradiol-induced structural synaptic plasticity in the adult arcuate nucleus.
Polysialic acid; Biochemistry, Cell biology and Diseases, (1998) Ile des Embiez, France
- Hoyk, Zs., Párducz, Á. & Garcia-Segura, L.M.: Nemi különbségek kialakulása a nucleus arcuatus szinaptikus kapcsolataiban.
Magyar Idegtudományi Társaság V. konferenciája, (1998) Debrecen
- Párducz, Á., Hoyk, Zs. & Theodosis, D.T.: A PSA-NCAM szerepe az ösztradiol által kiváltott plasztikus változásokban.
Magyar Idegtudományi Társaság V. konferenciája, (1998) Debrecen
- Párducz, Á & Hoyk, Zs.: A nemi hormonok és az idegrendszeri plaszticitás: lehetséges sejt-és molekuláris szintű mechanizmusok.
Straub-napok, (1999) Szeged
- Hoyk, Zs. & Párducz, Á.: A PSA-NCAM szerepe a hypothalamus plasztikus folyamataiban.
Straub-napok, (1999) Szeged



AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ NEM KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK ÉS ELŐADÁSOK

I. Közlemények

- Hoyk, Zs., Lago-Schaaf, T. Zippel H.P. Füzesi, G. & Halász, N.: Fast regeneration of the olfactory nerve in goldfish: fine structure and behaviour.
Journal für Hirnforschung, 34: 461-465 (1993)
- Hoyk, Zs., Szilágyi, T. & Halász, N.: Modulation by thyroid hormones of the development of external plexiform layer in the rat olfactory bulb.
Neurobiology, 4: 45-57 (1996)

II. Előadások

- Halász, N. & Hoyk, Zs.: Pajzsmirigy-hormonszint és idegi szerveződés: kísérleti rendszerünk, problémáink és első eredményeink a patkány szaglórészén.
A Magyar Anatómusok, Hisztológusok és Embriológusok Társaságának 7. kongresszusa, (1991) Szeged
- Hoyk, Zs., Vecsernyés, M. & Halász, N.: Effect of thyroid hormones on the development of the rat olfactory bulb: a morphometric study.
Xth Congress of ECRO, (1992) Munich, Germany
- Lago-Schaaf, T., Hoyk, Zs., Zippel, H.P., Füzesi, G. & Halász, N.: Fast behavioral and morphological regeneration in the olfactory bulb of the goldfish, *Carassius auratus* L.
Xth Congress of ECRO, (1992) Munich, Germany
- Hoyk, Zs., Vecsernyés, M. & Halász, N.: Hypo- and hyperthyroidism causes changes in the olfactory bulb morphology but not in the expression of microtubule-associated protein 2.
16th Annual Meeting of the European Neuroscience Association, (1993) Madrid, Spain
- Hoyk, Zs., Krizbai, I., Varga, Cs., Péterfi, Z. & Párducz, Á.: GAP-43 expresszió hormonális regulációja bulbus olfactoriusban.
IBRO-MITT Millenniumi Konferencia, (2000) Budapest

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

✧

Köszönetet szeretnék mondani elsősorban témavezetőimnek, Dr. Dionysia Theodosiának és Dr. Párducz Árpádnak szakmai tanácsaikért és támogatásukért. Köszönöm a Szegedi Biológiai Központ Biofizikai Intézet Molekuláris Neurobiológiai Csoportja, valamint a Bordeaux 2 Egyetem Neuroendokrinológiai Laboratóriuma minden tagjának a barátságos, alkotó szellemű munkahelyi légkört. Hálával tartozom Mme. René Bonhomme-nak a műtétekben nyújtott technikai segítségéért és a fénymikroszkópos immunhisztokémiai reakciókhoz adott gyakorlati útmutatásaiért; Ngo Thi Khue Dung-nak az elektronmikroszkópos munkában való közreműködéséért. Köszönöm a bordeaux-i laboratórium PhD hallgatóinak, Karin Pierre-nek, Mohammed El Majdoubi-nak és Pascal Jourdain-nek, hogy egyenrangú sorstársakként, egymást segítve küzdöttünk a doktoranduszok előtt álló feladatokkal, valamint a szegedi Molekuláris Neurobiológiai Csoportban dolgozó PhD hallgatóknak és szakdolgozóknak, Obál Izabellának, Adalbert Róbertnek, Varga Csabának és Péterfi Zoltánnak, hogy erőt adtak a munka befejezéséhez. Külön köszönettel tartozom a bordeaux-i laboratórium vezetőjének, Dr. Dominique Poulain-nek, aki a szakmai feltételek biztosításán túl az adminisztrációs akadályok leküzdésében is segítségemre volt.

A DISSZERTÁCIÓ ÖSSZEFOGLALÁSA

Az élet kihívásaival az élőlények csak úgy tudnak megbirkózni, ha a megfelelő információkat érzékelik és feldolgozzák. A külső és belső környezet változó hatásaira a gerinces szervezetek a központi idegrendszerüket alkotó több millió idegsejtnek köszönhetően rendkívül jól szervezett módon reagálnak, ugyanakkor a neuronok maguk is alkalmazkodnak az új körülményekhez. Ez azt jelenti, hogy az ingerületek nemcsak eljutnak a megfelelő idegsejtekhez, hanem meg is változtatják a közöttük létező kommunikációs hálózatot. Módosulhat a neuronok dendritfája, leginkább a dendrittüskék száma, vagy gyakran a gliasejtek alakja. Ezek az összehangolt változások befolyásolják a sejt-sejt kapcsolatokat, ezáltal a szinaptikus szerveződés is átalakul, melynek következtében lényeges működésbeli eltérések jönnek létre. Ezt a környezeti tényezők széles skálájához történő alkalmazkodási képességet foglalhatjuk össze tömören a neuronális plaszticitás kifejezéssel.

Nem meglepő, hogy az embrió fejlődő idegrendszerében plasztikus változások történnek, mivel az axonok kötegekbe rendeződése, a célsejtek megtalálása és a sejtek vándorlása leginkább az élet korai szakaszára jellemző. Azonban vannak az idegrendszerben olyan területek, mint pl. a hipotalamo-hipofízis vagy a szaglórész, ahol ezek az embrionális sajátosságok még felnőtt korban is megmaradnak. Létezik továbbá még egy jellegzetesség, mely megfigyelhető mind az embrionális idegrendszer egészében, mind a felnőtt idegrendszer azon részeiben, melyek leginkább hajlamosak plasztikus változásokra. Ez a közös jellemző a neuronális sejtadhéziós molekula embrionális formájának, azaz angol rövidítéssel a PSA-NCAM molekulának az expressziója. A molekula egy különleges glikoprotein, melyet egy fehérje váz és egy α 2,8-kötéssel egymáshoz kapcsolódó szialinsav monomerekből felépülő hosszú lánc, a polisziálsav (PSA) alkot. A PSA rész teszi ki a

molekula tömegének 30 %-át, míg a felnőtt idegrendszer legnagyobb részében a molekula szialsav tartalma mindössze 10%. A PSA különösen fontos része a molekulának, mivel nagy térfogata és negatív töltése révén csökkenteni képes a sejtek közti adhéziót. Továbbá figyelemre méltó összefüggés állapítható meg a PSA-NCAM molekula eloszlása és a neuroplasztikus változásra való hajlam között.

Az egyik ilyen, a felnőtt idegrendszerben a PSA-NCAM expressziót megőrző régió egyben reverzibilis szinapszis szám változásairól is jól ismert. Ez a terület a hipotalamusz, ahol a nucleus supraopticus-ban és paraventricularis-ban oxitocin, míg a nucleus arcuatus-ban ösztadiol indukció hatására finomszerkezeti átrendeződések mennek végbe. Mivel az ösztadiol koncentráció a felnőtt nőstény állatokban az ösztroz ciklus során változik, a nucleus arcuatus szinaptikus átalakulásai követik a keringő ösztrogén szintjét: a proösztroztól ösztrozsig terjedő időszakban az axo-szomatikus szinapszisok száma szignifikánsan csökken. A folyamat ösztroz-metösztroz idején megfordul, azaz az axo-szomatikus szinapszisok száma emelkedik, míg helyreáll a kiindulási, proösztrozra jellemző állapot. Az axo-szomatikus szinapszisok számának változását a glia nyúlványok ugyancsak reverzibilis átrendeződése kíséri. Érdekes módon a ciklikus szinaptikus átalakulások csak a GABAerg szinapszisokat érintik, a nem GABAerg szinapszisok száma nem változik.

A disszertációban összefoglalt kísérletekkel arra igyekeztünk választ találni, hogy ez a neuronális plaszticitást jól tükröző jelenség milyen mechanizmussal játszódik le. Különös figyelmet fordítottunk a sejtek felszínét érintő változásokra, mivel a sejtek közti kapcsolatok átrendeződése általában membrán-membrán kölcsönhatásokat is jelent. A kísérleteket ovariektomizált nőstény patkányokon végeztük, melyeket 17β -ösztradiollal kezeltünk, mivel ilyen körülmények között jól kézben tartható módon reprodukálható a fiziológiásan lejátszódó ösztadiol indukált szinaptikus változás. A morfológiai vizsgálatok hagyományos

transzmissziós elektronmikroszkópiával történtek, melyet IBAS képanalizáló rendszerrel kombinálva alkalmaztunk, az ösztadiol kezelés funkcionális következményeit pedig elektrofiziológiai módszerekkel tanulmányoztuk.

A kísérletek első fázisában arra voltunk kíváncsiak, hogy az ösztadiol kezelést kísérlethez hasonlóan változás az idegsejt membránjában. 24 órával az ösztadiol injekció után perfundáltuk az állatokat, majd véletlenszerűen kiválasztott ultravékony metszeteken meghatároztuk a tüskés vezikuláknak és lefűződéseknek a perikarion membrán 1000 μm -ére eső számát. Megállapítottuk, hogy az exo-endocitotikus lefűződések száma szignifikánsan emelkedett egy nappal az ösztadiol kezelés után. Tüskés vezikulák jelen voltak az egész citoplazmában, de statisztikai összehasonlítás céljára csak azokat vettük figyelembe, melyek az idegsejt membránjától kevesebb, mint 500 nm távolságra helyezkedtek el. Ugyan tapasztaltunk némi növedést ezek számában, de ez nem volt statisztikailag szignifikáns. Arra a következtetésre jutottunk, hogy ezek a morfológiai változások olyan ösztadiol indukált változásokat jeleznek, melyek a neuronális membrán alkotórészeinek transzportját és/vagy újratemelődését érintik. Mivel a nucleus arcuatus azon idegrendszeri területek közé tartozik, ahol a PSA-NCAM termelődése az egész élet során fennmarad, nem zárhattuk ki azt a lehetőséget, hogy a megnövekedett exo-endocitotikus aktivitásban részt vevő molekulák között a neuronális sejtadhéziós molekula embrionális formája is megtalálható.

Figyelmünket ezért a PSA-NCAM felé fordítottuk, hogy megvizsgáljuk, milyen szerepet játszik a molekula a nucleus arcuatus szinaptikus kapcsolatainak átszerveződésében. A PSA funkcióját kétféle kísérleti megközelítéssel tanulmányoztuk. Egyrészt egy, a PSA láncot specifikusan hasító, de az NCAM fehérje vázát érintetlenül hagyó enzim, az endoneuraminidáz (endo-N) nucleus arcuatus fölé történő egyszeri injektálásával eltávolítottuk a polisziálsavat. Másrészt egy miniozmotikus pumpa segítségével öt napon

keresztül az $\alpha 2,8$ -as kötéseket specifikusan felismerő egér monoklonális IgM antitestet juttattunk az oldalkamrába. Mindkét eljárást 17β -ösztadiol injektálás követte. A PSA lánc megbolygatásának hatékonyságát fénymikroszkópos PSA-NCAM immunhisztokémiai reakcióval ellenőriztük: a PSA eltávolítását az endo-N injekció oldalán az immunfestés elmaradása jelezte, míg a kontralaterális, kontrollként szolgáló oldal a megszokott PSA-NCAM festődést mutatta. A miniozmotikus pumpából a nucleus arcuatus-ba diffundált PSA-t felismerő antitest jelenlétét olyan módosított immunfestéssel mutattuk ki, ahol a primer antitestet kihagytuk a reakcióból. Annak érdekében, hogy megállapítsuk az ösztadiolnak az axo-szomatikus szinapszisok számára kifejtett hatását, mindkét kísérleti megközelítés esetében beágyazást követő GABA immunhisztokémiai reakciót végeztünk ultravékony metszeteken, majd a szinapszisok sűrűségét a diszektor módszerrel határoztuk meg. Kimutattuk, hogy az ösztadiol kezelést követő jellegzetes, a GABAerg axo-szomatikus szinapszisokat érintő számbeli csökkenés csak akkor következett be, ha a PSA-NCAM molekula érintetlen volt. Amennyiben a PSA-NCAM valamilyen módosítást szenvedett, legyen az az anti-PSA adszorpciója vagy a PSA endo-N-nel történő hasítása, az ösztadiol nem volt képes a jól ismert szinaptikus átrendeződést indukálni a nucleus arcuatus-ban.

Az axo-szomatikus szinapszisok részletes elemzése után az kezdett el foglalkoztatni bennünket, hogy a másik típusú neuronális bemenet, azaz az axo-dendritikus szinapszisok is reagálnak-e az ösztadiol kezelésre. Az axo-szomatikus szinapszisokhoz képest figyelemre méltó különbséget találtunk: a szinapszisok száma növekedett, de csak a dendrittűskén szinaptizáló serkentő kapcsolatok esetében. A nem GABAerg szinapszisok akár a dendrittörzsön vagy a dendrittűskén helyezkedtek is el, nem mutattak szignifikáns változást.

Ezek a morfológiai eredmények felvetették azt a kérdést, hogy vajon a dendrittűskén levő serkentő bemenetek számának növekedése és az idegsejtek szómájára irányuló gátlás

csökkenése ugyanazon neuron populációt érinti-e, mely az elektromos aktivitás fokozódásához teremtené kedvező feltételeket. Ezért rögzítettük legalább 25-30 percen keresztül a nucleus arcuatus neuronjainak spontán aktivitását, és az elvezetés alatt 17β -ösztradiolt injektáltunk a kísérleti állatba. Azt tapasztaltuk, hogy az ösztadiol adását követő 25 perc után a tüzelési frekvencia jelentősen fokozódott.

Mivel az ösztadiolnak meghatározó szerepe van a nemi különbségeket mutató magatartási és neuroendokrin reakciókban, megvizsgáltuk, hogy hogyan befolyásolja a nucleus arcuatus neuronjainak aktivitását két eltérő érző ingerület ösztadiol injekció előtt és után. Az egyik érző bemenet a járulékos szaglógumóból származott. Ennek ingerlése az arcuatus idegsejteknek elektromos aktivitását csökkentette, míg a másik módosító tényező, a bajuszpárna ingerlése fokozta ugyanezen neuronok tüzelési aktivitását. Meglepő módon sem a szagló, sem a trigeminális rendszer ingerlésének hatását nem befolyásolta a 17β -ösztadiol jelenléte.

Kísérleteink alátámasztják azt a feltételezést, mely szerint az ösztadiol indukált szinaptikus plaszticitásban részt vesznek a membránt alkotó molekulák. A szinaptikus átrendeződéseket az exo-endocitotikus aktivitás nagyfokú növekedése kíséri. A folyamatban valószínűleg érintett sejt felszíni molekulák közé sorolhatjuk a PSA-NCAM-et, mely permisszív faktorként vesz részt a neuroplasztikus változásokban: jelenléte előfeltétel ahhoz, hogy az induktív faktorok, mint amilyen pl. az ösztadiol, hatása megnyilvánulhasson, de a PSA-NCAM önmagában nem vált ki szerkezeti átrendeződéseket. Az ösztadiol kezelést követően mind az axo-szomatikus, mind az axo-dendritikus szinapszisok átalakulnak. A szinaptikus kapcsolatok összehangolt változása a nucleus arcuatus idegsejteknek spontán aktivitását növeli, mely azonban nem változtatja meg ugyanezen sejtek szomatoszenzoros vagy szaglórendszer felől érkező ingerlésének hatását.

SUMMARY

Living organisms can only cope with the challenges of life if the relevant information is perceived and processed. In vertebrates this highly controlled reaction to the changing external and internal environment is organized by millions of neurons that make up the central nervous system, which in turn adapts to the new conditions. In other words, stimuli not only reach the appropriate neurons, but they can also induce alterations in the network of neuronal communication. ^{nerve} Nervous cells are capable of changing their dendritic arborization, especially the number of dendritic spines, but modifications in glial morphology are also frequent. These coordinated responses result in changes in cell-cell connections and consequently, in variations of synaptic circuits which have important functional implications. This capability of adaptation to a wide range of environmental factors is called neuronal plasticity. ? !

It is not surprising that plastic changes occur in the developing nervous system of the embryo, since axonal targeting, fasciculation and cell migration take place most frequently in early stages of life. However, in some areas of the nervous system, such as in the hypothalamo-hypophyseal or in the olfactory system, these embryonic features persist even in the adult. There is another remarkable peculiarity, which characterizes the whole embryonic brain and those parts of the adult nervous system that are highly capable of neuronal plasticity: the expression of the embryonic form of the neuronal cell adhesion molecule, the so called PSA-NCAM. This is an unusual glycoprotein, which consists of a protein backbone and a long chain of α 2,8-linked sialic acid monomers, the polysialic acid (PSA). The PSA moiety makes up the 30% of the molecule, whereas in most parts of the adult nervous system this polysialic acid content is reduced to 10%. The PSA is of extreme importance, since it can reduce cell-cell adhesivity because of its large volume and negative charge. Moreover, there is

an intriguing correlation between the distribution pattern of PSA-NCAM and the susceptibility to neuroplastic changes.

One of the areas that maintain the expression of PSA-NCAM in the adult is also well known for its reversible changes in synapse number. This area is the hypothalamus, where structural rearrangements are going on in the supraoptic and paraventricular nuclei in response to oxytocin induction, and in the arcuate nucleus due to estradiol. The synaptic alterations in the arcuate nucleus are following the cycling changes in the level of circulatory estrogen: after its peak the number of axosomatic synapses is significantly decreased between proestrus and estrus. This process is reversed between estrus and metestrus, when the estradiol level is decreased, i.e. axosomatic synaptic numbers increase till the original structure, characteristic of proestrus is restored. The changes in the number of axosomatic synapses are accompanied by a reversible reorganization of close appositions of glial processes. Interestingly, the cyclic synaptic rearrangements involve only GABAergic synapses, the number of non GABAergic synapses remains unchanged.

In the present work we tried to shed light on the possible mechanisms of this appealing example of neuronal plasticity with special attention to phenomena related to cellular surfaces, since alterations in cell-cell connections usually involve membrane-membrane interactions. The experiments were carried out on ovariectomized female rats treated with 17β -estradiol, because under these circumstances the physiologically occurring estradiol-induced phasic synaptic remodelling can be reproduced in a well defined, controllable manner. We used conventional transmission electron microscopy accompanied with an IBAS online image analyzing system for morphologic studies, and electrophysiological recordings for investigating the functional implications of estradiol administration.

In the first series of experiments we examined if estradiol treatment induces any structural alterations in neuronal membranes. 24 hours after estradiol injection animals were sacrificed, then thin sections from the arcuate nucleus were randomly selected and the number of coated vesicles and coated pits/1000 μm of perikaryal membrane was determined. We found that there was a significant increase in the number of coated pits/1000 μm of perikaryal membrane one day after estradiol treatment. Coated vesicles were observed in the entire cytoplasm, but for statistical comparison we counted only those that were in less than 500 nm from the neuronal membrane. Although there was a slight increase in their number, it was not statistically significant. We concluded that these morphological alterations are signalling estrogen-induced transport and/or turnover of neuronal membrane constituents. Since the arcuate nucleus belongs to those areas of the nervous system where PSA-NCAM expression is maintained throughout life, we could not exclude the possibility that at least one of the molecules involved in the increased exo-endocytotic activity is the embryonic form of the neuronal cell adhesion molecule.

Thus, we turned our attention to elucidate the possible role of PSA-NCAM in the estradiol-induced synaptic reorganization of the arcuate nucleus. Two different *in vivo* approaches were used to examine the importance of PSA on cell surfaces. On one hand, the PSA moiety was removed by a single injection of an enzyme, the endoneuraminidase (endo-N), which cleaves the PSA chain, but leaves the NCAM protein backbone intact, just over the arcuate nucleus. On the other hand, a mouse monoclonal IgM antibody that specifically recognizes the α 2,8-linked PSA was administered to the lateral ventricle during five days using a miniosmotic pump. Both treatments were followed by an injection of 17β -estradiol. The efficacy of the PSA perturbation was checked by PSA-NCAM immunoreaction at light microscopic level: we could detect the complete removal of the PSA on the endo-N treated

side of the arcuate nucleus, whereas the contralateral side showed normal PSA labelling. The presence of the anti-PSA antibody that had diffused from the miniosmotic pump was proved by a modified PSA immunocytochemical reaction, where the primary antibody was omitted. In order to examine the effect of estradiol on axosomatic synapse density in both groups of PSA perturbation experiments, postembedding GABA immunostaining was carried out on ultrathin sections and the synapse density was determined using the disector method. We found that the characteristic decrease in the number of GABAergic axosomatic synapses after estradiol treatment occurred only in those circumstances, where the PSA-NCAM molecule was not perturbed. If the PSA-NCAM suffered any alteration either by adsorption of anti-PSA or by cleaving the PSA with endo-N, the estradiol was not able to induce the well-known synaptic reorganization in the arcuate nucleus.

After the detailed analysis of the axosomatic synapses we became interested in the possible reaction to estradiol treatment in the case of the other type of neuronal input, i.e. the axodendritic synapses, as well. We found a remarkable difference in comparison to the axosomatic synapses: an increase in synaptic density was observed but only among synapses making excitatory contacts on dendritic spines. The GABAergic synapses either on dendritic spines or shafts showed no significant alterations following estradiol administration.

This morphological finding raised the question whether the increase in the excitatory input on dendritic spines and the decrease in the inhibitory input on neuronal somata affects the same neuronal population, creating favorable conditions for an increased electrical activity. Therefore we recorded the spontaneous activity of an arcuate neuron for at least 25-30 minutes, and injected 17β -estradiol during the course of the experiments. It was found that the frequency of spikes increased significantly 25 minutes after the 17β -estradiol application.



Since estradiol plays a decisive role in sexually differentiated behavioral and neuroendocrine functions, we investigated the effect of two different sensory stimulation on the activity of arcuate neurons before and after 17β -estradiol injection. One of the sensory stimulation originated from the accessory olfactory bulb. It resulted in a decreased electrical activity of arcuate neurons, while the other modulatory effect, the stimulation of the whisker pad induced an increased firing of the same neurons. Surprisingly, neither the effect of the olfactory stimuli, nor that of the trigeminal activation was influenced by 17β -estradiol.

Our experiments provide evidence for the involvement of membrane constituents in estradiol-induced synaptic plasticity. The synaptic rearrangements are accompanied by a marked increase in the exo-endocytotic activity. One of the cell surface molecules that might be affected by this process is the PSA-NCAM, which is a permissive factor in neuroplastic alterations: its presence is a prerequisite for the manifestation of the effects of inductive factors, such as estradiol, but PSA-NCAM alone does not induce structural reorganization. A morphological rearrangement at both axosomatic and axodendritic synapses was observed following estradiol treatment. These coordinated alterations in synaptic circuits result in an increased spontaneous activity of arcuate neurons which does not influence the modulatory effect of either somatosensory or olfactory stimulation recorded on the same cells.