

A hipotalamusz paraventriculáris magjában (PVN) elhelyezkedő tirotropin-releasing hormont (TRH) termelő idegsejtek TRH általi szabályozásának és a tanicitákkal létesített kapcsolatának elektrofiziológiai karakterizálása

Electrophysiological examination of the role of thyrotropin-releasing hormone (TRH) in the regulation of TRH neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) and the interaction of tanycytes and the hypophysiotropic TRH axons in the median eminence

Doktori (Ph.D.) értekezés

Kovács Balázs

Témavezető

Dr. Fekete Csaba DSc

vezető kutató

Biológia Doktori Iskola

**Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék
SZTE TTIK/Kísérleti Orvostudományi Kutató Intézet**



Szeged - Budapest

(2021)

Rövidítések jegyzéke

2-AG	2-arachidonoyl glicerol
ACTH	Adrenokortikotrop hormon
AGRP	agouti-related protein
AM251	1- (2,4-diklór-fenil) -5- (4-jód-fenil) -4-metil-N- (piperidin-1-il) -1H-pirazol-3-karboxamid, CB1 receptor antagonist
AMCA	Aminometil kumarin
AMPA	Alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazol propionsav (receptor)
AP	Akciós potenciál
APDC	(2R, 4R) -4- aminopirrolidin-2,4-dikarboxilát
AVP	Arginin vazopresszin
BAT	Barna zsírszövet
BDNF	Agyi eredetű neurotrof faktor
BSL-2	Biológiai kettes biztonsági szint
CART	Cocaine- and amphetamine regulated transzkript
CB1	1-es típusú kannabinoid receptor
CBX	Karbenoxolon
CRH	Cortikotropin-releasing hormon
CTX-B	Ciklotraxin-B
D1	1-es típusú dehidáz enzim
D2	2-es típusú dehidáz enzim
D3	3-as típusú dehidáz enzim
DAGLa	Diacil-glicerol-lipáz-alfa

DHPG	(S)-3,5-dihidroxi-fenil-glicin
DMSO	Dimetil szulfoxid
DNQX	6,7-dinitrokinoxalin-2,3-dion dinátrium só, AMPA és kainát antagonistája
EAAT	excitatory amino acid transporter
EM	Eminencia mediána
EPSC	Serkentő posztszinaptikus áram
FSH	Follikulus stimuláló hormon
GDP-β-S	5' - [β-tio] difoszfát-trilítium só
GH	Növekedési hormon
GHRH	Növekedési hormont stimuláló hormon
GnRH	Gonadotropin-releasing hormon
GRM4	Metabotróp glutamát receptor 4
HHM	Hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengely
HHP tengely	Hipotalamusz-hipofízis-pajzsmirigy tengely
IC	Intracelluláris oldat
IPSC	Gátló posztszinaptikus áram
IR	Immunreaktív
Kainát	(2S, 3S, 4S) -Karboxi-4- (1-metil-etenil) -3-pirrolidin ecetsav (receptor)
KYNA	Kinurénsav
L-AP4	L - (+) - 2- amino-4-foszfonvajsav
LH	Luteinizáló hormon
LML	Intermediolaterális oszlop

mEPSC	Miniatúr serkentő posztszinaptikus áram
mIPSC	Miniatúr gátló posztszinaptikus áram
MP	Nyugalmi membránpotenciál
NaCl	Nátrium-klorid
NHS	Normál ló szérum
NMDA	N-metil-D-aszparaginsav (receptor)
OT	Oxitocin
P40, P60	Születés utáni nap 40. illetve 60. nap
PBS	Foszfát pufferolt sóoldat
PFA	Paraformaldehid
PIH	Prolaktin ürülést gátló hormon
PLC	Foszfolipáz C
PPII	Piroglutamil-peptidáz II

Pr1	Prolaktin
PTX	GABA _A -R gátló picrotoxin
PVN	Hipotalamikus paraventriculáris mag
RT	Szobahőmérséklet
sEPSC	Spontán serkentő posztszinaptikus áram
sIPSC	Spontán gátló posztszinaptikus áram
SLC1A3	Solute Carrier Family 1 Member 3
SEM	Standard error of mean
Sweep	Elektrofiziológiában egy adatfelvétel egy lefutása
T3	Trijódttironin
T4	Tiroxin
TB	Tris puffer
TBOA	DL-treo-β-benziloxi aszparaginsav
PMH	Pajzsmirigyhormon
TR	(Thyroid) Pajzsmirigyhormon receptor
TRH	Tirotropin-releasing hormon
TSH	Tireoidea-stimuláló hormon
TRH-DE	TRH bontó ektoenzim
TRH-R1	TRH receptor 1
TrkB	Tropomiozin receptor kináz B
TTX	Tetrodotoxin
Vu 155041	5- [2- (2- (3-fluor-fenil) -etinil) -N - [(1R)-2-hidroxi-1,2-dimetil-propil] -2-piridinkarboxamid

α -MSH

alfa-melanocita stimuláló hormon

1. Bevezetés

A pajzsmirigyhormonok (PMH) a szervezet fejlődésének és működésének kritikus irányítói [1]. E hormonok a szervezetünk szinte minden szervére hatnak. PMH hiányában sérül az agyfejlődés, jelentősen lelassul az anyagcsere és a szívfrekvencia, a magas perifériás ellenállás miatt magas vérnyomás alakul ki, megemelkedik a koleszterin szint, hajhullás, depresszió, szellemi lassultság jön létre számos egyéb tünet mellett [2]. A megemelkedett PMH szint szintén súlyos tüneteket okoz, bizonyos esetekben akár halálhoz is vezethet [2]. E klinikai problémák mutatják, hogy mennyire fontos a pajzsmirigy működésének precíz szabályozása.

A vér PMH szintjét a hipotalamusz-hipofízis-pajzsmirigy (HHP) tengely szabályozza [1]. E neuroendokrin tengely központi szabályozását a hipotalamusz paraventriculáris magjában (PVN) elhelyezkedő, úgynevezett hipofiziotróf tirotropin-releasing hormont (TRH) termelő idegsejtek végzik [1, 3]. A hipofiziotróf TRH sejtek axonja a vér-agy gáton kívül elhelyezkedő eminencia mediána (EM) külső zónájába vetül, ahol TRH-t ürítenek a hipofizeális portális keringésbe. A TRH a hipofízis elülső lebenyébe jutva serkenti a tirotrop sejtek tireoida-stimuláló hormon (TSH) termelését és ezáltal a PMH szekrécióját [1].

A hipofiziotróf TRH sejtek működését az idegi inputok és a hormonok együttesen szabályozzák [4]. A hormonok közül a legjelentősebb szerepe a PMH-ok negatív *feedback* hatásának van [4]. A vér PMH szintjének emelkedése gátolja, míg csökkenése fokozza a hipofiziotróf sejtek TRH termelését, így biztosítva a vér PMH szintjének stabilitását [5]. E negatív visszacsatolási mechanizmus részét képezik a taniciták, egy a harmadik kamra alját és oldalát bélelő glia sejtípus. A hipotalamuszban a taniciták termelik a 2-es típusú dehidrogenáz enzimet (D2) [6], ami a pajzsmirigy által termelt tiroxint (T4) alakítja át aktív PMH-ná, trijód-tironinná (T3) [7]. A T3 a TRH sejtek magi PMH receptorán hatva gátolja a TRH termelődését [5].

A hipofiziotróf TRH sejtek, a taniciták, az idegi inputok és a hormonok együttesen szabályozzák az hipofizeális portális keringésbe ürülő TRH mennyiségét és ezáltal a HHP tengely aktivitását [1].

PhD munkám során a TRH idegsejteket beidegző TRH axonok szabályozó szerepének és a TRH axon-tanicita interakció mechanizmusának megértése volt a célom.

2. Irodalmi áttekintés

A hipotalamusz alapvető szerepet játszik a szervezet hormonális rendszerének szabályozásában. Két hipotalamikus rendszer, a hipotalamo-neurohipofizeális és a kissejtes tuberoinfundibuláris neuroszekrécións rendszerek vesznek részt közvetlenül a hormontermelés irányításában. A hipotalamo-neurohipofizeális rendszert a hipotalamusz supraoptikus és paraventriculáris (PVN) magjaiban található nagysejtes vagy más néven magnocelluláris idegsejtek alkotják [8]. E sejtek arginin-vazopresszint (AVP) vagy oxitocint (OT) termelnek. A magnocelluláris sejtek axonjai az EM belső zónáján és a hipofízis nyélen keresztül vetülnek a neurohipofízisbe, azaz a hipofízis hátsó lebenyére, ahol a sejtek aktivációjának hatására a hormonok az idegvégződésekből a hátsó lebeny extracelluláris terébe és innét az érrendszerbe jutnak [9].

A kissejtes tuberoinfundibuláris rendszer idegsejtjei más szóval parvocelluláris neuronok az arcuatus idegmagban, a PVN-ben, periventriculáris területen és a preoptikus területen helyezkednek el [10]. Ezen úgynevezett hipofiziotróf neuronok közös tulajdonsága, hogy axonjuk az EM külső zónájában végződik, ahol a hormonjaikat az extracelluláris térbe ürítik [1]. Az EM egy speciális, vér-agy gát mentes terület, így a szekretált hormonok az extracelluláris térből akadálytalanul léphetnek be a hipofizeális portális keringésbe. A portális rendszeren keresztül a hipofiziotróf hormonok a hipofízis első lebenyére jutva szabályozzák a hipofízis hormonok szekréciónját és ezáltal a perifériás endokrin szervek működését [11].

Munkacsoportunk fő kutatási területe a pajzsmirigy működés agyi szabályozásának vizsgálata. A PMH-ok a szervezet szinte minden sejtjének működésére hatással vannak. Szerepük létfontosságú az idegrendszer fejlődésének, a növekedés, az energiaháztartás, az anyagcsere és a termogenezis szabályozásában. A PMH szabályozza a tápanyag májban történő metabolizmusát, a folyadék egyensúlyt, továbbá szabályozza a szív- és érrendszer működését is.

A sejtekben a PMH hatását főként magi PMH receptorok közvetítik [12], melyek a génexpresszióra hatva szabályozzák a sejtek működését. A pajzsmirigy által legnagyobb mennyiségben termelt hormon, a T₄, prohormonnak tekinthető, mivel nem kötődik a magi PMH receptorokhoz [13]. A PMH aktív formája, a T₃, a magi PMH receptorok preferált ligandja. A T₄-T₃ átalakulást dehidrogénáz enzimek végzik, elsősorban az agyban és a perifériás szövetekben is megtalálható 2-es típusú dehidrogénáz enzim (D₂) [14-16]. A D₂ a T₄ külső gyűrűjéről egy jód molekulát eltávolítva alakítja át a T₄-et T₃-má [15]. Ezzel szemben a T₄

és a T3 inaktiválását a 3-as típusú deiodáz enzim (D3) végzi a belső gyűrűről történő jó lehasítással. Habár a vérben a PMH szint viszonylag állandó, a szöveteknek szövettípus szerint jelentősen eltérő PMH hatásra lehet szükségük és időben is jelentősen változhat a szövetek PMH hatás szükséglete [17]. Ezen eltérő szöveti igények miatt kritikus a szöveti PMH metabolizmus, azaz a deiodáz enzimek lokális szabályozása [16]. A szöveti PMH hatás szabályozásához hozzájárul a PMH transzporterek, receptorok, receptor koregulátorok sejtszintű szabályozása is [18].

A vér PMH szintjének szabályozását a HHP tengely végzi [1]. A tengely fő központi idegrendszeri szabályozója a PVN-ben elhelyezkedő hipofiziotróf TRH termelő sejtszóport. A TRH egy tripeptid-amid (pGlu-His-ProNH₂) [19], ami számos más biológiai funkció szabályozása mellett az agyalapi mirigy TSH szintézisének, felszabadulásának és biológiai aktivitásának szabályozását is végzi [20-22]. A TSH egy glikoprotein hormon amely α és β alegységekből áll. A TSH specifikus receptorán keresztül serkenti a pajzsmirigy follikulus sejtjeinek növekedését és működését, valamint szabályozza a PMH-ok, a T4 és a T3 szintézisét és szekrécióját [108]. A hipofiziotróf TRH sejtek egérben csak a PVN középső részén helyezkednek el, részben a magnocelluláris almagban a vazopresszin és oxitocin neuronok közt, azonban a TRH sejtek e területen is parvocelluláris sejtek [11]. Ezzel ellentétben patkányban a hipofiziotróf TRH sejtek a PVN középső és hátsó részén a mediális és periventrikuláris almagokban helyezkednek el [23]. Az emberi hipotalamuszban a PVN-ben a TRH sejtek megoszlása az egérben tapasztalathoz hasonló, azonban metodikai nehézségek miatt a hipofiziotróf TRH sejtek megoszlása a humán PVN-ben nem ismert [24, 25]. A hipofiziotróf TRH sejtek jellemzője, hogy axonjuk az eminencia mediána (EM) külső zónájába vetül, ahol a TRH neurohormon felszabadul az extracelluláris térbe [1]. A TRH ezután a hipofizeális portális keringésén keresztül az agyalapi mirigybe jut, ahol az 1-es típusú TRH receptoron (TRH-R1) hatva stimulálja a pajzsmirigy aktivitását szabályozó tirotróp sejtek TSH szintézisét és felszabadulását [1, 26]. Rágcsálókban két TRH receptor termelődik, a TRH-R1 és a TRH-R2. Mindkét TRH receptor G protein kapcsolt útvonalon működik. Jelentős TRH-R2 mRNS expresszió figyelhető meg az agy számos területén, mint például az agy- és kisagykéreg, a talamusz, a mediális habenula, a mediális geniculate mag, a híd egyes magjai és a retikuláris formáció, amelyek fontosak a szomatoszenzoros jelek és a magasabb központi idegrendszeri funkciók szabályozásában [27]. Ezzel szemben a TRH-R1 mRNS túlnyomórészt a neuroendokrin agyi régiókban például PVN-ben, arcuatus magban, anterior hipotalamuszban, az autonóm idegrendszerben és a zsigeri agytörzsi régiókban

expresszálódik. Az agyalapi mirigyben csak a TRH-R1 expresszálódik, TRH-R2 transzkript nem észlelhető [27]. A szekretált TRH inaktiválását elsősorban egy nagy szubsztrát specificitású membrán fehérje a TRH bontó enzim (TRH-DE) vagy más néven piroglutamil-peptidáz II (PPII) katalizálja [28, 29]. Szérumban a TRH-t a TRH-DE alternatív splicing vagy proteolízis eredményeként létrejött oldható formája bontja, amit a tiroliberináznak is neveznek [30]. A hipofiziotróf TRH neuronok egy második jellegzetessége, hogy egy második neuropeptidet, cocaine- and amphetamine-regulated transzkript peptidet (CART) is expresszálnak [31, 32]. A CART szintén a hipofiziális portális keringésbe ürül, és gátolja a TRH prolaktin szekrécióra gyakorolt hatását, de nincs hatással a TRH-nak a TSH szekrécióra kifejtett hatására [33]. E két peptid mellett a hipofiziotróf TRH neuronok 2-es típusú vezikuláris glutamát transzportert (VGLUT2) is termelnek, ami a sejtek glutamáterg fenotípusára utal [34]. Mivel az EM TRH axonterminálisai tartalmazznak VGLUT2 proteint és nagyszámú *small clear* szinaptikus vezikulát, ami a glutamáterg axonok jellemzője, feltételezhető, hogy a glutamát a TRH-val együtt szabadul fel az EM külső zónájában [34-36]. Azonban a TRH axonokból ürülő glutamát szerepe az EM vagy a hipofízis működésének szabályozásában nem volt ismert.

A hipofiziotróf TRH idegsejtek szabályozásában kritikus szerepet játszanak e sejtek idegi inputjai. Az agy számos területéről szinaptikus kapcsolatokon keresztül érkező információk jelentősen képesek befolyásolni a TRH idegsejtek és ezáltal a HHP tengely aktivitását.

Jelenleg három fő neuroncsoport ismert, amelyek szinaptikus kapcsolatokon keresztül befolyásolják a TRH idegsejteket a PVN-ben: a hipotalamusz arcuatus magjának táplálkozást szabályozó sejtcsoportjai, a hipotalamusz dorzomediális magja (DMN) és az agytörzsi katekolamint termelő idegsejtek [4, 37].

A hipotalamusz arcuatus magja kulcsfontosságú szerepet játszik az energia homeosztázis szabályozásában azáltal, hogy energiaháztartás szabályozásában szerepet játszó hormonok hatását integrálja és továbbítja az úgynevezett másodrendű táplálkozást szabályozó sejtcsoportok felé [38]. Az arcuatus magban két fő táplálkozással kapcsolatos idegsejt csoport található: a mediálisan elhelyezkedő, neuropeptid Y-t (NPY), agouti-related proteint (AGRP) és γ -amino-vajsavat (GABA) termelő, orexigén idegsejtek; valamint a laterálisan elhelyezkedő anorexigén neuronok, amelyek alpha-melanocita stimuláló hormont (α -MSH) és CART-ot termelnek [38]. Az AGRP/NPY sejtek éhezésben aktiválódnak és fokozzák a táplálékfelvételt, illetve csökkentik az energialeadást [39]. Az α -MSH/CART sejtek aktivitása

viszont csökken éhezésben. E sejtek jelentős mértékben csökkentik a táplálékfelvételt és növelik az energialeadást [39]. Mindkét neuroncsoport aktivitását szabályozzák perifériás, táplálkozás szabályozással kapcsolatos hormonok és metabolitok, mint például a leptin, ghrelin, inzulin, glükóz és aminosavak [38]. E hormonok ellentétesen szabályozzák az arcuatus mag két táplálkozást szabályozó sejtcsoportját [38].

Az AGRP/NPY idegsejtek a PVN összes TRH tartalmú idegsejtjét igen dúsán beidegzik. Ezen idegsejtek szimmetrikus típusú, azaz gátló jellegű szinaptikus kapcsolatokat hoznak létre a TRH idegsejtekkel [31, 40, 41]. A szinaptikus kapcsolatok gátló jellegének megfelelően az NPY és az AGRP centrális adagolása is jelentős mértékben csökkenti a PVN-ben a TRH termelését [42]. AGRP az agyban kizárólag az arcuatus mag NPY sejteiben termelődik [43]. Így a PVN TRH sejtjeinek AGRP beidegzése kizárólag e sejtcsoportból érkezik [41]. NPY az agy számos sejtcsoportjában termelődik. Ennek ellenére azonban a TRH idegsejtek NPY beidegzésének többsége, 75%-a, származik az arcuatus mag AGRP/NPY idegsejtjeiből [44].

A TRH idegsejteket beidegzik az arcuatus idegmag anorexigén α -MSH/CART idegsejtjei is [33]. Az α -MSH és a CART centrális adagolása is serkenti a PVN-ben a TRH termelődését [31].

Az arcuatus mag e két sejtcsoportja fontos szerepet játszik az éhség HHP tengelyre kifejtett hatásának közvetítésében [45]. Éhezés hatására csökken a hipofiziotróf TRH idegsejtek TRH termelése, ami hozzájárul a HHP tengely aktivitásának csökkenéséhez [1]. A HHP tengely gátlása a leptin keringő szintjének csökkenése miatt alakul ki éhezésben [46]. Így az éhezés hatására kialakuló centrális hipotiroidizmus teljes mértékben kivédhető leptin perifériás vagy centrális adagolásával [46]. Az éhezés és a leptin kezelés hatását is teljes mértékben kivédi az arcuatus mag kémiai kiirtása, ami az arcuatus mag szerepét igazolja e hatások közvetítésében [41]. Leptinhez hasonlóan az α -MSH és a CART centrális adagolása is kivédi az éhezés TRH szintézisre gyakorolt hatását [11]. Ezzel ellentétben az NPY illetve az AGRP centrális adagolása táplált állatokban is a HHP tengely éhezésben tapasztalt gátlását okozza annak ellenére, hogy mindkét peptid jelentősen fokozza az állatok táplálékfelvételét [42]. Ezek alapján feltételezhető, hogy éhezésben az α -MSH/CART sejtek aktivitásának csökkenése és az NPY/AGRP sejtek aktivitásának fokozódása együttesen hozza létre a hipofiziotróf TRH sejtek gátlását [47].

A DMN is fontos szerepet játszik az energia homeosztázis és a vegetatív funkciók szabályozásában [48]. Az arcuatus mag táplálkozás szabályozásában szerepet játszó

idegsejtjeihez hasonlóan a DMN idegsejtjei is érzékelik a keringő, energia homeosztázissal kapcsolatos hormonok, mint például a leptin [49] szintjének változását. Azonban ez az információ az arcuatus magon keresztül közvetett módon is eljut a DMN neuronjaihoz [50]. A DMN kritikus a táplálékfelvétel és a stresszválasz cirkadián szabályozásában [48, 51], integrálja ezeket a jeleket, és továbbítja az információt más idegsejt populációknak, például a szimpatikus idegrendszernek és a PVN-nek [48]. A DMN szintén hozzájárul a HHP tengely szabályozásához; a mag kétoldali léziója növeli a T3 24 óra alatt mért felszabadulását [52], ami arra utal, hogy a DMN gátolja a pajzsmirigy működését. Anterográd pályajelölési vizsgálatok kimutatták, hogy a DMN idegsejtjei beidegzik a PVN TRH idegsejtjeinek túlnyomó többségét [4]. A DMN eredetű axonok és a PVN TRH idegsejtjei között elsősorban szimmetrikus típusú szinapszisok figyelhetők meg, ami a kapcsolatok gátló jellegére utal [25]. További vizsgálatokra van szükség ezen morfológiai kapcsolat fiziológiai jelentőségének tisztázásához. Feltételezik, hogy a DMN integrálja az energiaháztartással és a cirkadián ritmussal kapcsolatos idegi inputokat és ezen információknak megfelelően módosítja a HHP tengely aktivitását [4].

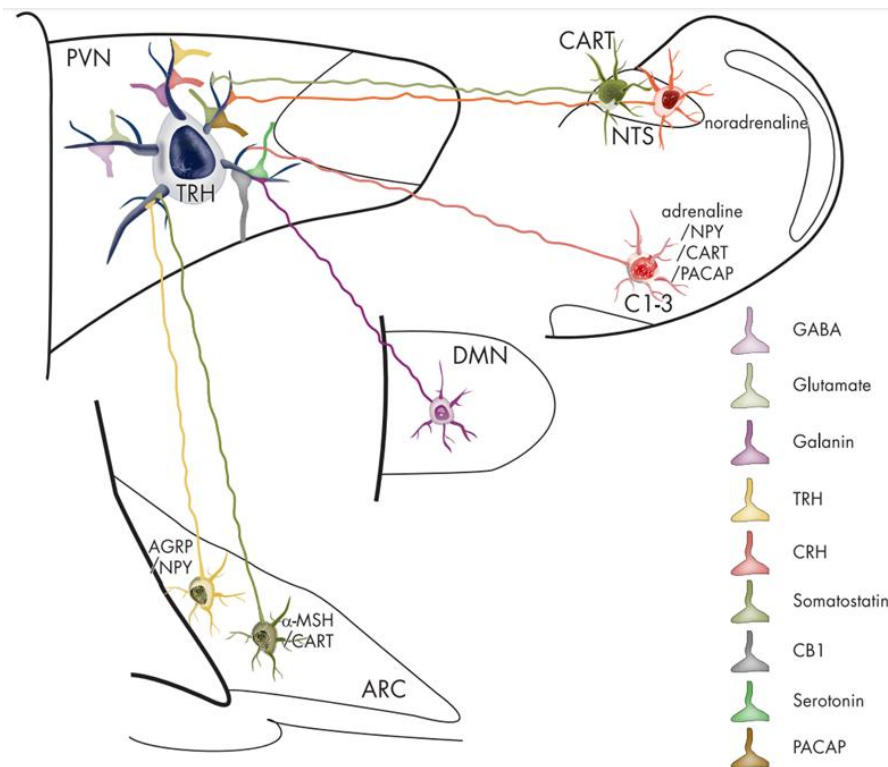
Az agytörzsi katekolaminerg sejtcsoportok számos fiziológiai funkció szabályozásában vesznek részt, például a figyelem, alvás/ébrenlét, tanulás, memória, érzelmek, szaporodás, neuroendokrin folyamatok és a stressz központi szabályozásában [53]. E neuronokat az általuk előállított transzmitter alapján adrenerg és noradrenerg neuronoknak nevezzük. Mindkét idegsejt populáció termel dopamin- β hidroxilázt, a noradrenalint szintetizáló enzimet, de csak az adrenerg neuronok termelik a feniletanolamin N-metiltranszferázt, az enzimet, ami a noradrenalint adrenalinná alakítja [54]. A PVN TRH idegsejtjei dús katekolaminerg beidegzést kapnak [55]. A katekolaminerg axonok aszimmetrikus típusú szinapszisokat hoznak létre a TRH neuronok felszínén [55], ami a kapcsolat serkentő jellegére utal. Ezzel összhangban kimutatták, hogy a noradrenalin fokozza a TRH gén transzkripcióját [56]. A TRH neuronok katekolaminerg beidegzésének körülbelül kétharmada adrenerg neuronokból származik, míg a noradrenerg neuroncsoportokból a TRH sejtek katekolamin beidegzésének a fennmaradó egyharmada származik [37]. Az adrenerg neuronok kizárólag a medulla C1–3 régióiban helyezkednek el, és mivel mindhárom adrenerg régió axonjainak eloszlási mintázata nagyon hasonló a PVN-ben [57], valószínűleg mindegyik adrenerg csoport hozzájárul a hipofiziotróf TRH idegsejtek beidegzéséhez [37]. A katekolaminerg idegsejtek a klasszikus transzmitterük mellett peptiderg transzmittereket is termelnek. A TRH neuronok adrenerg beidegzésének kb. 50% -a tartalmaz CART-ot [58], és több mint 70% -a tartalmaz

NPY-t is [44]. Ezen adrenerg axonterminálisok nagy része hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptidet (PACAP) is tartalmaz [46]. Jelenleg nem ismert, hogy a több transzmitter együttes felszabadulása hogyan modulálja az adrenerg idegsejtek hatását a TRH sejtekre, a több transzmitter használata valószínűleg jelentős rugalmasságot biztosít az adrenerg neuronok számára, hogy a különböző fiziológiai és patofiziológiai hatásokra reagálva eltérően befolyásolják a TRH sejteket [1]. Az agytörzsben hat noradrenerg sejtcsoportot különböztetünk meg (A1–A6), de csak az A1, A2 és A6 noradrenerg sejtcsoportok vetülnek a PVN-be [59]. Az A1 noradrenerg sejtcsoport elsősorban a PVN magnocelluláris részét innerválja patkányokban [60], ami arra utal, hogy ez a sejtcsoport csak viszonylag kisebb mértékben járulhat hozzá a TRH sejtek noradrenerg beidegzéséhez. Az A2 és A6 noradrenerg sejtcsoportok azonban sűrűn beidegzik a PVN periventrikuláris és mediális parvocelluláris területeit, ahol a hipofiziotróf TRH neuronok is találhatóak [60], valószínűsítve, hogy ez a két noradrenerg sejtpopuláció a hipofiziotróf TRH idegsejt beidegzésének elsődleges forrása.

A PVN-ben elhelyezkedő TRH idegsejtek katekolaminerg beidegzésének egyik fő, ismert funkciója a TRH idegsejtek aktivitásának fokozása hideg környezetben [61]. Hideg hatására a TRH szintézis igen gyors, tranziens fokozódása figyelhető meg, amit a perifériás PMH szint emelkedése követ [61] elősegítve az adaptív hőtermelést. Mivel centrális TRH kezelés fokozza a barna zsírszövet hőtermelését a szimpatikus idegrendszer aktiválásán keresztül is, elképzelhető, hogy a TRH idegsejtek aktivitásának fokozódása a HHP tengelytől függetlenül is hozzájárul a hideg hatására kialakuló hőtermeléshez [61].

A noradrenalin szintézis gátlása kivédi a TRH szintézis hideg hatására bekövetkező fokozódását, ami arra utal, hogy a katekolaminerg neuronok kritikus szerepet játszanak a hideg hatásának közvetítésében. Ezt támasztja alá az a tény is, hogy a PVN katekolaminerg beidegzésének kialakulása előtt a hideg nem fokozza a TRH sejtek aktivitását [62].

A fent említett idegi kapcsolatok mellett a PVN TRH idegsejtjei galanin-, TRH-, CRH-, szomatosztatin-, glicin, GABA és glutamát tartalmú beidegzést kapnak [1, 34, 40, 42, 45, 46, 63, 64, 65]. A szerotoninerger axonok és a TRH neuronok között nem szinaptikus kapcsolatokat írtak le [66]. Azonban ezen inputok szerepéről a hipofiziotróf TRH neuronok szabályozásában viszonylag kevés információval rendelkezünk. A hipofiziotróf TRH neuronok ismert bemeneteit a 1. ábra foglalja össze.



1. Ábra: Sematikus ábra, amely összefoglalja a PVN TRH neuronjainak ismert neuronális inputjait. Az azonosított eredetű beidegzéseket egy adott neuron ábrázolja, amely axonját a TRH neuronokhoz küldi. A jelenleg ismeretlen eredetű bemeneteket axonterminálisok jelölik a TRH neuron felszínén. PACAP = hipofízis-adenilát-cikláz aktiváló polipeptid [1].

A PVN TRH sejteinek igen dús a TRH tartalmú beidegzése [67]. A PVN-ben gyakorlatilag az összes TRH idegsejt felszínén számos TRH-tartalmú axonvarikozitás figyelhető meg [1]. A TRH-tartalmú varikozitások és neuronok közt szimmetrikus típusú szinapszisokat figyeltek meg [11], ami a kapcsolatok gátló jellegére utal. Ez alapján feltételezték, hogy e TRH-TRH kapcsolatok egy ultrashort feedback mechanizmus részét képezik, melyben a TRH sejtek aktivitás fokozódása esetén a PVN-ben lévő TRH sejtek legátolják egymást, így megakadályozva a hipofiziotróf TRH sejtek aktivitásának túlzott fokozódását [4]. Azonban a TRH idegsejtek TRH beidegzésének eredete nem volt ismert, így az sem kizárható, hogy nincs kapcsolat a PVN TRH idegsejtjei között és a TRH idegsejtek TRH beidegzése a PVN-en kívülről érkezik. Zhang és munkatársai [61] kimutatták, hogy TRH mikrodialízissel történő PVN-be juttatása megemeli a vér PMH szintjét [61]. Ezen adat megkérdőjelezi a TRH-TRH kapcsolatok gátló jellegét.

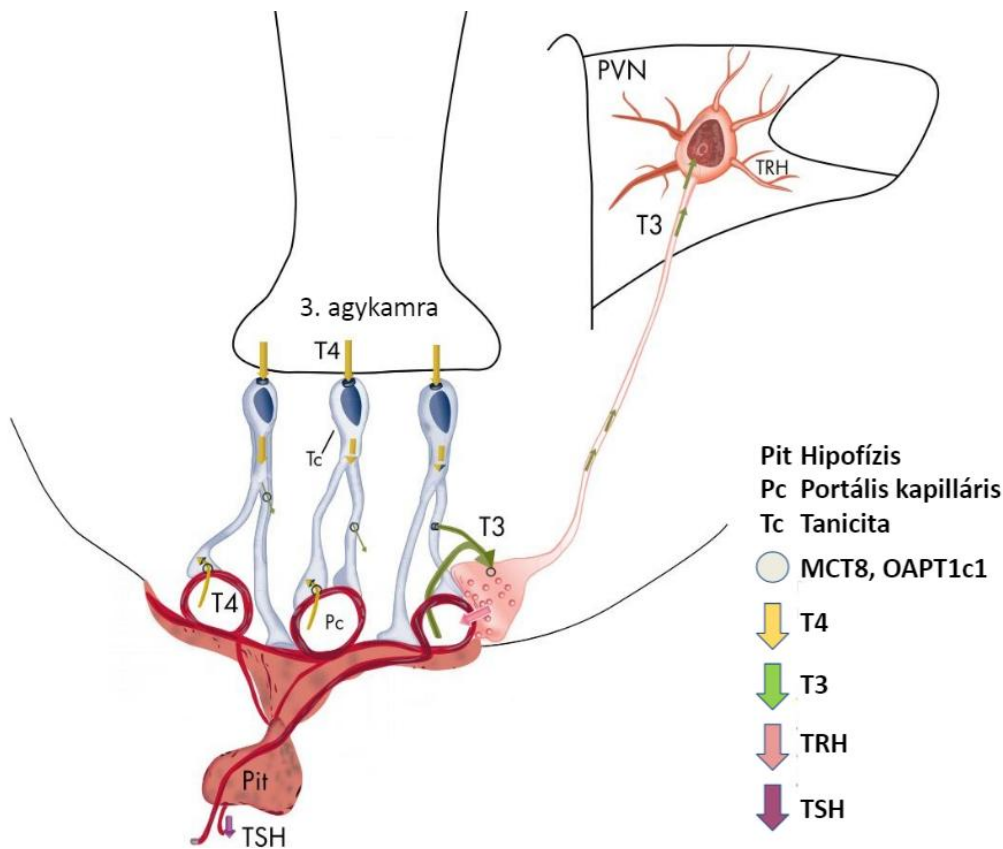
Morfológiai adatok alapján a TRH sejtek szabályozásában olyan retrográd szignál rendszerek is szerepet játszanak, mint például az endokannabinoid vagy az agyi eredetű neutrotróf faktor (BDNF) [36].

Az endokannabinoid rendszer egyik fő lipid transzmittere, a 2-arachidonoylglycerol (2-AG), az idegrendszerben a posztszinaptikus idegsejtekből szabadul fel és a preszinaptikus axonterminálisok 1-es típusú kannabinoid receptorán (CB1) hatva gátolja a transzmitterek felszabadulását [68]. Az endokannabinoidok ürülését kiválthatja klasszikus transzmitterek, mint glutamát vagy GABA, fokozott ürülése [69], de a rendszer részt vesz hormonok és neuropeptidek hatásának közvetítésében is [70]. Így például a ghrelin az endokannabinoid rendszer közvetítésével gátolja a PVN kissejtes neuronjainak serkentő beidegzését [71] és az NPY energiaháztartásra gyakorolt hatásainak közvetítésében is fontos az endokannabinoid rendszernek a kissejtes neuronok beidegzésére kifejtett hatása [72]. Munkacsoportunk kimutatta, hogy a CB1 jelen van a PVN TRH idegsejtjeit beidegző axonokban is. CB1 megfigyelhető a TRH idegsejtek GABA-erg és glutamáterg beidegzésében is. Azonban az endokannabinoid rendszer szerepe a TRH idegsejtek szabályozásában egyelőre még nem tisztázott.

Az endokannabinoidokhoz hasonlóan a BDNF-et is használják az idegsejtek retrográd transzmitterként [73]. A BDNF receptora a tropomiozin receptor tirozin kináz (TrkB) [74]. A BDNF preszinaptikus TrkB-n hatva képes serkenteni a preszinaptikus terminálisok aktivitását [75]. A TRH idegsejtek egy része termel BDNF-et a PVN-ben [76]. Ez alapján feltételezzük, hogy a BDNF-TrkB retrográd szignáling rendszer is részt vesz a TRH idegsejtek szabályozásában.

Az idegi inputokon kívül a HHP tengely szabályozásában alapvető szerepet játszik a PMH negatív feedback szabályozás [4] (2. ábra). A PMH gátolja a TRH szintézist a hipofiziotróf sejtekben és emellett a hipofízis tirotrop sejtjeire közvetlenül hatva is gátolja a TSH szintézisét és ürülését ezáltal gátolva a pajzsmirigy működését [47]. Ha csökken a keringő vér PMH tartalma, az fokozza a hipofiziotróf sejtek TRH szintézisét, míg a vér magas PMH szintje gátolja azt [4]. A PMH közvetlenül a TRH sejtekre hatva fejt ki a TRH szintézist gátló hatását. Ezt támasztja alá, hogy a PVN mellé beültetett T3 kristály csak a beültetés oldalán gátolja a TRH szintézist [1]. A PVN TRH sejtjei termelnek alpha és beta típusú pajzsmirigyhormon receptorokat ($TR\alpha$ és β), melyek közül a feedback szabályozás

kialakításában a TR β 2 izoforma játszik kritikus szerepet [77]. E receptor hiányában a PMH nem képes szabályozni a TRH termelődését [78].

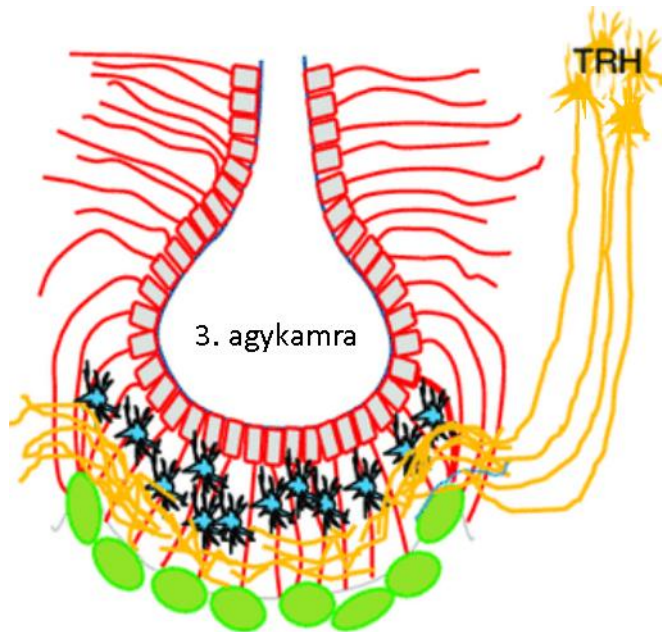


2. Ábra: Sematikus ábra a HHP tengely és a PMH negatív visszacsatolási kapcsoltság szabályozásáról [1].

Hipotiroid patkányokban a vér T3 szintjének helyreállítása T3 kezeléssel nem képes megfelelő módon gátolni a TRH szintézist [1]. Ez arra utal, hogy a T4 prohormon az agyba jutva átalakul T3-má és részt vesz a TRH sejtek negatív feedback szabályozásában [11]. A hipotalamuszban a T4-T3 átalakulást katalizáló D2 enzim kizárólag egy speciális gliasejt típusban a tanicitákban termelődik [14].

A taniciták a látóideg kereszteződés mögött bélelik a harmadik agykamra oldalfalát és az EM kamrai felszínét [79]. A taniciták kicsiny, szögletes sejttesteik alkotják a kamra falát e területeken, míg hosszú bazális nyúlványuk az EM külső zónájába illetve az arcuatus és ventromediális magok és a DMN területére vetülnek [79]. Az EM külső zónájában a taniciták nyúlványai a hipofizeális portális keringés fenestrált kapillárisai körül végződnek [80]. E területen a tanicita nyúlványok közvetlen kapcsolatot létesítenek a hipofiziotróf idegsejtek axonterminálisaival [11] (3. ábra). Ez az anatómiai kapcsolat azt sugallja, hogy az EM-be

vetülő taniciták (β_2 -taniciták) részt vehetnek a neurohipofizeális rendszerek működésében [79].



3. Ábra. Az EM sematikus ábrázolása PVN hipofiziotróf TRH neuronokkal. Sárga: TRH axon projekciók, terminálisok. Piros: Taniciták. Zöld: fenesztrált vérerek. Kék: asztrociták [81].

A taniciták D2 mellett OATP1C1 és MCT8 PMH transzportereket is termelnek [82]. OATP1c1 a T4-et, míg az MCT8 a T4 és a T3 transzportját is elősegíti. Így a taniciták képesek T4-et felvenni és T3-at szekretálni [81]. Mivel az EM a vér-agy gáton kívül helyezkedik el, a vérből a T3 akadály nélkül léphet be az EM extracelluláris terébe, ahol a vérből származó T3 mellett a taniciták által szekretált T3 is hozzájárul az extracelluláris tér T3 koncentrációjához [47]. Habár a D2 termelődését a legtöbb sejtben a PMH szint negatívan regulálja, a taniciták D2 aktivitására nem hat a vér PMH szintje [47]. Ezért a taniciták a vér T4 szint változását a hipotalamusz T3 szint változásává konvertálják [14], ami kritikus nem csak a TRH idegsejtek negatív feedback szabályozásához, hanem számos más hipotalamikus funkció regulációjához is [61].

Az EM külső zónájában a TRH axonok tartalmaznak MCT8 PMH transzportert, ami arra utal, hogy a hipofiziotróf TRH sejtek az EM extracelluláris teréből veszik fel a T3-at, amit retrográd transzporttal szállíthatnak a TRH idegsejtek sejtmagjába, ahol a T3 kifejtheti a TRH szintézist gátló hatását [1].

Habár a taniciták D2 aktivitását nem befolyásolja a vér PMH szintjének változása [47], bizonyos állapotokban, mint például fertőzés hatására, jelentősen megemelkedik e sejtek D2 aktivitása, ami lokális hipertiroidizmust hoz létre a mediobazális hipotalamuszban, ezáltal gátolva a HHP tengelyt [4]. Ez arra utal, hogy a taniciták PMH aktiváló képessége egy extra szabályozó mechanizmus a HHP tengely centrális irányításában.

A lokális T3 koncentráció szabályozása mellett léteznek további mechanizmusok, melyek segítségével a taniciták képesek szabályozni a HHP tengely aktivitását.

A taniciták expresszálnak TRH-DE-t is [30], ezáltal a taniciták képesek befolyásolni az agyalapi mirigybe jutó TRH mennyiségét, úgy, hogy lebontják a EM külső zónájának extracelluláris terébe szekretált TRH egy részét [30]. A taniciták TRH-DE termelését a PMH szint emelkedése viszonylag gyorsan megemeli, hozzájárulva a PMH negatív visszacsatolásához a HHP tengelyen. Ezt támasztja alá, hogy hipertiroid patkányokból nyert EM explantumok TRH szekrécióját jelentősen fokozza a TRH-DE gátlása [30].

Továbbá, a taniciták endokannabinoidokon keresztül is szabályozzák a hipofiziotróf axonok TRH szekrécióját [36]. Munkacsoportunk nemrégiben megfigyelte, hogy a PVN TRH idegsejtjei termelnek CB1 mRNS-t és az EM külső zónájában a hipofiziotróf TRH idegsejtek axonvégződéseinek tartalmaznak CB1-et [36]. Ez felvetette a lehetőségét, hogy az endokannabinoidok is szabályozhatják a TRH felszabadulását az EM-ben. A legtöbb esetben az endokannabinoidok posztzinaptikus idegsejtekből szabadulnak fel, és a preszinaptikus axonterminálisokon elhelyezkedő CB1 receptorokra hatnak [83, 84]. Azonban az EM külső zónájában nagyon kevés idegsejt található [11], és az endokannabinoidok csak nagyon kis távolságra képesek terjedni az agyban [85]. Ez felvetette a lehetőségét, hogy az EM-ben gliasejtek termelhetik az endokannabinoidokat. Ezzel összhangban munkacsoportunk kimutatta, hogy az EM-ben taniciták termelik az endokannabinoid 2-AG termelését katalizáló enzimet a diacylglycerol lipase alfa (DAGL α), sőt a DAGL α -tartalmú tanicita nyúlványok közvetlen kapcsolatot létesítenek a CB1-tartalmú TRH axonokkal [36]. E kapcsolat megteremti a morfológiai alapját a taniciták és a TRH axonok közti endokannabinoidok közvetítésével létrejött kapcsolatnak. EM explant kísérletek igazolták, hogy a CB1 gátlása jelentősen fokozza az EM szövetminták TRH ürítését. Ez arra utal, hogy a taniciták által termelt endokannabinoidok tónusosan gátolják a hipofiziotróf axonok TRH ürítését [36]. Ez felvetette azt a kérdést, hogy milyen tényezők szabályozzák a taniciták endokannabinoid termelését.

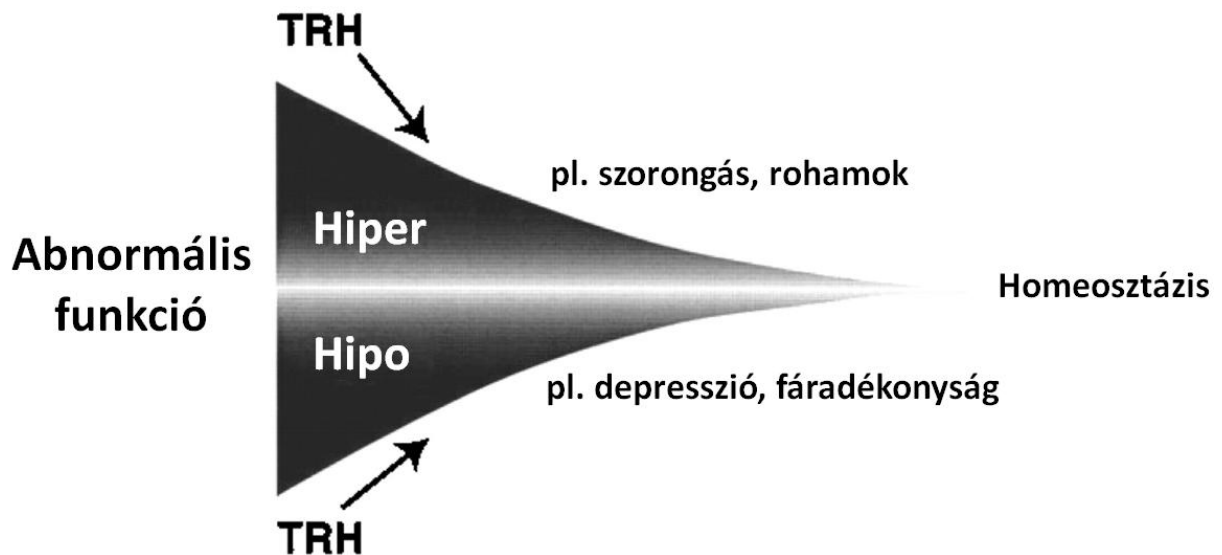
Ismert, hogy neuron-neuron kapcsolatokban a preszinaptikus terminálisokból ürülő glutamát mGLUR1 és mGLUR5 glutamát receptorokon hatva fokozza a posztzinaptikus neuron endokannabinoid termelését [86]. Mivel a PVN TRH idegsejtjei glutamáterg idegsejtek [34], felvetettük a lehetőségét, hogy a TRH sejtek glutamát ürítése serkenti a tanicitákat, mely sejtek emelkedett endokannabinoid termelése ezt követően gátolja a TRH axonok aktivitását.

A PVN-ben a hipofiziotróf TRH idegsejtek mellett nagyszámú nem-hipofiziotróf TRH idegsejt is található, mely sejtek nem vetülnek az EM külső zónájába, így nem vesznek részt a pajzsmirigy működés szabályozásában [62]. E sejtek a TRH-t neurotranszmitterként használják [62]. A központi idegrendszerbe beadott TRH számos funkciót szabályoz a HHP tengely aktivitásától függetlenül, például az alvás-ébrenlétet, hőháztartást, kardiovaszkuláris funkciókat, bélmotilitást, görcskészséget, táplálékfelvételt és energialeadást.

A PVN nem-hipofiziotróf TRH sejtjeinek funkciójáról azonban nagyon kevés információval rendelkezünk. A PVN elülső parvocelluláris almagjában található nem-hipofiziotróf TRH idegsejteket sűrűn beidegzik táplálkozással kapcsolatos peptideket tartalmazó axonok, mint például az AGRP, α -MSH, CART, galanin és galanin-szerű peptid-tartalmú axonok [31, 58]. Továbbá ezek a sejtek a táplálkozással kapcsolatos magokat, arcuatus mag, DMN, és amigdala, idegeznek be [87]. Ezen információk arra utalnak, hogy a PVN nem-hipofiziotróf TRH sejtjei részt vehetnek az energiaháztartás szabályozásában.

TRH idegsejtek a PVN-en kívül is megtalálható számos agyterületen. Azonban a PVN-en kívüli TRH sejtcsoportok közül egy sem vetül az EM-ba, így a TRH sejtcsoportok nem hipofiziotróf TRH sejtek [1].

Habár a PVN-ben a hipofiziotróf és nem hipofiziotróf TRH sejtek egymással keverednek, feltételezzük, hogy az eltérő funkciójuk és eltérő projekciójuk mellett a két sejtcsoport működése és szabályozása is eltérő lehet. Erre utal, hogy kizárólag a hipofiziotróf TRH sejtek termelnek CART-ot és kizárólag a sejtek TRH termelését szabályozzák a PMH-k [4]. A két TRH sejtcsoport szabályozásának különbségeinek megértése elősegítheti a sejtcsoportok célzott farmakológiai befolyásolását. Továbbá, hozzásegíthet ahhoz is, hogy pontosabb képet kapjunk arról, vajon az abnormális TRH funkció hátterében milyen folyamatok zajlanak le (4. ábra) [88].



4. Ábra: A TRH-alapú gyógyszerek homeosztatikus moduláló szerepének konceptualizálása. A központi idegrendszer idegsejtjeinek aktivitása, ha jelentősen változik, eltér a megszokottól, akár hiper-, vagy hipofunkcióból adódik, klinikai szinten szorongásként, görcsrohamként, illetve depresszióként vagy fáradtsággént jelentkezhet. A TRH neuronális hálózatot az egyensúlyából kibillent központi idegrendszer aktiválja, oly módon, hogy a rendszert visszahelyezi a homeosztatikus szintre [88].

3. Célkitűzések

A HHP tengely centrális szabályozásának jobb megértése érdekében céljaink:

- 1) A TRH axonok tanicitákra kifejtett hatásának feltárása.
- 2) A TRH PVN-ben elhelyezkedő TRH idegsejtekre kifejtett hatásának megértése.

4. Anyagok és módszerek

4.1.1. Felhasznált állatok

A taniciták és a TRH axonok kapcsolatának vizsgálatához 28-32 g tömegű felnőtt, hím CD1 egereket, P40 és P60 napos kor közötti hím C57Bl/6J egereket és a munkacsoport által létrehozott felnőtt, hím TRH-IRES-Cre egereket használtunk.

A TRH TRH sejtekre kifejtett hatásának vizsgálatához felnőtt, hím TRH-IRES-tdTomato egereket [89] használtunk P40 és P80 nap közötti korban.

Az egereket standard körülmények között tartottuk (világítás 06.00 és 18.00 óra között, hőmérséklet 22 ± 1 ° C, táplálék és víz ad libitum). Az összes kísérleti protokollt az MTA Kísérleti Orvostudományi Intézet Állatetikai Bizottságai hagyta jóvá. A használt protokollok a laboratóriumi állatok gondozására és felhasználására vonatkozó NIH útmutatót követték. A kísérleti protokollokat Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács (ÁTET) is jóváhagyta (PE/EA/103-4/2021).

4.2. A hipofiziotróf neuronok azonosítása retrográd jelölőanyag, Fluoro-Gold alkalmazásával

TRH-IRES-TdTomato egerek laterális farokvénájába Fluoro-Gold retrográd jelölőanyagot injektáltunk (15 µg/testtömeg g 100 µl fiziológiás sóoldatban, Biotium Inc., CA, USA; N=4) [11]. E retrográd jelölőanyagot kizárólag a vér-agy gáton kívül elhelyezkedő vagy a vér-agy gáton kívülre vetülő idegsejtek axonjai veszik fel. Ezt követően a jelölőanyag retrográd transzporttal jut az idegsejtek perikaryonjába [90]. Mivel a hipofiziotróf TRH idegsejtek a vér-agy gát mentes EM-be vetülnek, a vénásan adott Fluoro-Gold alkalmas e sejteket megjelölésére. A Fluoro-Gold beadás után legalább 2 napot vártunk az állatok elektrofiziológiai kísérletre történő felhasználásáig.

A patch clamp elektrofiziológia során a vizsgált sejteket biocitinnel jelöltük. Az elektrofiziológiai adatok rögzítése után az összes agyszeletet 0,01 M foszfát pufferolt sóoldatban (PBS) oldott 4% paraformaldehidben pH = 7,4 fixáltuk éjszakán át, 4 ° C-on. A Fluoro-Goldot és a TRH idegsejteket jelölő tdTomato fluoreszcens fehérjét immuncitokémiával detektáltuk, míg a vizsgált idegsejtek biocitin tartalmát sztreptavidin-konjugált fluorokróm segítségével detektáltuk.

A fixálás után a szeleteket PBS-ben mostuk, majd 0,5% Triton X-100 és 0,5% H₂O₂ 0,01 M PBS-ben készült keverékével 20 percig kezeltük a penetráció növelése és az endogén peroxidáz aktivitás csökkentése érdekében. A nem specifikus antitest kötést PBS-ben oldott 2% normál ló szérumban (NHS) blokkoltuk 20 percig, szobahőmérsékleten (RT). Ezután a metszeteket birka anti-tdTomato szérum [89] 1: 80,000 hígítású és nyúl anti-Fluoro-Gold antitest (Chemicon International Inc.) 1: 12,000 hígítású oldatában inkubáltuk 1 éjen át szobahőmérsékleten. Az antitesteket antitest hígító oldatban hígítottuk (2% NHS, 0,2% nátrium-azid 0,01M PBS-ben). PBS-ben végzett mosás után a metszeteket szobahőmérsékleten 2 órán át peroxidázzal konjugált számarban termelt nyúl IgG ellenes IgG-ben (1: 250; Jackson Laboratories) inkubáltuk. PBS-ben végzett mosás után a szeleteket 2 órán át szobahőmérsékleten Alexa 555 konjugált számarban termelt birka IgG ellenes IgG (1: 500; Thermo Fisher Scientific), sztreptavidinnel konjugált Alexa 488 (1: 250; The Jackson Laboratory) és AMCA-konjugált tiramid keverékében inkubáltuk (1: 250; Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Waltham, MA). Az AMCA-konjugált tiramidot azért adtuk hozzá a másodlagos antitestek keverékéhez, hogy az AMCA-konjugált tiramidnak legyen ideje bejutni a vastag metszetbe a tiramid amplifikáció előtt. Ezután a szeleteket 20 percig 1 ml 0,05 M Tris pufferbe (TB) helyeztük, amely 3,3 µl 3% H₂O₂ és 4 µl AMCA-konjugált tiramidot tartalmazott. E tiramid amplifikáció erősítette a Fluoro-Gold kimutathatóságát. PBS-ben végzett mosás után a szeleteket TB-ből üveglemezre húztuk fel és Vectashield-del (Vector) fedtük le. A szeletekről Zeiss LSM 780 konfokális mikroszkóppal (Zeiss Company, Jena, Németország), soronkénti szekvenciális pásztázással felvételeket készítettünk. A felvételekhez a következő beállításokkal készültek: lézer gerjesztési vonalak: 405 nm (AMCA), 488 nm (Alexa Fluor 488) és 561 nm (Alexa Fluor 555); beamsplitter: MBS 405 és MBS 488/561. Az AMCA, az Alexa 488 és az Alexa 555 fluorokrómok által kibocsátott fényt 410-483 nm, 490-570 nm és 574-712 nm tartományokra beállított szűrőkkel szűrtük. Plan-Apochromat 20x / 0,8 M27 lencsét használtunk Z-stack felvételek készítéséhez. A pinhole méretet 1 "Airy Unit" egységre állítottuk be, így 2,50 µm vastag optikai szeleteket detektáltunk. A Z-irányú sorozatokat 1,23 µm Z irányú léptetéssel vettük fel. A képeket a Zen 2012 (Zeiss Company, Jena, Németország) és az Adobe Photoshop (Adobe System Inc., Kalifornia, USA) programok segítségével elemeztük.

4.5. Hipotalamikus szeletek készítése in-vitro patch clamp elektrofiziológiai mérésekhez

Az egereket mély izoflurán altatásban dekapitáltuk. Az agyakat a koponyából történő gyors eltávolítást követően 95% O₂/ 5% CO₂ keverékével buborékoltatott, jéghideg szeletelő oldatba merítettük, amely 87 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 0,5 mM CaCl₂, 7 mM MgCl₂, 25 mM NaHCO₃, 25 mM D-glükóz, 1,25 mM NaH₂PO₄, 75 mM szacharózt tartalmazott. VT1200S vibratómmal (Leica) koronális, 250 µm vastag PVN vagy az EM-t tartalmazó szeleteket készítettünk, majd a szeleteket mesterséges cerebroszpinális folyadékkal (aCSF; mM-ban: 126 NaCl, 2,5 KCl, 26 NaHCO₃, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂, 1,25 NaH₂PO₄, 10 glükóz; pH 7,4; 280-300 mOsm /L; 36 ° C) töltött kamrában inkubáltuk legalább 1,5 órán keresztül. Ez idő alatt az inkubációs oldatot fokozatosan szobahőmérsékletre hűtöttük le.

4.6. Adatgyűjtés és adatelemzés TRH neuronok és a taniciták elektrofiziológiai vizsgálatához

A hipotalamikus szeleteket az elektrofiziológiai méréshez merülő típusú kamrába helyeztük. A kamrán keresztül 32-33 °C hőmérsékletű aCSF-t áramoltattunk körülbelül 1 ml/perc sebességgel. Az aCSF hőmérsékletét TC7 típusú hőmérséklet-szabályozóval (Luigs & Neumann GMBH, Ratingen, Németország) szabályoztuk.

A TRH sejtek vizsgálatához 4-6 MΩ ellenállású, a taniciták vizsgálatához 6-8 MΩ ellenállású, boroszilikát kapillárisból (OD = 1,5 mm, vastag falú, (World Precision Instruments Co.)) készült patch pipettákat használtunk. A kapillárisok húzásához P-1000 horizontális húzót (Sutter Instrument Co.) használtunk. A kísérletekhez a miniatűr gátló posztzinaptikus áramok (mIPSC) elemzésének kivételével, a patch pipettákat alacsony klorid-tartalmú intracelluláris recording oldattal töltöttük meg (mM-ban): 110 K-glükonát, 4 NaCl, 20 HEPES, 0,1 EGTA, 2 Mg- ATP, 0,3 Na-GTP, 10 foszfokreatin só és 8 biocitin (pH 7,25; 290-300 mOsm / l).

Az mIPSC vizsgálatokhoz magas klorid-tartalmú intracelluláris pipetta oldatot használtunk. Ez az oldat a következőket tartalmazta (mM-ban): 54 K-glükonát, 56 KCl, 4 NaCl, 20 HEPES, 0,1 EGTA, 2 Mg-ATP, 0,3 Na-GTP, 10 foszfokreatin sót és 8 biocitint (pH 7,25; 290-300 mOsm /mL).

A TRH idegsejteket a tdTomato vörös fluoreszcenciája alapján azonosítottuk rövid epifluoreszcens megvilágítás mellett. Ezután a sejteket szintén infravörös differenciál interferencia kontraszt megvilágítás mellett tanulmányoztuk.

A β_2 -tanicitákat tipikus morfológiájuk és a sejttestük elhelyezkedése alapján azonosítottuk [79] a harmadik kamra bazális részén infravörös differenciál interferencia kontraszt megvilágítás segítségével.

A vizsgálatokhoz FN1 mikroszkópot (Nikon), 40x víz-immersiós objektívet használtunk. A mikroszkóp Zyla CCD kamerával (ANDOR) volt felszerelve.

Mivel a taniciták közt konnexin 43-tartalmú gap junction kapcsolatok vannak és e sejtek a környezetükkel konnexin 43-tartalmú félcatornákkal is kommunikálnak [91], e csatornákat gátló karbenoxolont (CBX; 100 μ M, Tocris) adtunk az aCSF-hez a taniciták vizsgálatokor, hogy blokkolják az intercelluláris kommunikációt a gap junction-okon keresztül. A glutamát tanicitákra kifejtett hatásának vizsgálatokor a lehetséges közvetett hatások megelőzése érdekében a feszültségfüggő nátrium csatorna gátlót, a tetrodotoxint (TTX) (600 nM, Tocris) is folyamatosan adagoltuk az aCSF-be.

Az elektrofiziológiai felvételeket Multiclamp 700B patch clamp erősítővel, Digidata-1440A adatgyűjtő rendszerrel és pCLAMP 10.4 szoftverrel (Molecular Devices) végeztük. Az erősítő állványát Luigs & Neumann SM7 mikromanipulátor rendszerhez illesztettük. A whole-cell patch-clamp felvételeket 10 kHz-en szűrtük az erősítő Bessel-szűrőjével, és szintén 10 kHz-en digitalizáltuk. A lassú és gyors kapacitív komponenseket automatikusan kompenzáltuk. A patch stabilitását a kísérlet során az access resistance ismételt figyelemmel kísérésével ellenőriztük le. A liquid junction potenciál nem volt ki kompenzálva.

4.7. Whole-cell patch clamp mérések

4.7.2. A TRH TRH idegsejtekre kifejtett hatásának vizsgálata

Az akciós potenciálok frekvenciáját (AP) az $I=0$ beállítás mellett vizsgáltuk. A TRH idegsejteket, melyek ilyen beállítás mellett nem tüzeltek, kizártuk a kísérletből. Az AP frekvencia és a nyugalmi membránpotenciál (MP) stabilizálása után 2 perc hosszú periódust regisztráltunk, mint kontroll periódust (N = 14). Ezután a szeleteket TRH-val (1 μ M) kezeltük a perfúziós rendszeren keresztül. A TRH-nak a TRH neuronok MP-jára kifejtett hatását

extracelluláris oldatba adagolt TTX jelenlétében is vizsgáltuk (N = 11), hogy megértsük, hogy a TRH közvetlenül hat-e a vizsgált TRH sejtre.

A TRH-nak a PVN hipofiziotróf és nem hipofiziotróf TRH neuronjaira kifejtett hatásának összehasonításához intravénás Fluoro-Gold kezelést követően vizsgáltuk a TRH-nak a TRH-IRES-tdTomato egerek TRH neuronjaira (hipofiziotróf N = 13; nem hipofiziotróf N = 7) kifejtett hatását a fent leírtak szerint. Bár a Fluoro-Gold rendelkezik autofluoreszcenciával [90], a fluoreszcens molekula gerjesztéséhez ultraibolya tartományú fényre van szükség, ami toxikus hatású az élő sejtekre, ezért a vizsgált TRH idegsejteket a patch clamp mérések után immunfluoreszcens detektálás és konfokális mikroszkópia segítségével soroltuk be a hipofiziotróf vagy nem-hipofiziotróf kategóriába.

A TRH-nak a vizsgált TRH neuronok szinaptikus bemeneteire kifejtett hatásának vizsgálatához, a TRH neuronokon mérhető miniatűr posztszinaptikus áramokat vizsgáltuk -70 mV tartó potenciálon. Az mEPSC-k vizsgálatokor (N = 28) alacsony klorid tartalmú intracelluláris oldatot használtunk. Extracelluláris oldatba adagolt TTX alkalmazásával blokkoltuk az idegsejtek akciós potenciálját és a GABA_A-R gátló picrotoxin (PTX) alkalmazásával blokkoltuk a GABAerg áramokat. Az mIPSC-k vizsgálatához magas klorid tartalmú intracelluláris oldatot alkalmaztam (N = 8). A vizsgálat során az aCSF tartalmazott kinurénsavat a glutamát áramok blokkolásához és TTX-t. A felvétel stabilizálódása után 2 perces kontroll periódust rögzítettünk, amit a fentiekben leírt TRH kezelés (2 perc) követett.

Hogy megértsük, hogy a TRH közvetlenül a preszinaptikus axonokra hatva befolyásolja az mEPSC-k frekvenciáját vagy a vizsgált TRH neuronokra hatva fokozza retrográd transzmitterek felszabadulását és így befolyásolja az mEPSC frekvenciát, a vizsgált TRH idegsejtekben gátoltuk a G-protein jelátvitelt intracelluláris oldatba adagolt GDP-β-S segítségével (2 mM, Sigma-Aldrich, N = 11). A BDNF-TrkB és az endokannabinoid rendszerek e hatás közvetítésében játszott szerepének igazolásához TrkB inhibitor ciklotraxin B-t (CTXB; 2 μM, Tocris; N = 12) és CB1 receptor antagonistát (AM251, 1 μM, Tocris; N = 14) alkalmaztunk.

4.7.1. A TRH axonok transzmittereinek tanicitákra kifejtett hatásának vizsgálata

A taniciták MP-ját közvetlenül a membrán betörés után, current-clamp módban mértük (I = 0). Mindegyik kísérletsorozatban a MP stabilizálódását követően egy kontroll periódust rögzítettünk (2-3 perc), amelyet egy 3-4 perces kezelési fázis követett. A kezelés során a

perfúziót megnyitottuk. A kezelésre használt anyag (TRH, glutamát, kainát, AMPA, NMDA) végső térfogata 300 μL volt, és a kezelés addig tartott, amíg ez a térfogat át nem folyt a felvételre szolgáló kamrán. A kezelések β_2 -taniciták MP-jára kifejtett hatását vizsgáltuk. A kezelésre használt anyagok kimosása minden esetben helyreállította a β_2 -taniciták MP-ját.

4.8. A hipofiziotróf TRH axonok tanicitákra kifejtett hatásának vizsgálata

AAV5.EF1a.DIO.hChR2(H134R)-eYFP.WPRE.hGH vírust (Addgene 20298P) injektáltunk 19 TRH-IRES-Cre egér PVN-jébe mindkét oldalon. A műtéteket egy biológiai kettes biztonsági szintű (BSL-2) vírus laboratóriumban végeztük. Xilazin és ketamin keverékével (25 mg/kg xilazin és 125 mg/kg ketamin fiziológiás sóoldatban) altatott egerek fejét sztereotaxiás készülékben (Kopf Instruments, Tujunga, Kalifornia, USA) rögzítettük. A koponyán készített furaton keresztül Nanoject II /Nanoliter 2000 mikroinjektorhoz (Drummond Scientific Co. vagy WPI Inc.) csatlakoztatott üvegpipettát (a pipettacsúcs külső átmérője 20 μm volt) süllyesztettünk le az agyba a PVN sztereotaxiás koordinátáinak megfelelően (Bregmához képest: anteroposterior: -0,7 mm, mediolaterális: + vagy -0,3 mm, dorsoventrálisan: -5,0 mm; [92]). Mindkét oldali PVN-be 20 nl vírus tartalmú oldatot injektáltuk 100 nl/perc sebességgel és további 30 nl-t 57 nl/perc sebességgel. Az injektálás után három perccel a pipettákat lassan eltávolítottuk, a fejbőrt összevarrtuk, és az egereket 2 hétig BSL-2 karanténban tartottuk. A kísérlet napján az egereket izoflurán altatásban dekapitáltuk, és a fentiek szerint szeleteket készítettünk az elektrofiziológiai mérésekhez. β_2 -tanicitákon patch clamp méréseket végeztünk és MP-t a fent leírtak szerint mértük meg. A channelrhodopszin tartalmú TRH axonok aktiválásához a lézer (473 nm, Roithner Lasertechnik GmbH, Bécs, Ausztria) fényét mikromanipulátorra rögzített száloptikai kábel (200 μm mag átmérőjű) segítségével vezettük az EM külső zónájába. A száloptika végét a vizsgált tanicita nyúlványától 1-2 mm-re pozícionáltuk. A fényintenzitást kézi lézeres teljesítménymérővel (Edmund Optics; Nether Poppleton, York, Egyesült Királyság) kalibráltuk. Maximum 2,5 mW fényt juttattunk a szövetbe. Az ingerléskor 0,1 s ideig 10 Hz frekvenciájú 2 ms hosszúságú fényfelvillanásokat alkalmaztunk. A MP változását PClamp v10.7 program alkalmazásával mértük. Minden mérésnél 10 db 0,1 s hosszúságú ingerlés sorozat (sweep) során nyert adatokat átlagoltuk. A sejtek egy részében a fotostimuláció hatását a kainát és AMPA receptor inhibitor DNQX (500 μM) és a glutamát transzporter (EAAT-típus) inhibitor TBOA (1 mM) jelenlétében is tanulmányoztuk. Annak eldöntésére, hogy a kék lézerfény képes-e közvetlenül befolyásolni a tanicitákat, kontroll kísérletet

hajtottunk végre TRH-IRES-tdTomato egerek szeletein, ahol a TRH axonok tartalmazták a tdTomato fluoreszcens proteint, de nem tartalmaztak channelrhodopsint.

4.9. Statisztikai analízis

A TRH neuronok mért paramétereit (AP frekvencia, MP és mPSC frekvencia, csúcs amplitúdó, félszélesség) a pCLAMP 10.7 szoftver (Molecular Devices) Clampfit modulja segítségével elemeztük, majd az OriginPro 2015 program felhasználásával végeztünk statisztikai elemzést. Statisztikai összehasonlításhoz az önkontrollós kísérletek esetében a páros-Student t-tesztet használtuk (TRH sejtek adatai TRH kezelés előtt és után). Minden adatot átlag \pm átlag szórása (standard error of mean; SEM) formájában jelenítettünk meg. Minden esetben a $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak. A tüzelési frekvencia illetve az mPSC frekvencia 10%-ot meghaladó változása esetén tekintettük a vizsgált sejtet TRH kezelésre reagáló sejtnek [93, 94]. A Grubbs-teszt alapján kiugrónak minősített értékeket eltávolítottuk az elemzésből. A taniciták vizsgálata során nyert adatokon ANOVA elemzést végeztünk, amit Bonferroni *post hoc* teszt követett.

5. Eredmények

5.2.1. A TRH kezelés hatása a PVN-ben elhelyezkedő TRH idegsejtek tüzelési frekvenciájára és membránpotenciáljára

A TRH kezelés a vizsgált (N = 21) TRH neuronok 52% -ában (N = 11) fokozta a tüzelési frekvenciát (kontroll vs. TRH, Hz-ben megadva: $2,02 \pm 0,73$ vs. $3,42 \pm 0,77$; $p < 0,005$; 5.A Ábra, bal). Ezekben a TRH neuronokban a kezelés átlagosan 3,67 mV depolarizációt okozott (kontroll vs. TRH, mV-ban megadva: $-47,12 \pm 1,19$ vs. $-44,45 \pm 1,17$; $p < 0,005$; 5.C Ábra, bal). A TRH idegsejtek fennmaradó 48%-ában (N = 10) a TRH nem serkentette a tüzelési frekvenciát (kontroll vs. TRH, Hz-ben megadva: $3,76 \pm 0,85$ vs. $3,61 \pm 0,80$; $P = 0,91$; 5.A Ábra, közép), és nem befolyásolta a MP-t (kontroll vs. TRH, mV-ban megadva: $-43,27 \pm 2,39$ vs. $-42,69 \pm 2,48$; $P = 0,98$; 5.C Ábra, közép). A TRH kezelésnek a tüzelési frekvenciára (AP frekvencia változása (Hz), TRH-ra válaszoló vs. TRH-ra nem válaszoló neuronok: $1,41 \pm 0,28$ vs. $-0,15 \pm 0,10$; $p < 0,005$) és MP értékre (MP változás (mV), TRH-ra válaszoló vs. TRH-ra nem válaszoló: $3,68 \pm 0,62$ vs. $0,58 \pm 0,23$; $p < 0,005$) gyakorolt hatása alapján a TRH kezelésre reagáló és nem reagáló TRH sejtek csoportja szignifikánsan különbözött egymástól (5.A és C Ábra, jobb).

A feszültségfüggő nátrium csatorna inhibitor (TTX) jelenléte az extracelluláris oldatban nem befolyásolta a TRH-nak a MP-ra kifejtett hatását. A TRH TTX jelenlétében is az összes vizsgált TRH sejt MP-ját megközelítőleg 2 mV-val depolarizálta (N = 20; kontroll vs. TRH, (mV): $-44,86 \pm 1,25$ vs. $-43,01 \pm 1,26$; $p < 0,05$ (5.E Ábra)), ami arra utal, hogy a TRH közvetlenül serkenti a PVN TRH idegsejtjeit.

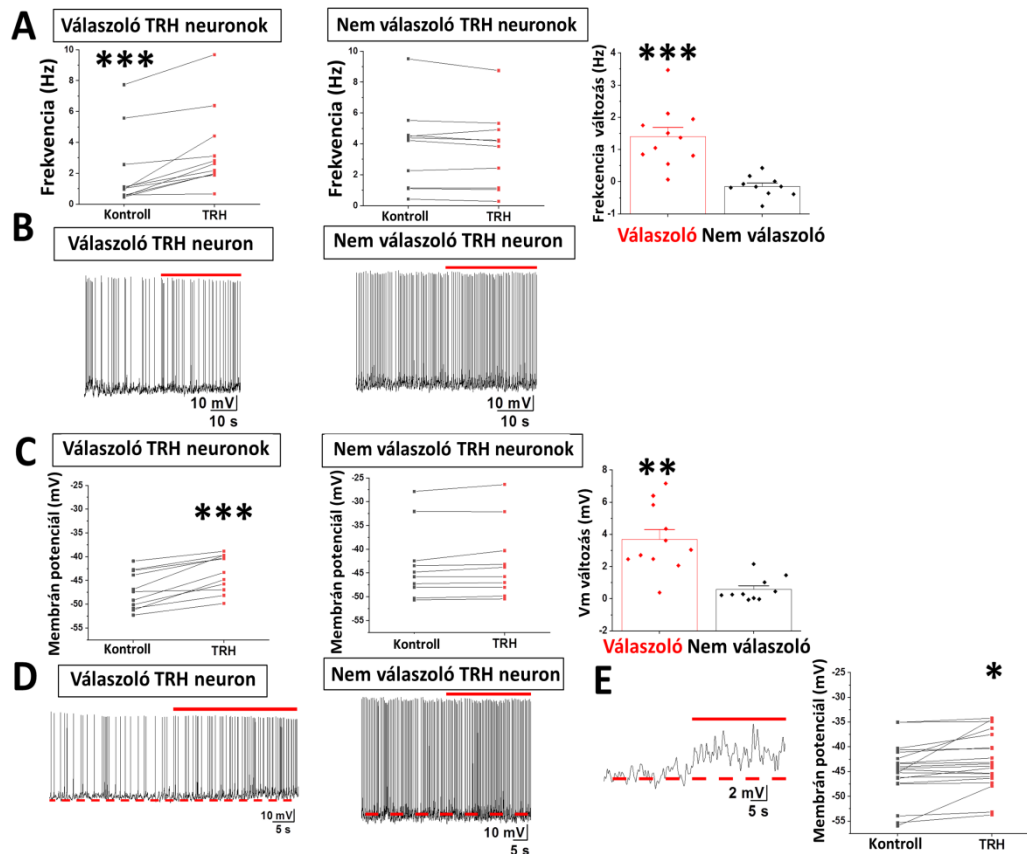
5.2.2. A TRH kezelés hatása a PVN hipofiziotróf és nem-hipofiziotróf TRH idegsejtjeire

A TRH-nak a PVN hipofiziotróf és nem-hipofiziotróf TRH neuronjaira gyakorolt hatásának összehasonlításához, Fluoro-Gold kezelt egerekből készített szeletekben vizsgáltunk 19 TRH neuront. Konfokális mikroszkóppal végzett elemzés alapján 12 vizsgált TRH neuront hipofiziotróf, 7 vizsgált TRH idegsejtet pedig nem-hipofiziotróf neuronként azonosítottunk a Fluoro-Gold tartalom alapján.

A TRH kezelés növelte a tüzelési frekvenciát a vizsgált hipofiziotróf TRH neuronok 58% -ban (N = 7/12; kontroll vs. TRH (Hz): $0,80 \pm 0,14$ vs. $1,46 \pm 0,22$; $p < 0,05$). A fennmaradó 5

hipofiziotróf TRH idegsejt esetében a TRH kezelés nem fokozta a tüzelés frekvenciáját (kontroll vs. TRH (Hz): $4,78 \pm 1,41$ vs. $3,83 \pm 1,14$; $P = 0,09$) (6.A Ábra, bal).

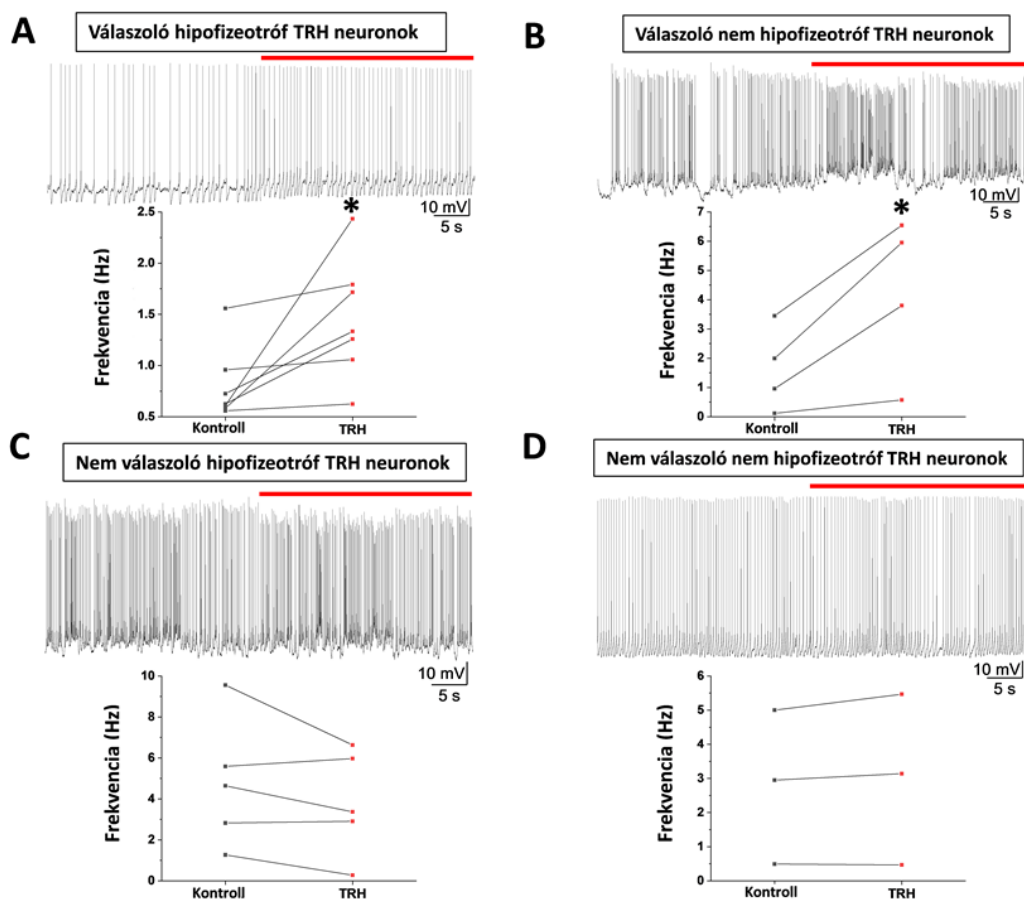
A vizsgált nem-hipofiziotróf TRH neuronok 57% -át ($N = 4/7$) serkentette a TRH kezelés (kontroll vs. TRH, (Hz): $1,63 \pm 0,72$ vs. $4,22 \pm 1,35$; $p < 0,05$). A fennmaradó három nem-hipofiziotróf TRH idegsejtet nem befolyásolta a TRH kezelés (kontroll vs. TRH (Hz): $2,81 \pm 1,30$ vs. $3,03 \pm 1,44$; $P = 0,28$) (6.B Ábra).



5. Ábra. A TRH kezelés hatása a PVN TRH neuronjainak tüzelési frekvenciájára és MP-jára. A grafikonok (A) szemléltetik a TRH-nak a PVN-ben elhelyezkedő TRH neuronok tüzelési frekvenciára gyakorolt hatását. A TRH neuronok 57% -ában ($N = 8$; Válaszó TRH neuronok) a TRH szignifikánsan növelte a tüzelési frekvenciát, míg a TRH neuronok 43% -ában ($N = 6$; Nem válaszó TRH neuronok) a TRH ezen stimuláló hatása elmaradt. Az oszlopdiaagram szemlélteti a TRH által kiváltott tüzelési frekvencia változását a TRH neuronok válaszó és nem válaszó csoportjaiban. Reprezentatív példák (B) mutatják a TRH hatását a válaszó és nem válaszó TRH neuronok tüzelésére. A piros vonal jelzi a TRH kezelés időzítését. A (C) grafikonokon látható a TRH MP-ra gyakorolt hatása a PVN TRH

neuronjaiban. A TRH idegsejteket válaszoló vagy nem válaszoló csoportokra bontottuk a TRH tüzelésre gyakorolt hatása alapján. Az oszlopdiagram szemlélteti a TRH neuronok válaszoló és nem válaszoló csoportjaiban MP TRH által kiváltott változását. Reprezentatív példák (D) szemléltetik a TRH MP-ra gyakorolt hatását a válaszoló és nem válaszoló TRH neuronokban. A piros vonal jelzi a TRH kezelés időzítését. (E) A szaggatott piros vonal mutatja az átlagos MP-t a kontroll periódusban. Reprezentatív példán és grafikonon látható a TRH MP-ra gyakorolt hatása a TRH neuronokban TTX jelenlétében ($N = 11$). A szaggatott piros vonal a kontroll periódus átlagos MP-t jelöli, míg a piros vonal a TRH kezelés időzítését mutatja.

Az oszlopdiagramok az adatok átlag \pm SEM értékét szemléltetik. *, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$.



6. Ábra. A TRH-nak a PVN hipofiziotróf és nem hipofiziotróf TRH neuronjainak tüzelési frekvenciájára (AP) gyakorolt hatása. Reprezentatív regisztrátumok és grafikonok szemléltetik a TRH hatását a válaszoló hipofiziotróf (A; $N = 7$) és a válaszoló nem-hipofiziotróf TRH neuronok AP frekvenciájára (B; $N = 4$), illetve a nem válaszoló hipofiziotróf (C; $N = 5$) és a

*nem válaszoló nem-hipofiziotróf TRH neuronok (D; N = 3) AP frekvenciájára. Piros vonalak jelzik a TRH kezelés időzítését. *, $p < 0,05$.*

5.2.3. A TRH hatása a PVN-ben elhelyezkedő TRH idegsejtek beidegzésére

A TRH kezelés nem volt hatással a vizsgált TRH neuronok (N = 7/8) mIPSC frekvenciájára (kontroll vs. TRH (Hz): $0,99 \pm 0,35$ vs. $0,93 \pm 0,39$; P = 0,30, N = 7) (7.A Ábra; 1. Táblázat). Kizárólag egy TRH neuron esetében észleltünk kisebb mértékű mIPSC frekvencia emelkedést (18,33% -os növekedés a TRH kezelést követően). A kezelés nem befolyásolta az mIPSC-k más mért paramétereit sem (csúcs amplitúdó, esemény félszélesség) (1. Táblázat).

A TRH mEPSC frekvenciára gyakorolt hatása alapján a TRH idegsejteket három kategóriába soroltuk. A TRH neuronok körülbelül felében (a 28 vizsgált sejtől 15, 53,57%) a TRH kezelés megnövelte az mEPSC frekvenciát. Ezekben a sejtekben a TRH-kezelés megközelítőleg 50% -kal növelte az mEPSC-k frekvenciáját (kontroll vs. TRH (Hz): $0,44 \pm 0,09$ vs. $0,64 \pm 0,12$; p < 0,01) (7.B ábra). E sejtekben a TRH kezelés befolyásolta az események félszélességét is (kontroll vs. TRH (ms): $1,60 \pm 0,15$ vs. $1,47 \pm 0,13$; p < 0,05) (2. Táblázat).

A TRH neuronok 40%-ban (a 28 vizsgált sejtől 11, 39,29%) a TRH kezelés gátolta az mEPSC-k frekvenciáját (kontroll vs. TRH (Hz): $0,87 \pm 0,14$ vs. $0,53 \pm 0,07$; p < 0,001) (7.C Ábra). Az mEPSC-k egyéb mért paramétereit a TRH kezelés nem befolyásolta. Két TRH neuron esetében (a 28 vizsgált sejtől 2, 7,14%) a TRH kezelés nem volt hatással az mEPSC-kre.

Annak megállapítására, hogy a TRH mEPSC-kre kifejtett hatása közvetlenül a preszinaptikus terminálon érvényesül vagy e hatást a vizsgált TRH neuron retrográd transzmitter kibocsátása közvetíti, a kísérleteket megismételtük intracelluláris oldatba adott G-protein inhibitor GDP- β -S jelenlétében is. A G-protein szignalizáció blokkolása a vizsgált TRH sejtben teljesen megakadályozta a TRH kezelés mEPSC frekvenciájára kifejtett hatását (N = 11; kontroll vs. TRH (Hz): $0,70 \pm 0,13$ vs. $0,69 \pm 0,13$; P = 0,34) (8.A Ábra). Ez arra utal, hogy a TRH nem közvetlenül a TRH idegsejtek serkentő inputjaira hat, hanem a vizsgált TRH idegsejtek retrográd transzmitter termelésére hatva befolyásolja e sejtek serkentő beidegzését.

A BDNF/TrkB retrográd transzmitter rendszer e hatás közvetítésében betöltött szerepének vizsgálatához TrkB inhibitor ciklotraxin B-t (CTX-B) használtunk, ami teljesen kivédte a TRH-nak a TRH neuronok mEPSC-jére kifejtett serkentő hatását. A vizsgált sejtek kétharmadában a TRH nem befolyásolta az mEPSC frekvenciát (N = 8/12; CTX-B vs. CTX-B + TRH (Hz): $0,63 \pm 0,37$ vs. $0,66 \pm 0,40$; P = 0,49). A vizsgált sejtek fennmaradó egyharmadában a TRH csökkentette az mEPSC-k frekvenciáját (N = 4/12, 33,33%; CTX-B vs. CTX-B + TRH (Hz): $0,87 \pm 0,33$ vs. $0,51 \pm 0,21$; p < 0,05) (8.B Ábra). Ez arra utal, hogy a CTX-B nem befolyásolta a TRH mEPSC frekvenciát gátló hatását. Az endokannabinoid rendszernek a TRH mEPSC frekvenciát gátló hatásának közvetítésében játszott szerepének vizsgálatához CTX-B mellett CB1 antagonistá AM251-et is adagoltunk az extraceluláris oldathoz. A vizsgált 14 sejtől 10 sejt esetében a TRH kezelés nem hatott az mEPSC frekvenciára (N = 10/14; kontroll vs. TRH (Hz): $0,57 \pm 0,18$ vs. $0,58 \pm 0,19$; P = 0,11). Négy sejt esetében az mEPSC frekvencia változása elérte a 10 %-ot, de e sejtek frekvenciájának változása sem különbözött szignifikánsan a kontroll értéktől (N = 4/14; kontroll vs. TRH, Hz-ben megadva: $1,57 \pm 0,82$ vs. $1,35 \pm 0,70$; P = 0,08). E négy sejt mEPSC frekvencia változása szignifikánsan kisebb volt, mint a TRH által az endokannabinoid rendszer blokkolása nélkül kiváltott gátló hatás (TRH által kiváltott gátlás (%), CTX-B vs. CTX-B+AM251: $42,93 \pm 4,43$ vs. $12,54 \pm 0,75$; p < 0,01). Ezen adatok arra utalnak, hogy a TRH mEPSC frekvenciát gátló hatását elsősorban az endokannabinoid rendszer közvetíti.

	mIPSC (N = 7)		
	Frekvencia (Hz)	Csúcs amplitúdó (pA)	Félszélesség (ms)
Kontroll	0.99 ± 0.35	-27.73 ± 5.52	5.06 ± 1.18
TRH	0.93 ± 0.39	-27.78 ± 6.01	4.05 ± 0.60

1. Táblázat: A TRH hatása a PVN TRH neuronjainak mIPSC-jére. Az adatok átlag \pm SEM-ként vannak feltüntetve. Szignifikáns különbség nem volt megfigyelhető.

		mEPSC (N = 26)		
		Frekvencia (Hz)	Csúcs amplitúdó (pA)	Félszélesség (ms)
Sejtek, melyekben a TRH stimulálta az mEPSC frekvenciát (N = 15)	Kontroll	0.44 ± 0.09	-24.86 ± 3.08	1.60 ± 0.15
	TRH	$0.64 \pm 0.12^{**}$	-24.55 ± 3.19	$1.47 \pm 0.13^{*}$
Sejtek, melyekben a TRH gátolta az mEPSC frekvenciát (N = 11)	Kontroll	0.87 ± 0.14	-24.88 ± 3.27	1.64 ± 0.21
	TRH	$0.53 \pm 0.07^{***}$	-24.59 ± 3.23	1.45 ± 0.12

2. Táblázat: A TRH hatása a PVN TRH neuronjainak mEPSC-jére. Az adatok átlag \pm SEM-ként vannak feltüntetve. *, p < 0,05, **, p < 0,01, ***, p < 0,001.

	GDP-β-S (N = 11)		
	Frekvencia (Hz)	Csúcs amplitúdó (pA)	Félszélesség (ms)
Kontroll	0.70 ± 0.13	-20.76 ± 1.87	1.24 ± 0.08
TRH	0.69 ± 0.13	-20.14 ± 1.54	1.28 ± 0.09

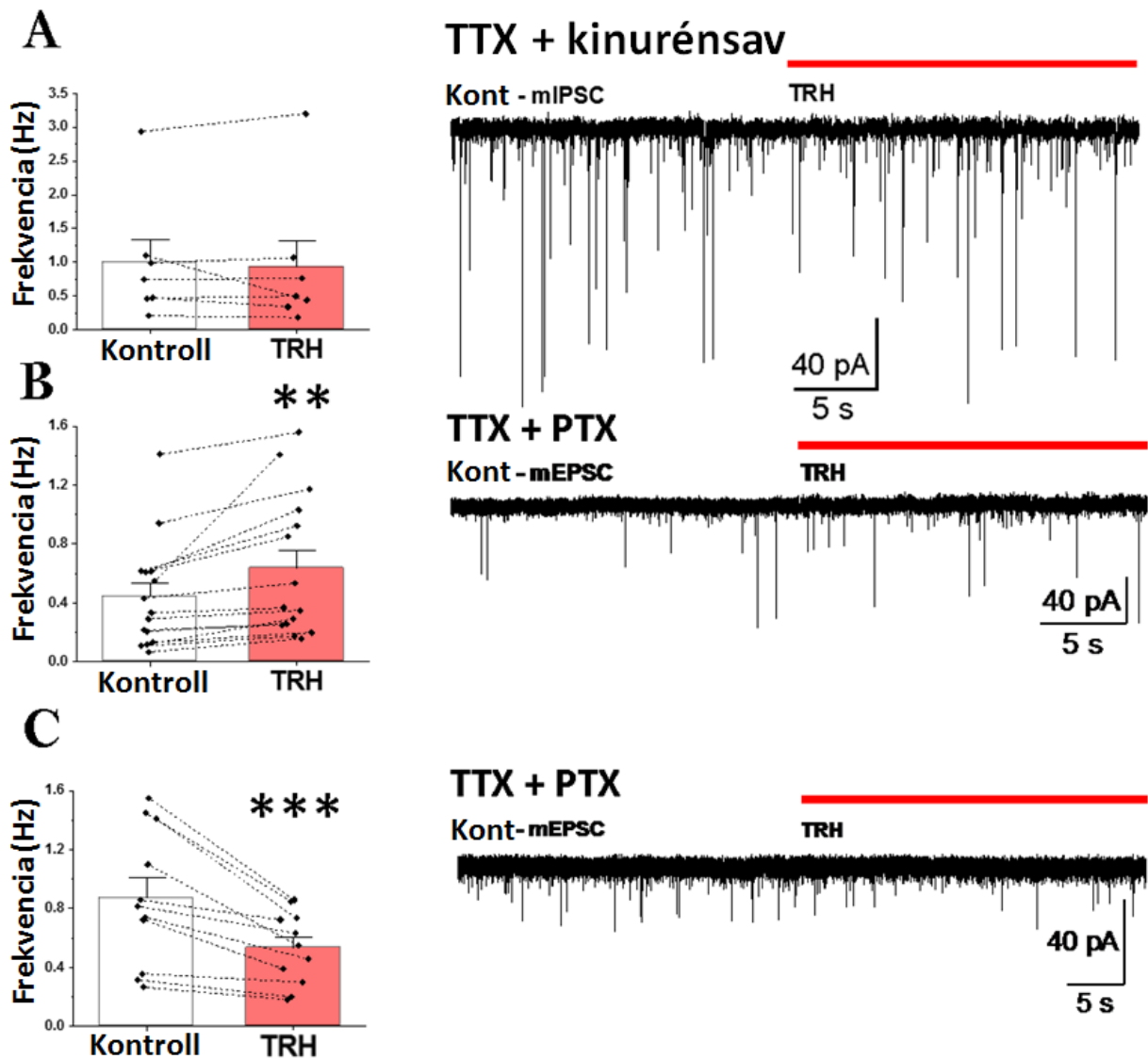
3. Táblázat: A TRH hatása a PVN TRH idegsejtjeinek mEPSC-jére, a G-protein jelátvitel GDP-β-S-vel történő blokkolása esetén. Az adatok átlag ± SEM-ként vannak feltüntetve. Szignifikáns hatás nem volt.

		CTX-B (N = 12)		
		Frekvencia (Hz)	Csúcs amplitúdó (pA)	Félszélesség (ms)
Sejtek, melyekben a TRH nem hatott az mEPSC frekvenciára (N = 8)	Kontroll	0.63 ± 0.37	-25.10 ± 1.44	1.31 ± 0.11
	TRH	0.66 ± 0.40	-24.60 ± 1.81	1.29 ± 0.09
Sejtek, melyekben a TRH gátolta az mEPSC frekvenciát (N = 4)	Kontroll	0.87 ± 0.33	-30.94 ± 5.17	1.74 ± 0.20
	TRH	0.51 ± 0.21 *	-27.87 ± 5.52	1.80 ± 0.30

4. Táblázat: A TRH hatása a PVN TRH idegsejtjeinek mEPSC-jére, a BDNF / TrkB jelátviteli útvonal CTX-B-vel történő gátlása mellett. Az adatok átlag ± SEM-ként vannak feltüntetve. *, $p < 0,05$.

		CTX-B + AM-251 (N = 14)		
		Frekvencia (Hz)	Csúcs amplitúdó (pA)	Félszélesség (ms)
Sejtek, melyekben a TRH nem hatott az mEPSC frekvenciára (N = 10)	Kontroll	0.57 ± 0.18	-22.57 ± 3.14	1.42 ± 0.19
	TRH	0.58 ± 0.19	-23.41 ± 3.83	1.46 ± 0.23
Sejtek, melyekben TRH hatására az mEPSC frekvencia legalább 10%-kal csökkent (N = 4)	Kontroll	1.57 ± 0.82	-23.10 ± 3.49	1.51 ± 0.35
	TRH	1.35 ± 0.70	-20.60 ± 3.10	1.35 ± 0.28

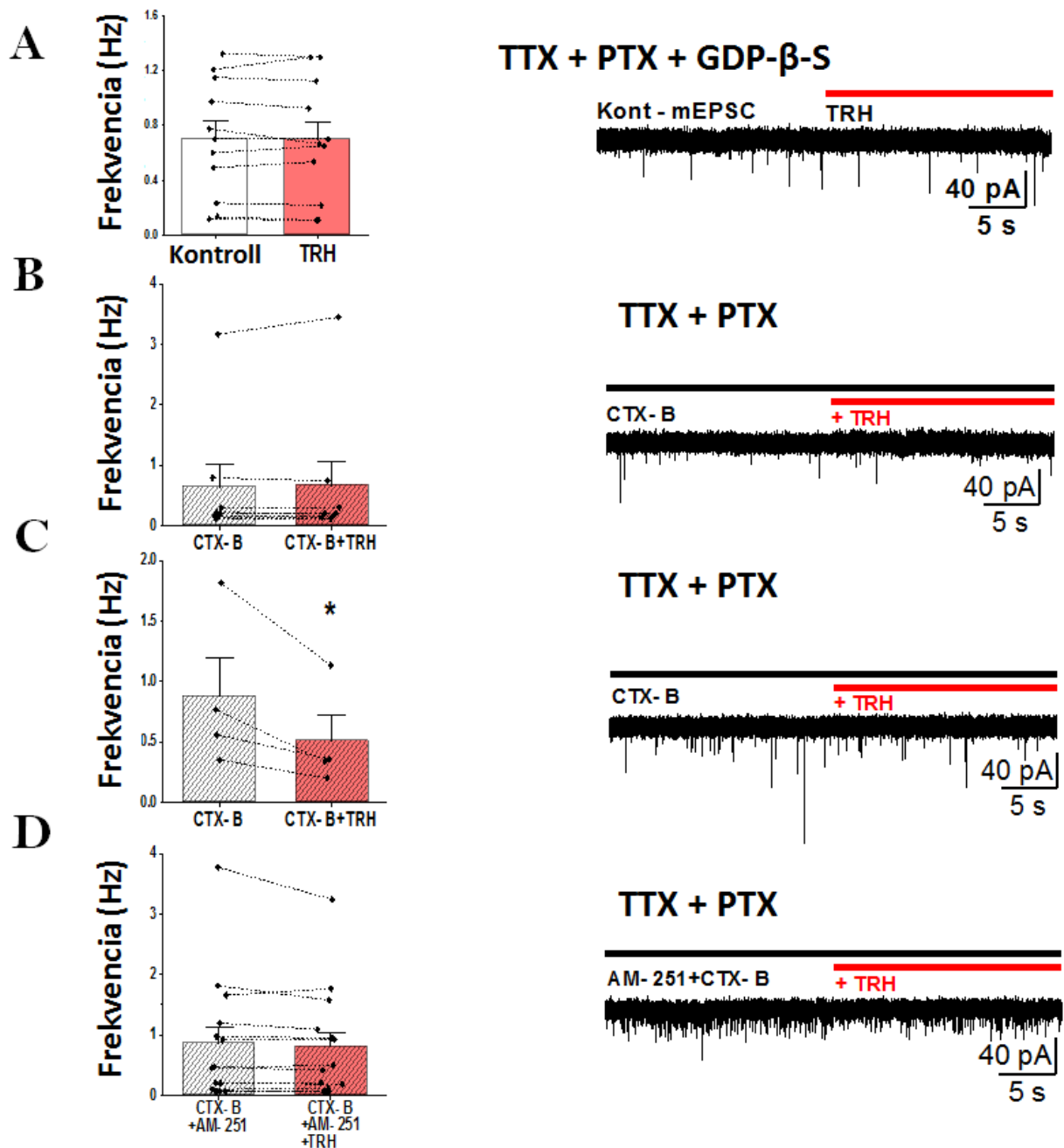
5. Táblázat: A TRH hatása a PVN TRH idegsejtjeinek mEPSC-jére, a BDNF és az endokannabinoid útvonalak együttes gátlása mellett. Az adatok átlag ± SEM-ként vannak feltüntetve. Szignifikáns eltérést nem mértünk.



7. Ábra. A TRH hatása a PVN-ben lévő TRH neuronok mIPSC (A) és mEPSC frekvenciájára (B-C). A grafikon és a reprezentatív példa (A, jobb) szemlélteti, hogy a TRH nem befolyásolta a PVN TRH neuronjainak mIPSC frekvenciáját. A mérések TTX + kinurénsav aCSF-ben történő alkalmazása mellett zajlottak. A TRH idegsejtek körülbelül felében ($N = 15/26$) a TRH kezelés megnövelte az mEPSC-k frekvenciáját (B), míg a TRH neuronok 42,31% -ban ($N = 11/26$) a TRH kezelés az mEPSC frekvencia csökkenését okozta (C). A tartó potenciál -70 mV

volt. Az adatokat Hz-ben, átlag \pm SEM formájában adtuk meg. Rövidítés: kont = kontroll. A reprezentatív felvételek felett elhelyezkedő piros vonalak a TRH kezelés időzítését mutatják.

** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.



8. Ábra. A TRH kezelés hatása a PVN-ben elhelyezkedő TRH sejtek mEPSC frekvenciájára intracelluláris GDP- β -S kezelés (A), CTX-B kezelés (B-C) és CTX-B + AM251 kezelés (D) mellett. A G-protein inhibitor GDP- β -S jelenléte az intracelluláris oldatban teljesen megakadályozta a TRH mEPSC frekvenciára gyakorolt hatását ($N = 11$; A). A Trk-B gátló

*CTX-B jelenlétében a TRH négy TRH neuron (N = 4/12) vizsgálatakor csökkentette az mEPSC-k frekvenciáját (B), míg a TRH neuronok 66,67% -ában (N = 8/12) a TRH kezelés nem befolyásolta az mEPSC frekvenciát (C). A CTX-B és a CB1 inhibitor AM251 együttes jelenléte az extracelluláris oldatban kivédte a TRH mEPSC-kre gyakorolt hatását (N = 14; D). A tartó potenciál -70 mV volt. Az adatokat Hz-ben, átlag \pm SEM formájában adtuk meg. A reprezentatív regisztrátumok feletti piros vonalak a TRH kezelés időzítését mutatják. A fekete vonalak a reprezentatív regisztrátumokon a CTX-B/CTX-B+AM251 kezelés időzítését mutatják. Rövidítés: kont = kontroll. *, $p < 0,05$.*

A TRH axonok és a taniciták kölcsönhatásának vizsgálata

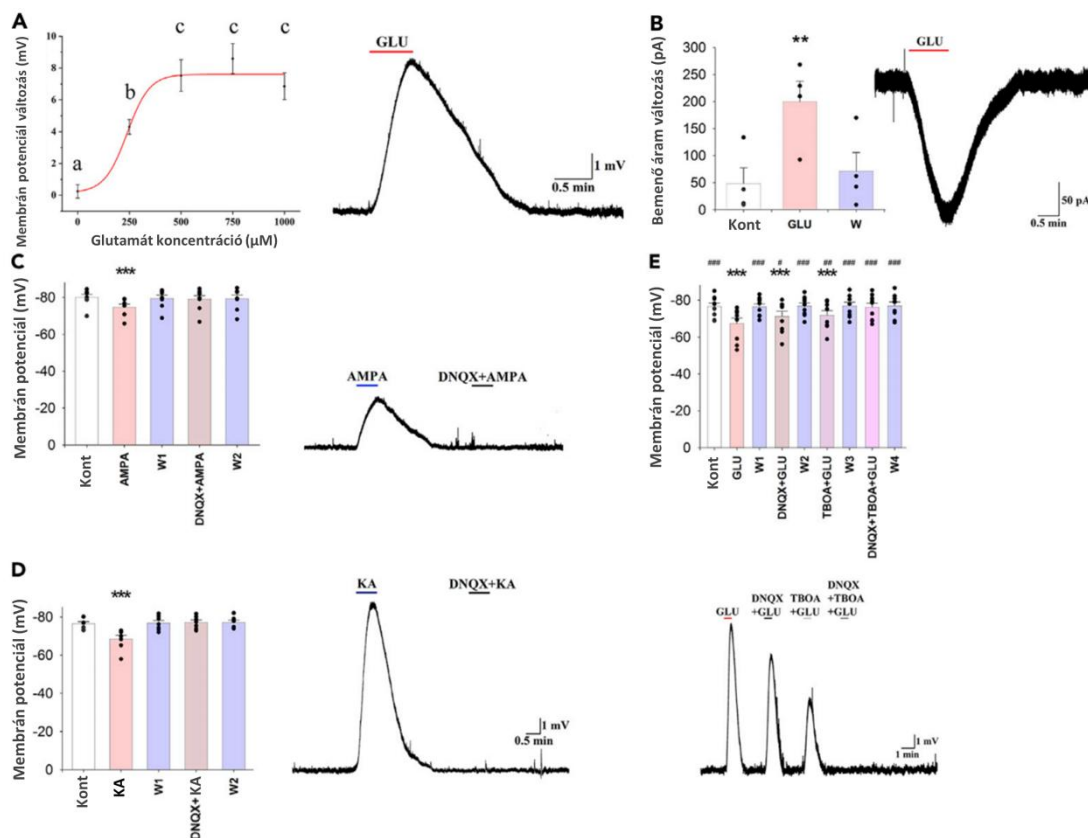
5.1.1. Glutamát kezelés depolarizálja a β_2 -tanicitákat az eminencia mediánában

A glutamát β_2 -tanicitákra gyakorolt hatását patch clamp elektrofiziológia alkalmazásával vizsgáltuk. A β_2 -taniciták MP értéke kontroll körülmények között $-77,52 \pm 0,47$ mV (N = 83) volt. A glutamát β_2 -taniciták MP-jára kifejtett hatása dóziszfüggő volt (glutamát kezelés által kiváltott MP változás: kontroll: $0,25 \pm 0,42$ mV, N = 6; 250 μ M: $4,29 \pm 0,46$ mV, N = 11, P = 0,038; 500 μ M: $7,53 \pm 0,99$ mV, N = 12, p < 0,001; 750 μ M: $8,59 \pm 0,94$ mV, N = 8, p < 0,001 és 1000 μ M: $6,85 \pm 0,83$ mV, N = 6, p < 0,001; 9.A Ábra).

A 250 μ M glutamáttal végzett kezelés szignifikáns depolarizációt okozott, de hatása szignifikánsan kisebb volt, mint az 500 μ M glutamáttal végzett kezelés esetében (P = 0,049). Mivel 500 μ M glutamát hatása hasonló volt, mint a 750 μ M vagy 1000 μ M glutamáttal végzett kezelés hatása, az 500 μ M koncentrációt választottuk ki a további vizsgálatokhoz.

5.1.2. A β_2 -tanicitákon funkcionális AMPA, kainát és GRM4 receptorok vannak jelen

A glutamát β_2 -taniciták MP-jára kifejtett hatását közvetítő receptorok azonosításához glutamát receptor agonisták és antagonisták hatását vizsgáltuk. A glutamáthoz hasonlóan az AMPA (100 μ M; $5,37 \pm 1,09$ mV; N = 8, p < 0,001; 9.C Ábra), és a kainát (125 μ M; $8,04 \pm 2,08$ mV, N = 7, p < 0,001; 9.D Ábra) jelentős mértékben depolarizálta a β_2 -tanicitákat. Az AMPA és a kainát receptor antagonistá DNQX (500 μ M) aCSF-ben alkalmazva kivédte mindkét agonista hatását (9.C. és 9.D. Ábra).



9. Ábra. A glutamát AMPA és kainát receptorok és a glutamát transzport révén depolarizálja a β_2 -tanicitákat.

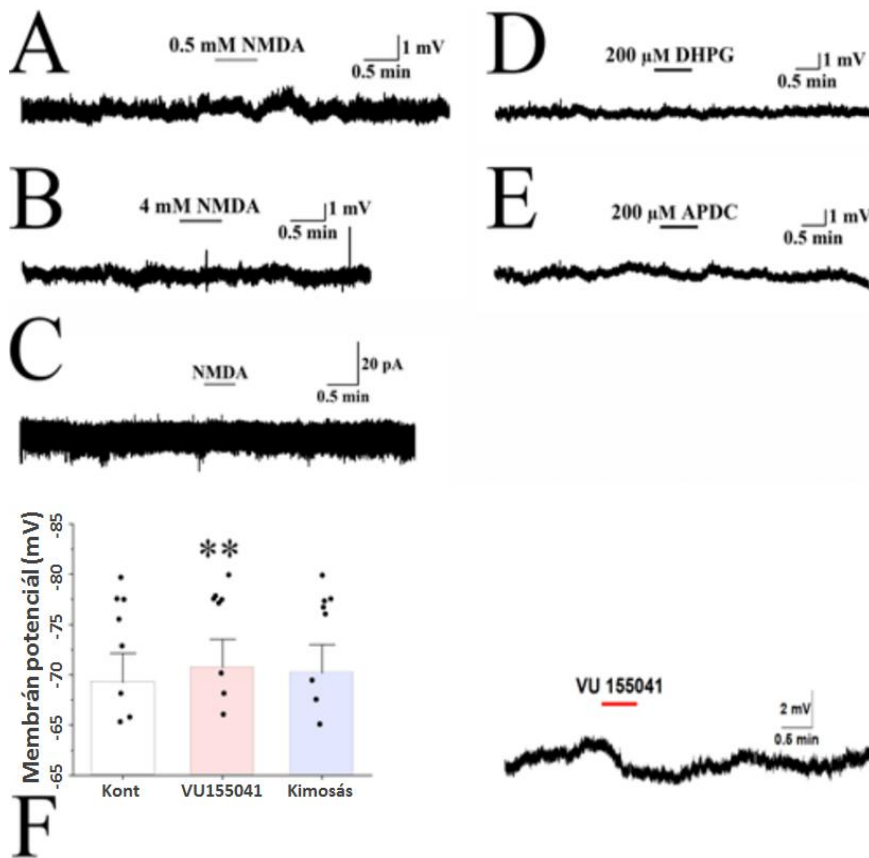
A grafikonok mellett reprezentatív felvételek szemléltetik a farmakológiai kezelések β_2 -tanicitákra kifejtett hatását.

(A) A glutamát dóziszfüggő depolarizációt indukált a β_2 -tanicitákban ($N_{kontroll} = 6$; $N_{250\mu M} = 11$; $N_{500\mu M} = 12$; $N_{750\mu M} = 8$; $N_{1000\mu M} = 6$). Egy reprezentatív példa szemlélteti a β_2 -taniciták MP-jának 500 μM glutamát hatására kialakuló MP változását. (B) A glutamát (500 μM ; $N = 4$) nagy befelé irányuló áramot váltott ki a β_2 -tanicitákban outside-out preparációkban, bizonyítva, hogy a glutamát közvetlenül befolyásolja a tanicitákat. A glutamához hasonlóan mind az AMPA (C, 100 μM ; $N = 8$), és a kainát is (D, 125 μM ; $N = 7$) depolarizálta a β_2 -tanicitákat. Az AMPA és kainát receptor antagonistá DNQX (500 μM) kezelés kivédte az AMPA és kainát hatását.

(E) Bár a DNQX (500 μM ; $N = 9$) és a glutamát transzport gátló TBOA is (1 mM; $N = 9$) jelentősen csökkentette, de nem védte ki a glutamát által kiváltott depolarizációt. A két inhibitor kombinációja azonban teljesen blokkolta a glutamát hatását ($N = 9$). Ezen adatok arra utalnak, hogy a glutamát β_2 -taniciták MP-ra gyakorolt hatását az AMPA és kainát

receptorok, valamint a TBOA érzékeny glutamát transzport közvetíti. Az adatok átlag \pm SEM értéként lettek feltüntetve. Az adatok ismételt méréses ANOVA-t követő Bonferroni post-hoc teszttel lettek elemezve. Az (A) grafikonon a különböző betűvel jelölt adatok szignifikánsan eltérnek egymástól ($p < 0,05$). *a kontrolltól szignifikánsan eltért ($p < 0,05$; # szignifikánsan különbözik a glutamát kezelt sejtektől $p < 0,05$; ** és ## $p < 0,01$; *** és ### $p < 0,001$. Rövidítések: Kont = kontroll, GLU = glutamát, KA = kainát, W = kimosás.

Az NMDA azonban még nagy koncentráció esetén sem volt hatással a taniciták MP értékére (MP változás: 0,5 mM NMDA, $1,41 \pm 0,65$ mV, N = 3, P = 0,42 és 4 mM NMDA: $2,12 \pm 0,3$ mV, N = 3, P = 1,00. 10.A-C Ábra). A VU 0155041 GRM4, metabotróp GluR modulátor (1 mM) agonistával történt kezelés kismértékű, de szignifikáns hiperpolarizációt eredményezett (MP változás: $-1,48 \pm 0,54$ mV, N = 10, $p < 0,01$) a β_2 -taniciták MP-ban (10.F Ábra). Ez arra utal, hogy valószínűtlen, hogy a GRM4 aktiválása hozzájárulna a taniciták glutamát által kiváltott depolarizációjához.



10. Ábra. NMDA és metabotróp glutamát receptor agonisták β_2 -taniciták MP-jára kifejtett hatása.

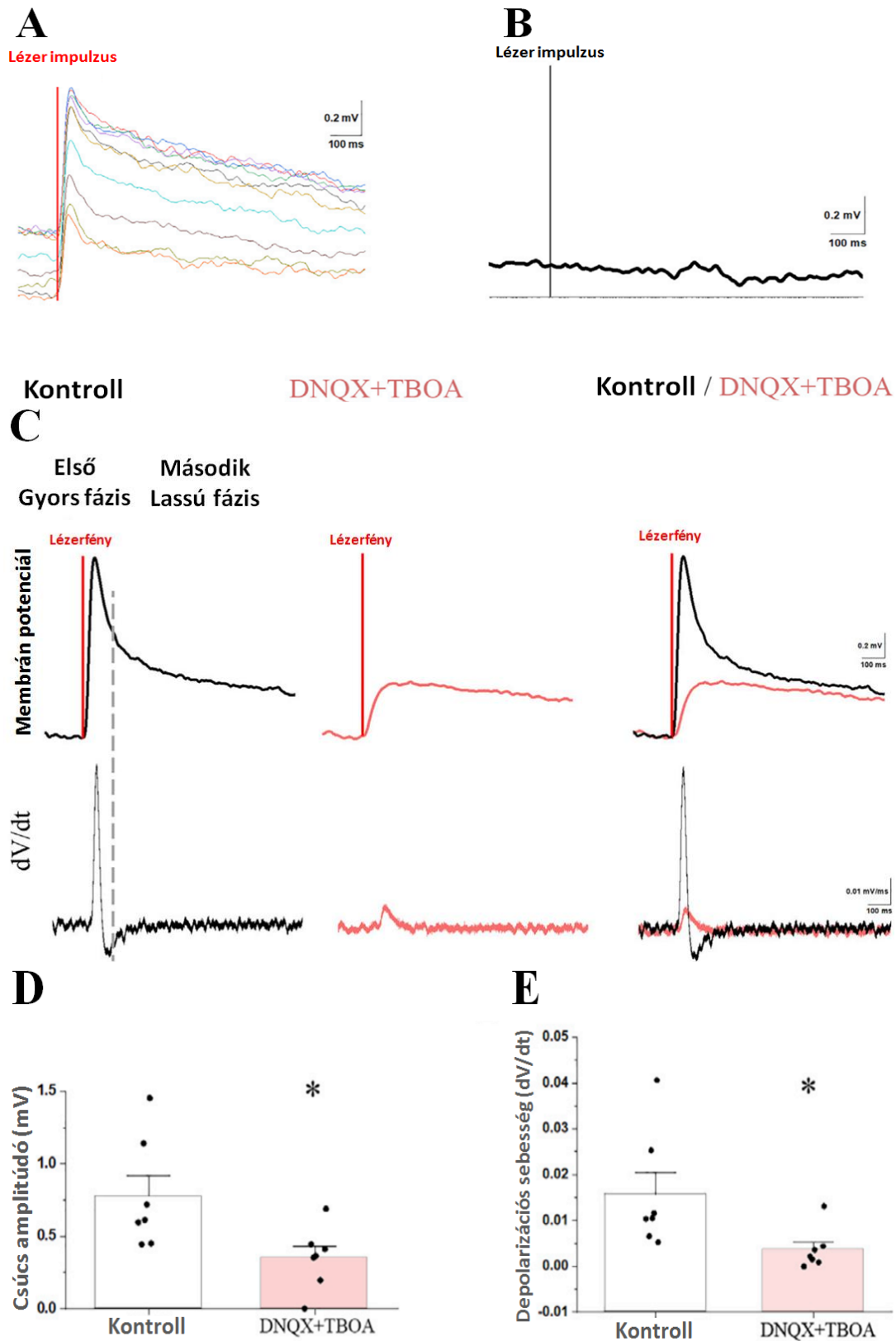
Reprezentatív felvételek illusztrálják, hogy sem 0,5 mM (A), sem 4 mM NMDA (B) nem volt hatással a β_2 -taniciták MP-jára. Hogy kizárjuk a lehetőséget, hogy az NMDA hatás hiányát nyugalmi MP-on az NMDA receptor magnézium blokkja okozza, az NMDA hatását -40 mV-on tartott β_2 -tanicitákon is teszteltük. Azonban az NMDA (C; 0,5 mM) -40 mV MP-n sem volt hatással a β_2 -tanicitákra. E taniciták MP-ját az I. típusú metabotróp glutamát receptor agonista DHPG (D) és a II. típusú metabotróp glutamát receptor agonista APDC (E) sem befolyásolta. Ezzel szemben a GRM4 agonista VU155041 (1 mM) a β_2 -taniciták szignifikáns hiperpolarizációját okozta ($N = 10$). Az adatok átlag \pm SEM formában vannak megadva, a statisztikai összehasonlításhoz ismételt méréses ANOVA elemzést, majd Bonferroni post hoc tesztet alkalmaztunk. ** = szignifikánsan különbözik a kontrolltól $p < 0,01$. Rövidítések: kont = kontroll.

5.1.3. A glutamát AMPA és kainát receptorok és TBOA-érzékeny glutamát transzport közvetítésével depolarizálja a β_2 -tanicitákat

Annak megállapítására, hogy a glutamátnek a β_2 -taniciták MP-jára gyakorolt hatása kizárólag AMPA és kainát receptorokon keresztül valósul-e meg, DNQX jelenlétében vizsgáltuk a glutamát tanicitákra kifejtett hatását. A kainát és az AMPA receptorok együttes gátlása a glutamát β_2 -taniciták MP-jára kifejtett hatását szignifikánsan csökkentette, de nem védte ki teljesen (MP változás: glutamát: $9,18 \pm 1,55$ mV, $N = 9$, $p < 0,001$ vs. kontroll; glutamát + DNQX: $5,23 \pm 1,24$ mV, $p < 0,001$ vs. kontroll és $P = 0,019$ vs. glutamát; 9.C Ábra). Ezért megvizsgáltuk, hogy a receptorokon kifejtett hatás mellett az excitatory amino acid transporter (EAAT)-típusú glutamát transzport is hozzájárul-e a glutamát transzport által kiváltott depolarizációhoz. A DNQX-hez hasonlóan a glutamát transzporter inhibitor TBOA a glutamát által kiváltott depolarizáció részleges gátlását okozta (MP változás: glutamát + TBOA: $4,68 \pm 0,91$ mV, $N = 9$, $P = 0,001$ vs. kontroll és $P = 0,002$ vs. glutamát; 9.D Ábra). A DNQX és a TBOA kombinációja azonban teljesen blokkolta a glutamát hatását (MP változás: $0,40 \pm 0,61$, mV-ban megadva, $N = 9$, $P = 1,00$ vs. kontroll és $p < 0,001$ vs. glutamát; 9.E Ábra). Ezen adatok arra utalnak, hogy a taniciták glutamát által kiváltott depolarizációját az AMPA és kainát receptorok aktivációja és a glutamát transzport együttesen hozza létre.

5.1.4. A TRH axonok aktivációjának tanicitákra kifejtett hatását részben glutamát közvetíti

A TRH idegsejtek axonterminálisának optogenetikai aktiválása az EM külső zónájában történt, ahol a hipofiziotróf TRH idegsejtek axonjai és a β_2 -taniciták bazális nyúlványai egymással közvetlen kapcsolatban vannak. A TRH axonok optogenetikai aktivációja a vizsgált taniciták sejttestén mérve $0,75 \pm 0,14$ mV depolarizációt váltott ki ($p < 0,001$) (11. Ábra). A depolarizáció csúcsa az optogenetikai aktiválás megkezdése után $51,74 \pm 2,93$ ms-nál volt; ennek a depolarizációnak a sebessége $0,016 \pm 0,005$ mV/ms volt. A MP első deriváltjának (dV / dt) vizsgálata két csúcsot mutatott, ami arra utal, hogy a repolarizációnak két fázisa van (11.C. Ábra). Első, ahol a gyors depolarizációt gyors $-0,29 \pm 0,09$ mV repolarizáció követte $126,66 \pm 10,73$ ms-os “decay” idővel, majd ezt egy nagyon lassú repolarizáció követte (“decay” idő: $3127,60 \pm 446,29$ ms). Ez arra utalt, hogy a TRH axonok legalább két különböző vegyület felszabadulásával befolyásolhatják a tanicitákat. Egy gyors, de rövid hatású és egy lassú, tartós hatást eredményező komponens közvetítheti a TRH axonok aktivációjának hatását. A DNQX és a TBOA egyidejű adása jelentősen csökkentette a taniciták optogenetikus aktiváció által kiváltott depolarizációját ($0,32 \pm 0,08$ mV; $p < 0,01$; 11.C Ábra). Ennek a depolarizációnak a sebessége szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a csak glutamát által kiváltott depolarizáció sebessége ($0,004 \pm 0,002$ ms; $p < 0,05$; 11.E. Ábra). A MP első deriváltjának (dV / dt) csak egy csúcsa volt (11.C. Ábra) az antagonisták jelenlétében, ami azt jelzi, hogy ennek a hatásnak csak egy fázisa van. A két antagonisták leblokkolta az első gyors fázist. Ezek az adatok azt mutatják, hogy a TRH axonok egyrészt gyors hatású transzmitterrel, a glutamáttal, valamint egy jelenleg ismeretlen, hosszabb ideig tartó hatású transzmitterrel befolyásolják a tanicitákat.



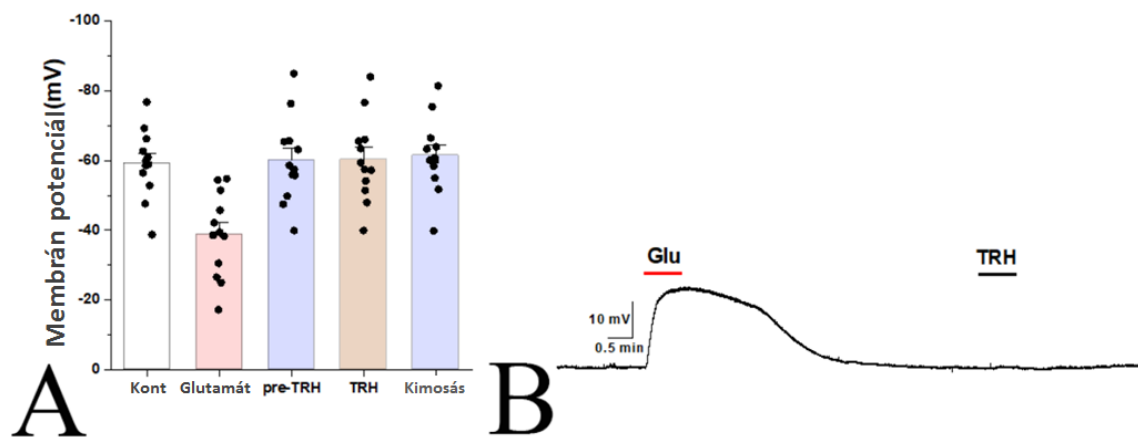
11. Ábra. Az EM-ben elhelyezkedő TRH axonok optogenetikai aktiválásának hatása a β_2 -taniciták MP-jára.

Egy reprezentatív tanicita MP változása a TRH axonok 10 egymást követő optikai aktiválásának hatására (A). Reprezentatív felvétel illusztrálja, hogy a taniciták MP-ját nem befolyásolja a fényimpulzus, ha a TRH axonok nem expresszálnak channelrhodopsint (B). Egy tanicita átlagos MP válasza (C) 10 egymást követő TRH axonok optikai stimulációjára. A felső példák a tanicita MP változását mutatják kontroll körülmények között (fekete vonal), illetve DNQX (0,5 mM) és TBOA (1 mM) (piros) kezelés alatt. A harmadik grafikonon a taniciták kontroll körülmények között és glutamát hatás gátlása mellett mért válasza együttesen látható. Az alsó grafikonok szemléltetik a MP változások első deriváltját (dV/dt). A kontroll példa dV/dt két csúcsa arra utal, hogy az optikai stimuláció által kiváltott MP változásnak két fázisa van: egy kezdeti gyors fázis, amely magában foglalja a gyors depolarizációt és a gyors repolarizációt, amit egy hosszan tartó lassú repolarizációs fázis követ. DNQX és TBOA alkalmazásakor a MP változásnak csak egyetlen fázisa van. A két példa átfedése azt jelzi, hogy a depolarizáció sebessége jelentősen csökken DNQX és TBOA jelenlétében. Az oszlopdiagramok összefoglalják a TRH axonok aktiválásának a MP csúcsamplitúdójára (D) és a depolarizációs sebességére (E) gyakorolt hatásait, kontroll körülmények között, és DNQX+TBOA kezelések mellett. Az adatokat átlag \pm SEM alakban ábrázoltuk, és páros Student *t* teszttel elemeztük. * szignifikánsan különbözik ($p < 0,05$).

TRH-IRES-tdTomato egerekből készült szeletekben, ahol a TRH axonok tdTomatot expresszáltak (de nem expresszálták a channelrhodopsint), az optogenetikai stimulálás nem befolyásolta a taniciták MP-ját (11.B Ábra).

Feltételeztük, hogy a TRH axonok aktivitásának tanicitákra gyakorolt hatásának közvetítésében részt vesz a TRH axonok fő peptiderg transmittere a TRH, ezért vizsgáltuk a TRH taniciták MP-jére kifejtett hatását. TRH kezelés (1 μ M) azonban nem befolyásolta a β_2 -taniciták MP-ját, míg a vizsgált taniciták MP-ja glutamát (500 μ M) hatására jelentősen depolarizálódott (MP változás: glutamát: $20,40 \pm 1,64$ mV, N = 12, $p < 0,001$ vs. kontroll;

TRH: $-0,24 \pm 0,25$ mV vs. pre-TRH („kontroll”) és $P = 0,37$; 12. Ábra).



12. Ábra. A TRH hatása a β_2 -taniciták MP-jára ($N=12$). Diagramm (A) illusztrálja a glutamát ($500\mu\text{M}$) és TRH ($1\mu\text{M}$) kezelés β_2 -tanicitákra kifejtett hatását. Míg a glutamát ($500\mu\text{M}$) a β_2 -taniciták jelentős depolarizációját okozta, addig a TRH kezelésnek nem volt hatása. Egy reprezentatív β_2 -tanicita elvezetés (B) szemlélteti a glutamát és a TRH hatását. Rövidítések: kont = kontroll.

A tanicitáknak a TRH axonok optogenetikai ingerlésére adott válaszában glutamát független fázist kiváltó mechanizmusok feltárásához vizsgáltuk, hogy e fázist G-protein kapcsolt receptor aktivációja közvetíti-e. Ennek érdekében intracellulárisan adagolt G-protein blokkoló GDP- β -S-t (2mM) alkalmaztunk. A G-protein blokkolás, a glutamát hatás blokkolása mellett nem védte ki a TRH axonok aktiválásának a β_2 -taniciták MP-jára kifejtett hatását (MP változás DNQX + TBOA vs. DNQX + TBOA + GDP- β -S különbségből: $0,26 \pm 0,05$ mV vs. $0,23 \pm 0,05$ mV, $N = 8$; $P = 0,09$).

6. Az eredmények értékelése

A PVN TRH-termelő idegsejtjeit sűrűn beidegzik TRH-tartamú axonterminálisok [40]. Ultrastrukturális szinten a TRH axonok és a TRH neuronok közötti szinaptikus kapcsolatokat szimmetrikus, Gray II típusú, szinapszisként írták le [40]. Mivel a szimmetrikus típusú szinapszisokat gátló szinapszisoknak tekintik [95, 96], feltételezték, hogy a TRH gátló hatást fejthet ki a PVN TRH neuronjaira, és a TRH-TRH kapcsolatok a PVN-ben egy a hipofiziotróf TRH sejtek közti *ultrashort feedback* mechanizmus részét képezhetik [40]. A szerzők ugyanakkor azt is leírták, hogy a TRH-TRH szinapszisok egy része posztszinaptikus megvastagodást mutatott [40]. Ez arra utal, hogy serkentő, aszimmetrikus típusú szinapszisok is lehetnek a TRH axonok és a TRH idegsejték között. Munkacsoportunk kimutatta, hogy a PVN TRH neuronjai glutamáterg neuronok [34]. Így ha a TRH idegsejték TRH-tartalmú beidegzésében a PVN-en belüli TRH sejtek is részt vesznek, akkor serkentő TRH-TRH kapcsolatoknak is léteznie kell. A TRH peptid TRH idegsejtekre gyakorolt hatásának megértése érdekében elektrofiziológiai vizsgálatokat végeztünk. Eredményeik alapján a TRH neuronok körülbelül felében a TRH kezelés serkenti a vizsgált idegsejtet és ezt a hatást a TRH közvetlenül a vizsgált idegsejtre hajtva fejt ki. Ezekben a TRH sejtekben a TRH depolarizálta a membránpotenciált, és növelte a spontán akciós potenciálok tüzelési frekvenciáját. Korábban a TRH hasonló serkentő hatását figyelték meg a lókuszcöruleusz neuronok esetében, ahol a TRH hatását a PLC közvetítette a foszfatidil inozitol 4,5-biszfoszfát hidrolízisén keresztül, ami egy savérzékeny K^+ csatorna gátlásával depolarizálta az idegsejteket [97]. Érdekes módon a TRH stimuláló hatását a PVN TRH neuronok csak felében észleltük annak ellenére, hogy gyakorlatilag az összes TRH idegsejt sűrű TRH-tartalmú beidegzést kap [40]. Ez utalhatna arra, hogy a TRH által stimulált és nem befolyásolt TRH idegsejtékben eltérő TRH receptor termelődik. Azonban a két TRH receptor közül csak a TRH-R1 expresszálódik a PVN-ben [27]. A TRH-R1 leggyakrabban a $G_{q/11}$ fehérjéhez kapcsolódik, és aktiválja a PLC jelátviteli útvonalat [98, 99]. Emellett azonban egyes sejtekben leírták a TRH-R1 kapcsolatát G_{i2} , G_{i3} és G_s -szerű fehérjékkel is [98, 99]. Ez felveti annak a lehetőségét, hogy a TRH-R1 eltérő G fehérjékhez kapcsolott a TRH által serkentett és nem serkentett TRH idegsejtékben. Az a tény, hogy a TRH a TRH idegsejték közel felében nem hat a membránpotenciálra és a tüzelésre, még nem jelenti azt, hogy a TRH nem hat ezekre az idegsejtekre. A TRH modulálhatja a TRH neuronok más transzmitterekre adott válaszát is, akár még a „nem reagáló” TRH neuronokban is. Például TRH nem befolyásolja a CA1 piramis sejtek membránpotenciálját, de kivédi a szerotoninnak a piramis sejtekre

gyakorolt hatását [100], hasonlóképp a TRH gátolja az arcuatus idegmagban a proopiomelanocortin neuronok urokortin 3 által kiváltott depolarizációját is [72].

A PVN-ben két funkcionálisan eltérő TRH neuronpopuláció helyezkedik el, a hipofiziotróf és a nem hipofiziotróf TRH neuronok [1]. Feltételeztük, hogy a PVN TRH neuronok e két populációja megfelelhet a TRH neuronok TRH által serkentett és nem befolyásolt csoportjainak. Ezért vizsgáltuk a TRH hipofiziotróf és nem hipofiziotróf TRH idegsejtekre kifejtett hatását. Hipotézisünkkel ellentétben a PVN TRH neuronok funkcionálisan különböző populációi hasonlóan reagáltak a TRH kezelésre. A TRH mindkét populációban a TRH neuronok körülbelül felében növelte a tüzelési frekvenciát. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a TRH kezelésre adott válasz alapján sem a hipofiziotróf, sem a nem hipofiziotróf TRH sejtcsoportok nem homogének, így a hipofiziotróf és nem hipofiziotróf TRH idegsejteknek is legalább két alpopulációja lehet a PVN-ben. Ez összhangban áll a hipofiziotróf TRH neuronok funkcionális heterogenitására utaló korábbi adatokkal, amik arra utalnak, hogy eltérő hipofiziotróf TRH idegsejtek reagálnak hidegre és szoptatásra [101]. A TRH PVN-be történő beadása növeli a perifériás pajzsmirigyhormon szintet [61], ez alapján arra következtetünk, hogy a TRH által serkentett hipofiziotróf TRH neuronok aktiválása elegendő a HHP tengely aktiválásához. Ez a TRH-TRH kölcsönhatás pozitív visszacsatolási mechanizmusként szolgálhat, amely segít szinkronizálni a hipofiziotróf TRH neuronok aktivitását. Hasonlóan más hipofiziotróf hormonokhoz a TRH szekréciója a hipofizeális portális keringésbe szintén pulzatilis [102]. Patkányokban a TRH ürülés körülbelül napi 6 pulzusa figyelhető meg, amikor a TRH felszabadulás csaknem 100-szoros növekedést mutat [102]. Ezért elképzelhető, hogy a TRH neuronok kisebb populációjából származó TRH felszabadulás aktiválja a többi TRH idegsejtet is, és ez a pozitív visszacsatolási szabályozás a TRH pulzusok alatt a TRH felszabadulás nagymértékű növekedéséhez vezet. Ez a hipotézis azonban további vizsgálatot igényel. Hasonló pozitív visszacsatolási mechanizmus fontosnak bizonyult az oxitocin felszabadulás szabályozásában [103]. Elképzelhető azonban, hogy a PVN-ben elhelyezkedő TRH neuronok TRH immunreaktív beidegzésének egy része a PVN-en kívül elhelyezkedő, nem hipofiziotróf TRH neuronokból származik. Így a nem hipofiziotróf TRH neuronok populációi részt vehetnek a HHP tengely szabályozásában a hipofiziotróf TRH neuronok szabályozásán keresztül. A TRH neuronokat beidegző TRH-tartalmú axonok eredetének tisztázása a HHP tengely új szabályozó mechanizmusainak felfedezéséhez vezethet. A TRH neuronok tüzelése mellett a TRH kezelés befolyásolja az ezen sejteket beidegző axonokat is. A TRH kezelés nem volt hatással a TRH neuronokat

beidegző gátló axonokra. Azonban a TRH idegsejtek felében a TRH kezelés fokozta, míg a TRH neuronok egyharmadában gátolta a serkentő beidegzés aktivitását. A fennmaradó TRH neuronok esetében a TRH nem befolyásolta a sejteket beidegző axonokat. A TRH által kiváltott mEPSC frekvencia változás az mEPSC amplitúdójának változása nélkül arra utal, hogy a TRH preszinaptikusan befolyásolja a TRH neuronok glutamáterg beidegzését. Azonban a TRH ezen hatását teljes mértékben kivédte a vizsgált TRH sejtekbe intracellulárisan adagolt G protein jelátvitel gátló GDP- β -S. Ezért feltételeztük, hogy a TRH a TRH neuronokra hat, és a vizsgált idegsejtekből származó retrográd jelátvivő molekulák felszabadításával modulálja a preszinaptikus terminálisok aktivitását. A BDNF-TrkB transzmitter rendszerről ismert, hogy retrográd transzmitter rendszerként képes serkenteni glutamáterg axonok aktivitását [104]. Kimutatták, hogy BDNF termelődik a PVN-ben elhelyezkedő TRH neuronok egy részében [76] és ismert, hogy a depolarizáció és az intracelluláris Ca^{2+} szint növekedése serkenti a BDNF felszabadulását [105]. Mivel a TRH depolarizálja a TRH neuronok egy részét, és a TRH-R1 köztudottan a PLC aktiválásán keresztül növeli az intracelluláris Ca^{2+} szintet [98], feltételeztük, hogy a TRH által kiváltott mEPSC frekvencia növekedést a BDNF-TrkB retrográd jelátviteli útvonal közvetítheti. E feltételezésünket igazolta, hogy TrkB receptor gátló adagolása teljes mértékben kivédte a TRH kezelés mEPSC frekvenciát növelő hatását. A TRH serkentő hatásával ellentétben a TRH-nak a TRH neuronok mEPSC-jére gyakorolt gátló hatását a TrkB gátlás nem befolyásolta. Eredményeink igazolták, hogy a TRH ezen gátló hatását az endokannabinoid rendszer közvetíti, mivel a CB1 antagonistá AM251 adagolása jelentős mértékben csökkentette a TRH-nak az mEPSC frekvenciát csökkentő hatását. Egyelőre nem tisztázott, hogy a TRH miért serkenti a TRH idegsejtek egy részének a serkentő beidegzését, és gátolja azt egy másik TRH populációban. Ez különösen érdekes a hipofiziotróf TRH sejtek esetében, mivel az összes hipofiziotróf TRH neuron TRH-t választ ki a portális keringésbe, és ezáltal serkenti az agyalapi mirigy TSH-szekréciónak (Fekete és Lechan, 2014). Lehetséges azonban, hogy a hipofiziotróf TRH idegsejtek különböző populációi kollaterálisokat küldenek az agy más területeire, és a HHP tengely aktivitásától akár eltérő fiziológiai folyamatokat szabályoznak. Ezért hipofiziotróf TRH csoportok eltérő szabályozása hasonló TRH felszabadulást indukálhat a portális keringésbe, de eltérő hatást gyakorolhat más fiziológiai funkciókra.

Összegzésként elmondható, hogy adataink azt mutatják, hogy a TRH-nak közvetlen serkentő hatása van a TRH neuronok felében, ami arra utal, hogy egy TRH által közvetített ultrarövid

pozitív visszacsatolás szinkronizálhatja a hipofiziotróf TRH neuronok aktivitását. Ezenkívül a TRH facilitálja a TRH neuronok körülbelül felének a serkentő bemenetét a BDNF-TrkB jelátviteli útvonalon keresztül, míg az endokannabinoid rendszeren keresztül gátolja a TRH neuronok egyharmadának serkentő bemenetét, ami a PVN TRH neuronok szubpopulációjának rendkívül változatos szabályozását jelzi.

A TRH idegsejtek működését az endokannabinoid rendszer nem csak a sejtek serkentő bemeneteinek szabályozásán keresztül befolyásolja. Kimutattuk, hogy az EM β_2 -tanicitái endokannabinoidokat termelnek és endokannabinoidok közvetítésével szabályozzák a hipofiziotróf TRH idegsejtek TRH felszabadítását az EM külső zónájában.

Munkacsoportunk kimutatta, hogy a PVN-ben lévő TRH neuronok többsége termel CB1 mRNS-t, valamint a CB1 protein jelen van a hipofiziotróf TRH neuronok axon varikozitásain az EM külső zónájában a portális kapillárisok közelében [36]. Ezen agyterületen a CB1 receptoron ható ligandot, a 2-AG-t a taniciták termelik [36]. E sejtekben expresszálódik a 2-AG-t termelő enzim a DAGL α és az EM külső zónájában a DAGL α -tartalmú taniciták és a CB1-tartalmú TRH axonok egymás közvetlen közelében figyelhetők meg, ami felvetette a lehetőségét, hogy a taniciták az endokannabinoid rendszer közvetítésével szabályozzák a TRH terminálisokat [36]. E feltételezésnek megfelelően a CB1 antagonistá (AM251) jelentősen fokozta a TRH ürülését EM explantumokból, ami azt jelzi, hogy az endokannabinoidok tónusosan gátolják a TRH felszabadulást [36].

Mivel neuron-neuron kapcsolatokban a preszinaptikus axonokból ürülő glutamát serkenti a posztszinaptikus neuronok endokannabinoid termelését [106] és a hipofiziotróf TRH idegsejtek glutamáterg neuronok [34], vizsgáltuk, hogy a glutamát hogyan hat a tanicitákra.

Munkacsoportunk kimutatta, hogy a taniciták termelnek AMPA és kainát receptor alegységeket és GRM4 receptort [36]. Emellett a taniciták termelnek glutamát transzportereket is [36]. Ezzel összhangban a patch clamp elektrofiziológiai kísérleteink kimutatták, hogy a glutamát dózisfüggően depolarizálja a β_2 -tanicitákat. Hasonlóképpen, a kainát és az AMPA is a taniciták depolarizációját váltotta ki, ami arra utal, hogy az AMPA és / vagy kainát receptorok szerepet játszanak a taniciták glutamáterg szabályozásának közvetítésében. E receptorok gátlása azonban csak részlegesen gátolta a taniciták glutamát hatására kialakuló depolarizációját. Az NMDA receptor alegységek hiányának megfelelően az

NMDA egyáltalán nem befolyásolta a tanicitákat. A GRM4 agonista adása a β_2 -taniciták kismértékű hiperpolarizációját okozta. Azonban a hiperpolarizáció ténye kizárja, hogy a GRM4 receptor részt vehessen a taniciták glutamát által kiváltott depolarizációjában. Mivel a receptor közvetített hatás mellett a glutamát transzportereken keresztül történő felvétele is okozhat depolarizációt [107], és munkacsoportunk vizsgálatai Solute Carrier Family 1 Member 3 (SLC1A3) glutamát transzporter magas szintű expresszióját mutatták ki a β_2 -tanicitákban [36], vizsgáltuk a glutamát transzport szerepét a taniciták szabályozásában. A glutamát transzporterek gátlása is a glutamát hatásának részleges gátlását eredményezte, azonban az AMPA és kainát receptorok és a glutamát transzporterek egyidejű gátlása teljesen blokkolta a β_2 -taniciták glutamát kezelés hatására kialakuló depolarizációját. Így a két ionotróp glutamát receptor típus, valamint a glutamát transzport együttesen közvetítik a glutamát tanicitákra kifejtett hatását.

Optogenetika alkalmazásával vizsgáltuk, hogy a hipofiziotróf TRH idegsejtek axonjaiból felszabaduló glutamát a feltételezésünknek megfelelően befolyásolja-e a taniciták működését. E kísérletekhez munkacsoportunk létrehozott egy új transzgenikus egérvonalat (TRH-IRES-Cre) melyben a Cre rekombináz specifikusan a TRH-termelő sejtekben expresszálódik és így lehetővé teszi fehérjék TRH sejt specifikus termelését. Ezen transzgenikus egérvonal PVN-jében elhelyezkedő TRH idegsejtekben termeltettünk CHR2-t AAV segítségével. Az így az EM TRH axonjaiban CHR2-t termelő egereket használtuk elektrofiziológiai vizsgálatainkhoz. Ezen egerek EM-et tartalmazó szeleteiben a β_2 -taniciták patch clamp vizsgálata közben optogenetika alkalmazásával serkentettük a CHR2-tartalmú TRH axonokat. A TRH axonok optogenetikai ingerlése a taniciták sejttesteiben is mérhető depolarizációt váltott ki. Az optogenetikai ingerlés ezen hatása elmaradt, ha olyan állatokból készült szeleteken végeztük a mérést, melyekben a TRH sejtek nem termeltek CHR2-t, igazolva, hogy a taniciták depolarizációja valóban a TRH axonok aktivitás fokozódásának eredményeként jött létre. A taniciták észlelt depolarizációja két kinetikailag eltérő fázisra bontható. A depolarizációt egy viszonylag gyors repolarizáció követte, majd ezt követően egy nagyon lassú, hosszan elnyújtott repolarizációt figyeltünk meg. Ennek megfelelően az optogenetikai ingerlés hatására a taniciták membránpotenciáljának első deriváltján két csúcsot észleltünk, ami alátámasztja, hogy ez a depolarizáció két eltérő fázisból áll. DNQX és TBOA kombinációja teljes mértékben kivédte az optogenetikai ingerlés hatására a tanicitákban kialakuló első, gyorsabb fázist. Ez az eredmény igazolta, hogy TRH axonok glutamát ürítése hat a tanicitákra és ez okozza a taniciták depolarizációjának gyors komponensét. Ellenben a taniciták

depolarizációjának lassabb és hosszabb lefutású komponensét nem befolyásolták a glutamát hatását gátló farmakonok, ami arra utal, hogy a TRH axonok más transzmittereket is használnak a taniciták befolyásolására.

Mivel a peptideknek hosszabb ideig tartó hatása lehet, mint a klasszikus transzmittereknek és Muller-Fielitz és mtsai [81] kimutatták, hogy a TRH növeli a β_2 -taniciták intracelluláris Ca^{2+} szintjét TRH-R1-en hatva, feltételeztük, hogy ez a hosszan tartó hatás a hipofiziotróf axonok TRH felszabadulásának eredménye. Mivel nem létezik specifikus TRH antagonist, a TRH-nak a taniciták MP-jára kifejtett hatását vizsgáltuk. Azonban még viszonylag magas dózisu TRH (1 μM) kezelés sem volt hatással a taniciták MP-jára. Muller-Fielitz és mtsai [81] által leírtakkal ellentétben a TRH nem volt hatással a taniciták intracelluláris Ca^{2+} szintjére sem [36]. Ezért megvizsgáltuk, hogy a β_2 -taniciták termelnek-e TRH receptort. Laser capture microdissection segítségével β_2 -taniciták transzkriptómjából azonban nem tudtunk kimutatni se TRH-R1-et se TRH-R2-t [36], ami megmagyarázta, hogy vizsgálatainkban a TRH miért nem befolyásolta a tanicitákat. A TRH tanicitákra kifejtett hatásáról Muller-Fielitz és mtsai [81] és általunk [36] leírt adatok markáns eltérésének okát nem ismerjük. Azonban fontos megjegyezni, hogy Muller-Fielitz és mtsai [81] rendkívül magas, farmakológiai dózisu TRH (33 μM) kezelést alkalmaztak vizsgálataik során. Adataink azonban kizárják, hogy a TRH axonokból felszabaduló TRH szerepet játszhat a tanicitáknak a TRH axonok optogenetikai aktiválását követő depolarizációjának kialakulásában. Ezt támasztja alá az a megfigyelésünk is, hogy a vizsgált tanicitába intracellulárisan adagolt G protein blokkoló nem befolyásolta a TRH axonok optogenetikai aktivációjának tanicitákra gyakorolt hatását, ami arra utal, hogy a taniciták depolarizációjának második fázisát nem G protein kapcsolt receptor(ok) közvetítik. A hatás mechanizmusának pontos meghatározásához további vizsgálatokra van szükség.

A TRH axonok aktiválása a taniciták kisebb mértékű depolarizációját eredményezte, mint az exogén glutamát adagolása. Figyelembe kell azonban vennünk, hogy az exogén glutamát a taniciták teljes felületén, beleértve az elektrofiziológiai vizsgálatok során mért sejteken is képes hatni, míg a TRH axonokból csak a tanicita végtalpak körül szabadulnak fel transzmitterek. E végtalpak elég jelentős, körülbelül 80–100 μm , távolságra vannak a taniciták szómájától, ahol a MP-t mértük. Így feltételezhető, hogy e transzmitterek a hatásuk helyén a membránpotenciál jelentős változását eredményezik.

Azt, hogy a depolarizáció pontosan hogyan szabályozza e gliasejtek működését és az endokannabinoidok szintézisét, egyelőre nem tudni. Azonban az intracelluláris Ca^{2+} szint

növekedése a DAGL α aktivitásának egyik legfontosabb szabályozója [86]. Vizsgálataink igazolták, hogy a glutamát nem csak depolarizálja a β_2 -tanicitákat, hanem e sejtekben az intracelluláris Ca²⁺ szintet is megemeli [36]. A glutamát ezen hatását is kivédte az AMPA és kainát receptorok és a glutamát transzport együttes gátlása, jelezve, hogy a glutamát hasonló mechanizmusok révén befolyásolja a taniciták MP-ját és intracelluláris Ca²⁺ szintjét. A glutamát hatása a taniciták intracelluláris Ca²⁺ szint változására arra utal, hogy a glutamát stimulálhatja a taniciták endokannabinoid szintézisét. Ezt alátámasztották az EM explant kísérleteink is, melyekben az AMPA és kainát receptorok és a glutamát transzport együttes gátlása jelentősen csökkentette az EM explantumok 2-AG tartalmát. Ebből arra következtettünk, hogy az endogén glutamát tónusosan serkenti az EM-ban elhelyezkedő taniciták 2-AG szintézisét [36].

A leírt, TRH felszabadulást szabályozó, glutamát és endokannabinoidok felhasználásával működő új neurogliális szabályozókör fontos szerepet játszhat a hipofiziotróf axonterminálisok aktivitásának szinkronizálásában és így a pulzatis TRH felszabadulás szabályozásában. CB1 azonban az EM külső zónájában nem csak TRH-tartalmú terminálisokban van jelen, ami arra utal, hogy a taniciták az általuk termelt endokannabinoidokkal több neuroendokrin rendszer irányításában is szerepet játszhatnak [36]. Összefoglalva, adataink arra utalnak, hogy a β_2 -taniciták és a hipofiziotróf TRH axonok között egy endokannabinoidokat és glutamátot felhasználó szabályozókör létezik. Ez a szabályozókör hozzájárulhat a TRH EM-be történő felszabadulásának szabályozásához, valamint ez egy fontos mechanizmus lehet ami szerepet játszik a hipofiziotróf axonterminálisok aktivitásának szinkronizálásában.

7. Összefoglalás

A PVN hipofiziotróf TRH neuronjainak működése alapvető fontosságú a HHP tengely és ezen keresztül az anyagcsere szabályozásában, ezért e sejtek működésének és szabályzásának megértése kiemelt jelentőséggel bír. A hipofiziotróf TRH idegsejtek szabályozásában az idegi inputok mellett kiemelt jelentőségű a TRH idegsejtek és egy speciális gliasejt csoport, a taniciták, interakciója.

Munkánk fő célkitűzése, a TRH peptidnek a TRH idegsejtek működésére kifejtett hatásának és a hipofiziotróf TRH axonok és a taniciták interakciójának megértése volt.

A PVN TRH idegsejtjeinek dús TRH tartalmú beidegzése arra utalt, hogy e peptid fontos szerepet játszhat a TRH sejtek szabályozásában. A TRH-nak a PVN TRH sejtjeire kifejtett hatásának vizsgálatához patch clamp elektrofiziológiai vizsgálatokat végeztünk. Kimutattuk, hogy a TRH kezelés a PVN TRH neuronjainak felében szignifikánsan fokozta a sejtek tüzelési frekvenciáját és depolarizálta e neuronokat. A TRH MP-ra kifejtett hatását nem védte ki az akciós potenciálok kialakítását gátló TTX, ami arra utal, hogy a TRH közvetlenül hat a vizsgált TRH sejtekre. Feltételeztük, hogy a TRH kezelés által serkentett és a nem reagáló TRH idegsejt populációk megfelelhetnek a PVN két eltérő funkciójú TRH sejtcsoportjának, a hipofiziotróf és a nem hipofiziotróf TRH sejteknek.

A hipofiziotróf TRH sejteket Fluoro-Gold retrográd jelölőanyag perifériás adagolásával megjelölve megállapítottuk, hogy a TRH kezelés a hipofiziotróf és a nem hipofiziotróf TRH sejtpopuláció neuronjainak is megközelítőleg felét serkentette. Ez arra utal, hogy a PVN TRH sejtjeinek hipofiziotróf és nem-hipofiziotróf alpopulációja sem egységes, TRH hatására eltérő módon reagáló alpopulációik vannak.

A TRH kezelés befolyásolta a PVN TRH sejtjeit beidegző axonok aktivitását is. Habár a TRH kezelés nem befolyásolta a TRH idegsejtek gátló beidegzésének aktivitására utaló mIPSC paramétereket, a TRH idegsejtek felében a TRH kezelés fokozta az mEPSC-k frekvenciáját és csökkentette ezen áramok félszélességét. Ezzel ellentétben, a TRH idegsejtek körülbelül harmadában a TRH kezelés csökkentette az mEPSC frekvenciát, míg a fennmaradó sejtekben nem befolyásolta a serkentő inputokat. Mivel a vizsgált sejtekbe intracellulárisan adagolt G-

protein gátló GDP- β -S teljes mértékben kivédte a TRH mEPSC frekvenciára gyakorolt hatását, feltételeztük, hogy a TRH a vizsgált sejtekre hatva retrográd transmitter felszabadulást okoz, ami befolyásolja a TRH idegsejteket beidegző glutamáterg axonok aktivitását.

Kimutattuk, hogy a TrkB gátlása teljes mértékben kivédte a TRH mEPSC frekvenciát fokozó hatását, de nem befolyásolta az mEPSC frekvenciát gátló hatását. Ez az eredmény arra utalt, hogy a PVN TRH sejtjeinek körülbelül fele a TrkB-n ható BDNF termelésén keresztül serkenti ezen neuronokat beidegző glutamáterg axonok aktivitását. Igazoltuk továbbá, hogy a CB1 gátlása jelentősen csökkentette a TRH mEPSC frekvenciát gátló hatását. Ezen adatok együttesen arra utalnak, hogy a PVN TRH sejtjei a BDNF illetve az endokannabinoidok termelésével közvetítik a TRH-nak az ezen sejtek serkentő inputjaira gyakorolt hatását. Mivel a PVN-ben csak egyféle TRH receptor, a TRH-R1, termelődik, további vizsgálatok szükségesek annak eldöntésére, hogy a TRH sejtek milyen tulajdonságai szabják meg e sejtek TRH-ra adott válaszát.

A TRH axonok és a β_2 -taniciták kapcsolatát vizsgáló kutatásaink kimutatták, hogy az egéregy EM-jában található β_2 -taniciták glutamát hatására jelentős mértékben depolarizálódnak. A glutamáthoz hasonlóan az AMPA és kainát is depolarizálta a β_2 -tanicitákat összhangban e taniciták AMPA és kainát receptor termelésével. Azonban e két receptor antagonistája csak részben védte ki a taniciták glutamát kiváltotta depolarizációját. Mivel NMDA és metabotróp glutamát receptor agonisták nem depolarizálták a tanicitákat feltételeztük, hogy a glutamát transzport is hozzájárulhat a taniciták depolarizációjához. Feltételezésünkkel összhangban az AMPA és kainát receptorok és a glutamát transzport egyidejű gátlása teljes mértékben kivédte a glutamát tanicitákra kifejtett hatását. Tehát a glutamátnek a β_2 -taniciták MP-jára gyakorolt hatását az AMPA és kainát receptorok aktivációja és a glutamát transzport együttesen közvetíti.

A TRH axonok optogenetikai ingerlésének segítségével vizsgáltuk, hogy a TRH axonokból ürülő glutamát hat-e a tanicitákra. A TRH axonok aktivációjának hatására a β_2 -taniciták elnyújtott, kétfázisú depolarizációja volt megfigyelhető. E depolarizáció első fázisát kivédte az AMPA és kainát receptor antagonistá DNQX és a glutamát transzport gátló TBOA együttes alkalmazása igazolva, hogy a TRH axonokból felszabaduló glutamát depolarizálja a tanicitákat. Ezen antagonisták nem befolyásolták a depolarizáció második, elnyújtott fázisát. A TRH axonok aktivációjának hatására kialakuló tanicita depolarizáció második fázisát

kiváltó transzmitter(ek) feltárása további vizsgálatokat igényel, azonban kísérleteink kizárják, hogy a hipofiziotróf axonokból felszabaduló TRH és G protein kapcsolt receptorok szerepet játszanak ezen depolarizáció kialakulásában.

8. Summary

The function of the hypophysiotropic TRH neurons of the PVN is essential in the regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis and through this effect, these neurons are also crucial in the regulation of energy homeostasis, therefore, understanding the function and regulation of hypophysiotropic TRH neurons is highly important. In addition to the role of neural inputs, the interaction of the hypophysiotropic TRH neurons with a special type of glial cells, the tanycytes, are also crucial in the regulation of the HPT axis.

The main objective of our work was to understand the effect of TRH peptide on the function of the TRH neurons in the PVN and explore the interaction between the hypophysiotropic TRH axons and tanycytes. The abundant TRH containing innervation of the TRH neurons in the PVN suggested that this peptide may play an important role in the regulation of TRH neurons. To investigate the effect of TRH on the PVN TRH neurons, patch clamp electrophysiology studies were performed. We have shown that TRH treatment significantly increased the firing frequency of approximately half of the TRH neurons in the PVN and also depolarized these neurons. The effect of TRH on the MP of TRH neurons was not inhibited by TTX, an inhibitor that blocks the action potentials, suggesting that the effect of TRH is exerted directly on the examined TRH neurons. We hypothesized that the groups of TRH neurons that are stimulated by TRH treatment or non-responsive to TRH may correspond to the functionally distinct hypophysiotropic and non-hypophysiotropic TRH neurons of the PVN.

The hypophysiotropic TRH neurons were labeled by peripheral administration of the retrograde tracer Fluoro-Gold. We found that TRH treatment stimulated approximately half of the neurons in both the hypophysiotropic and non-hypophysiotropic TRH cell populations. This suggests that both the hypophysiotropic and non-hypophysiotropic groups of PVN TRH neurons have subpopulations that respond differently to TRH administration.

TRH treatment also affected the activity of axons innervating the TRH neurons in the PVN. Although TRH treatment did not influence the parameters of the mIPSCs of TRH neurons a marker of the activity of the inhibitory inputs of these cells, in half of the TRH neurons, TRH treatment increased the frequency of mEPSCs and reduced the half-width of these currents. In

contrast, in about one-third of TRH neurons, TRH treatment reduced the mEPSC frequency, while in the remaining cells, it did not influence the excitatory inputs. As the intracellularly administered G-protein inhibitor GDP- β -S completely prevented the effect of TRH on the mEPSC frequency of studied cells, we hypothesized that direct effect of TRH on the studied cells causes retrograde transmitter release, that influences the activity of the glutamatergic inputs of TRH neurons.

We showed that inhibition of TrkB completely prevented the facilitatory effect of TRH on the mEPSC frequency, but did not affect the inhibitory effect of TRH on the mEPSC frequency. This result suggested that approximately half of the TRH cells in the PVN stimulate the activity of their glutamatergic inputs through the production of BDNF in response to TRH treatment. We further demonstrated that inhibition of CB1 significantly reduced the frequency of the inhibitory effect of TRH on the mEPSCs. Taken together, these data suggest that PVN TRH cells mediate the effect of TRH on their excitatory inputs by producing BDNF and endocannabinoids, respectively. Since only one type of TRH receptor, TRH-R1, is produced in PVN, further studies are needed to investigate which properties of TRH cells determine their response to TRH.

Our research focusing on the interaction of the axons of the hypophysiotropic TRH neurons and the β_2 -tancytes has shown that β_2 -tancytes in the EM of mouse brain are markedly depolarized by glutamate. Similarly to glutamate, AMPA and kainate also depolarized the β_2 -tancytes in line with the AMPA and kainate receptor production of these tancytes. However, antagonists of these two receptors only partially inhibited the glutamate induced depolarization of tancytes. Since NMDA and metabotropic glutamate receptor agonists did not depolarize the tancytes, we hypothesized that glutamate transport may also contribute to the glutamate induced depolarization of tancytes. Consistent with our hypothesis, simultaneous inhibition of AMPA and kainate receptors and glutamate transport completely abolished the effect of glutamate on tancytes. Thus, the effect of glutamate on the MP of β_2 -tancytes is mediated by both activation of AMPA and kainate receptors and glutamate transport.

Using optogenetic stimulation of TRH axons, we investigated whether glutamate released from the hypophysiotropic TRH axons can influence the tancytes. Activation of TRH axons induced long-lasting biphasic depolarization of β_2 -tancytes. The first phase of this depolarization was prevented by the simultaneous administration of the AMPA and kainate

receptor antagonist DNQX and the glutamate transport inhibitor TBOA demonstrating that glutamate release from TRH axons depolarizes the tanycytes. These antagonists did not influence the second phase of depolarization. However, the transmitter(s) inducing the second phase of tanycyte depolarization in response to activation of TRH axons are unknown, our experiments exclude the possibility that TRH and G-protein-coupled receptors play role in the development of this depolarization.

9. Irodalomjegyzék

1. Fekete, C. and R.M. Lechan, *Central regulation of hypothalamic-pituitary-thyroid axis under physiological and pathophysiological conditions*. *Endocr Rev*, 2014. **35**(2): p. 159-94.
2. Leung, A.M., *Thyroid Emergencies*. *J Infus Nurs*, 2016. **39**(5): p. 281-6.
3. Joseph-Bravo, P., et al., *60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: TRH, the first hypophysiotropic releasing hormone isolated: control of the pituitary-thyroid axis*. *J Endocrinol*, 2015. **226**(2): p. T85-t100.
4. Fekete, C. and R.M. Lechan, *Negative feedback regulation of hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone (TRH) synthesizing neurons: role of neuronal afferents and type 2 deiodinase*. *Front Neuroendocrinol*, 2007. **28**(2-3): p. 97-114.
5. Dyess, E.M., et al., *Triiodothyronine exerts direct cell-specific regulation of thyrotropin-releasing hormone gene expression in the hypothalamic paraventricular nucleus*. *Endocrinology*, 1988. **123**(5): p. 2291-7.
6. Lechan, R.M. and C. Fekete, *The TRH neuron: a hypothalamic integrator of energy metabolism*. *Prog Brain Res*, 2006. **153**: p. 209-35.
7. Gereben, B., et al., *Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling*. *Endocr Rev*, 2008. **29**(7): p. 898-938.
8. Brown, C.H., et al., *Physiological regulation of magnocellular neurosecretory cell activity: integration of intrinsic, local and afferent mechanisms*. *J Neuroendocrinol*, 2013. **25**(8): p. 678-710.
9. Hoffman, G.E., et al., *Neuropeptide cells and fibers in the hypothalamus and pituitary of the fetal sheep: comparison of oxytocin and arginine vasopressin*. *Neuroendocrinology*, 1989. **50**(6): p. 633-43.
10. Lechan, R.M., et al., *The hypothalamic 'tuberoinfundibular' system of the rat as demonstrated by horseradish peroxidase (HRP) microiontophoresis*. *Brain Res*, 1980. **195**(1): p. 13-27.
11. Kádár, A., et al., *Distribution of hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone (TRH)-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of the mouse*. *J Comp Neurol*, 2010. **518**(19): p. 3948-61.
12. Galton, V.A., et al., *Thyroid hormone homeostasis and action in the type 2 deiodinase-deficient rodent brain during development*. *Endocrinology*, 2007. **148**(7): p. 3080-8.
13. Schroeder, A.C. and M.L. Privalsky, *Thyroid hormones, t3 and t4, in the brain*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2014. **5**: p. 40.
14. Mohacsik, P., et al., *Thyroid hormone and the neuroglia: both source and target*. *J Thyroid Res*, 2011. **2011**: p. 215718.
15. Larsen, P.R. and A.M. Zavacki, *The role of the iodothyronine deiodinases in the physiology and pathophysiology of thyroid hormone action*. *Eur Thyroid J*, 2012. **1**(4): p. 232-242.
16. Bianco, A.C. and B.W. Kim, *Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(10): p. 2571-9.
17. Peeters, R.P. and T.J. Visser, *Metabolism of Thyroid Hormone*, in *Endotext*, K.R. Feingold, et al., Editors. 2000: South Dartmouth (MA).
18. Astapova, I., *Role of co-regulators in metabolic and transcriptional actions of thyroid hormone*. *J Mol Endocrinol*, 2016. **56**(3): p. 73-97.
19. Reichlin, S., *Neuroendocrinology of the pituitary gland*. *Toxicol Pathol*, 1989. **17**(2): p. 250-5.
20. Hashimoto, K., et al., *cAMP response element-binding protein-binding protein mediates thyrotropin-releasing hormone signaling on thyrotropin subunit genes*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(43): p. 33365-72.

21. Persani, L., *Hypothalamic thyrotropin-releasing hormone and thyrotropin biological activity*. Thyroid, 1998. **8**(10): p. 941-6.
22. Harris, A.R., et al., *The physiological role of thyrotropin-releasing hormone in the regulation of thyroid-stimulating hormone and prolactin secretion in the rat*. J Clin Invest, 1978. **61**(2): p. 441-8.
23. Lechan, R.M. and T.P. Segerson, *Pro-TRH gene expression and precursor peptides in rat brain. Observations by hybridization analysis and immunocytochemistry*. Ann N Y Acad Sci, 1989. **553**: p. 29-59.
24. Fliers, E., et al., *Distribution of thyrotropin-releasing hormone (TRH)-containing cells and fibers in the human hypothalamus*. J Comp Neurol, 1994. **350**(2): p. 311-23.
25. Mihaly, E., et al., *Hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the human hypothalamus are innervated by neuropeptide Y, agouti-related protein, and alpha-melanocyte-stimulating hormone*. J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(7): p. 2596-603.
26. Rabeler, R., et al., *Generation of thyrotropin-releasing hormone receptor 1-deficient mice as an animal model of central hypothyroidism*. Mol Endocrinol, 2004. **18**(6): p. 1450-60.
27. Heuer, H., et al., *Expression of thyrotropin-releasing hormone receptor 2 (TRH-R2) in the central nervous system of rats*. J Comp Neurol, 2000. **428**(2): p. 319-36.
28. Charli, J.L., et al., *TRH inactivation in the extracellular compartment: role of pyroglutamyl peptidase II*. Neurobiology (Bp), 1998. **6**(1): p. 45-57.
29. Heuer, H., M.K. Schafer, and K. Bauer, *The thyrotropin-releasing hormone-degrading ectoenzyme: the third element of the thyrotropin-releasing hormone-signaling system*. Thyroid, 1998. **8**(10): p. 915-20.
30. Sanchez, E., et al., *Tanycyte pyroglutamyl peptidase II contributes to regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis through glial-axonal associations in the median eminence*. Endocrinology, 2009. **150**(5): p. 2283-91.
31. Fekete, C., et al., *alpha-Melanocyte-stimulating hormone is contained in nerve terminals innervating thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone gene expression*. J Neurosci, 2000. **20**(4): p. 1550-8.
32. Broberger, C., *Hypothalamic cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) neurons: histochemical relationship to thyrotropin-releasing hormone, melanin-concentrating hormone, orexin/hypocretin and neuropeptide Y*. Brain Res, 1999. **848**(1-2): p. 101-13.
33. Fekete, C. and R.M. Lechan, *Neuroendocrine implications for the association between cocaine- and amphetamine regulated transcript (CART) and hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone (TRH)*. Peptides, 2006. **27**(8): p. 2012-8.
34. Hrabovszky, E., et al., *Hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone and corticotropin-releasing hormone neurons of the rat contain vesicular glutamate transporter-2*. Endocrinology, 2005. **146**(1): p. 341-7.
35. Kallo, I., et al., *A novel pathway regulates thyroid hormone availability in rat and human hypothalamic neurosecretory neurons*. PLoS One, 2012. **7**(6): p. e37860.
36. Farkas, E., et al., *A Glial-Neuronal Circuit in the Median Eminence Regulates Thyrotropin-Releasing Hormone-Release via the Endocannabinoid System*. iScience, 2020. **23**(3): p. 100921.
37. Fuzesi, T., et al., *Noradrenergic innervation of hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in rats*. Brain Res, 2009. **1294**: p. 38-44.
38. Schwartz, M.W., et al., *Central nervous system control of food intake*. Nature, 2000. **404**(6778): p. 661-71.
39. Zhang, L., D. Hernandez-Sanchez, and H. Herzog, *Regulation of Feeding-Related Behaviors by Arcuate Neuropeptide Y Neurons*. Endocrinology, 2019. **160**(6): p. 1411-1420.
40. Toni, R., I.M. Jackson, and R.M. Lechan, *Thyrotropin-releasing-hormone-immunoreactive innervation of thyrotropin-releasing-hormone-tuberoinfundibular neurons in rat*

- hypothalamus: anatomical basis to suggest ultrashort feedback regulation.* Neuroendocrinology, 1990. **52**(5): p. 422-8.
41. Legradi, G. and R.M. Lechan, *Agouti-related protein containing nerve terminals innervate thyrotropin-releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus.* Endocrinology, 1999. **140**(8): p. 3643-52.
 42. Fekete, C., et al., *Agouti-related protein (AGRP) has a central inhibitory action on the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis; comparisons between the effect of AGRP and neuropeptide Y on energy homeostasis and the HPT axis.* Endocrinology, 2002. **143**(10): p. 3846-53.
 43. Broberger, C., et al., *The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(25): p. 15043-8.
 44. Wittmann, G., et al., *Medullary adrenergic neurons contribute to the neuropeptide Y-ergic innervation of hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the rat.* Neurosci Lett, 2002. **324**(1): p. 69-73.
 45. Nillni, E.A., *Regulation of the hypothalamic thyrotropin releasing hormone (TRH) neuron by neuronal and peripheral inputs.* Front Neuroendocrinol, 2010. **31**(2): p. 134-56.
 46. Legradi, G., J. Hannibal, and R.M. Lechan, *Association between pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and thyrotropin-releasing hormone in the rat hypothalamus.* J Chem Neuroanat, 1997. **13**(4): p. 265-79.
 47. Rodriguez-Rodriguez, A., et al., *Tanycytes and the Control of Thyrotropin-Releasing Hormone Flux Into Portal Capillaries.* Front Endocrinol (Lausanne), 2019. **10**: p. 401.
 48. Bernardis, L.L. and L.L. Bellinger, *The dorsomedial hypothalamic nucleus revisited: 1998 update.* Proc Soc Exp Biol Med, 1998. **218**(4): p. 284-306.
 49. Scott, M.M., et al., *Leptin targets in the mouse brain.* J Comp Neurol, 2009. **514**(5): p. 518-32.
 50. Singru, P.S., C. Fekete, and R.M. Lechan, *Neuroanatomical evidence for participation of the hypothalamic dorsomedial nucleus (DMN) in regulation of the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) by alpha-melanocyte stimulating hormone.* Brain Res, 2005. **1064**(1-2): p. 42-51.
 51. Fuller, P.M., J. Lu, and C.B. Saper, *Differential rescue of light- and food-entrainable circadian rhythms.* Science, 2008. **320**(5879): p. 1074-7.
 52. Bellinger, L.L., et al., *Plasma hormone levels in growth-retarded rats with dorsomedial hypothalamic lesions.* Physiol Behav, 1985. **34**(5): p. 783-90.
 53. Itoi, K. and N. Sugimoto, *The brainstem noradrenergic systems in stress, anxiety and depression.* J Neuroendocrinol, 2010. **22**(5): p. 355-61.
 54. Wittmann, G., *Regulation of hypophysiotrophic corticotrophin-releasing hormone- and thyrotrophin-releasing hormone-synthesizing neurones by brainstem catecholaminergic neurones.* J Neuroendocrinol, 2008. **20**(7): p. 952-60.
 55. Liposits, Z., et al., *Hypophysiotrophic thyrotropin releasing hormone (TRH) synthesizing neurons. Ultrastructure, adrenergic innervation and putative transmitter action.* Histochemistry, 1987. **88**(1): p. 1-10.
 56. Cote-Velez, A., et al., *Dexamethasone represses cAMP rapid upregulation of TRH gene transcription: identification of a composite glucocorticoid response element and a cAMP response element in TRH promoter.* J Mol Endocrinol, 2005. **34**(1): p. 177-97.
 57. Cunningham, E.T., Jr., M.C. Bohn, and P.E. Sawchenko, *Organization of adrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus in the rat.* J Comp Neurol, 1990. **292**(4): p. 651-67.
 58. Wittmann, G., et al., *Medullary adrenergic neurons contribute to the cocaine- and amphetamine-regulated transcript-immunoreactive innervation of thyrotropin-releasing hormone synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus.* Brain Res, 2004. **1006**(1): p. 1-7.

59. Sawchenko, P.E., et al., *Colocalization of neuropeptide Y immunoreactivity in brainstem catecholaminergic neurons that project to the paraventricular nucleus of the hypothalamus*. J Comp Neurol, 1985. **241**(2): p. 138-53.
60. Cunningham, E.T., Jr. and P.E. Sawchenko, *Anatomical specificity of noradrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus*. J Comp Neurol, 1988. **274**(1): p. 60-76.
61. Zhang, Z., et al., *TRH Neurons and Thyroid Hormone Coordinate the Hypothalamic Response to Cold*. Eur Thyroid J, 2018. **7**(6): p. 279-288.
62. Joseph-Bravo, P., L. Jaimes-Hoy, and J.L. Charli, *Regulation of TRH neurons and energy homeostasis-related signals under stress*. J Endocrinol, 2015. **224**(3): p. R139-59.
63. Wittmann, G., et al., *Galanin- but not galanin-like peptide-containing axon terminals innervate hypophysiotropic TRH-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus*. Brain Res, 2004. **1002**(1-2): p. 43-50.
64. Liao, N., H. Vaudry, and G. Pelletier, *Neuroanatomical connections between corticotropin-releasing factor (CRF) and somatostatin (SRIF) nerve endings and thyrotropin-releasing hormone (TRH) neurons in the paraventricular nucleus of rat hypothalamus*. Peptides, 1992. **13**(4): p. 677-80.
65. Deli, L., et al., *Type 1 cannabinoid receptor-containing axons innervate hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons*. Endocrinology, 2009. **150**(1): p. 98-103.
66. Kiss, J. and B. Halasz, *Ultrastructural analysis of the innervation of TRH-immunoreactive neuronal elements located in the periventricular subdivision of the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus*. Brain Res, 1990. **532**(1-2): p. 107-14.
67. Fekete, C., et al., *Association of cocaine- and amphetamine-regulated transcript-immunoreactive elements with thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and its role in the regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis during fasting*. J Neurosci, 2000. **20**(24): p. 9224-34.
68. Castillo, P.E., et al., *Endocannabinoid signaling and synaptic function*. Neuron, 2012. **76**(1): p. 70-81.
69. Farkas, I., et al., *Retrograde endocannabinoid signaling reduces GABAergic synaptic transmission to gonadotropin-releasing hormone neurons*. Endocrinology, 2010. **151**(12): p. 5818-29.
70. Bermudez-Silva, F.J., P. Cardinal, and D. Cota, *The role of the endocannabinoid system in the neuroendocrine regulation of energy balance*. J Psychopharmacol, 2012. **26**(1): p. 114-24.
71. Kola, B., et al., *The orexigenic effect of ghrelin is mediated through central activation of the endogenous cannabinoid system*. PLoS One, 2008. **3**(3): p. e1797.
72. Peterfi, Z., et al., *Endocannabinoid and nitric oxide systems of the hypothalamic paraventricular nucleus mediate effects of NPY on energy expenditure*. Mol Metab, 2018. **18**: p. 120-133.
73. Yeh, M.L., R. Selvam, and E.S. Levine, *BDNF-induced endocannabinoid release modulates neocortical glutamatergic neurotransmission*. Synapse, 2017. **71**(5).
74. Thoenen, H., *Neurotrophins and neuronal plasticity*. Science, 1995. **270**(5236): p. 593-8.
75. Tyler, W.J., S.P. Perrett, and L.D. Pozzo-Miller, *The role of neurotrophins in neurotransmitter release*. Neuroscientist, 2002. **8**(6): p. 524-31.
76. An, J.J., et al., *Discrete BDNF Neurons in the Paraventricular Hypothalamus Control Feeding and Energy Expenditure*. Cell Metab, 2015. **22**(1): p. 175-88.
77. Abel, E.D., et al., *Critical role for thyroid hormone receptor beta2 in the regulation of paraventricular thyrotropin-releasing hormone neurons*. J Clin Invest, 2001. **107**(8): p. 1017-23.
78. Ortiga-Carvalho, T.M., A.R. Sidhaye, and F.E. Wondisford, *Thyroid hormone receptors and resistance to thyroid hormone disorders*. Nat Rev Endocrinol, 2014. **10**(10): p. 582-91.
79. Rodriguez, E., et al., *Hypothalamic Tanycytes: A Key Component of Brain-Endocrine Interaction*. International Review of Cytology, 2005. **247**: p. 89-164.

80. Lechan, R.M. and R. Toni, *Functional Anatomy of the Hypothalamus and Pituitary*, in *Endotext*, K.R. Feingold, et al., Editors. 2000: South Dartmouth (MA).
81. Muller-Fielitz, H., et al., *Tanycytes control the hormonal output of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis*. *Nat Commun*, 2017. **8**(1): p. 484.
82. Mayerl, S., et al., *Transporters MCT8 and OATP1C1 maintain murine brain thyroid hormone homeostasis*. *J Clin Invest*, 2014. **124**(5): p. 1987-99.
83. Kano, M., et al., *Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission*. *Physiol Rev*, 2009. **89**(1): p. 309-80.
84. Piomelli, D., *The molecular logic of endocannabinoid signalling*. *Nat Rev Neurosci*, 2003. **4**(11): p. 873-84.
85. Regehr, W.G., M.R. Carey, and A.R. Best, *Activity-dependent regulation of synapses by retrograde messengers*. *Neuron*, 2009. **63**(2): p. 154-70.
86. Katona, I., et al., *Molecular composition of the endocannabinoid system at glutamatergic synapses*. *J Neurosci*, 2006. **26**(21): p. 5628-37.
87. Wittmann, G., et al., *Efferent projections of thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons residing in the anterior parvocellular subdivision of the hypothalamic paraventricular nucleus*. *J Comp Neurol*, 2009. **515**(3): p. 313-30.
88. Gary, K.A., et al., *The thyrotropin-releasing hormone (TRH) hypothesis of homeostatic regulation: implications for TRH-based therapeutics*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003. **305**(2): p. 410-6.
89. Varga, E., et al., *Thyrotropin-Releasing-Hormone-Synthesizing Neurons of the Hypothalamic Paraventricular Nucleus Are Inhibited by Glycinergic Inputs*. *Thyroid*, 2019. **29**(12): p. 1858-1868.
90. Merchenthaler, I. and Z. Liposits, *Mapping of thyrotropin-releasing hormone (TRH) neuronal systems of rat forebrain projecting to the median eminence and the OVL. Immunocytochemistry combined with retrograde labeling at the light and electron microscopic levels*. *Acta Biol Hung*, 1994. **45**(2-4): p. 361-74.
91. Szilvasy-Szabo, A., et al., *Localization of connexin 43 gap junctions and hemichannels in tanycytes of adult mice*. *Brain Res*, 2017. **1673**: p. 64-71.
92. Paxinos, G. and K.B.J. Franklin, *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. Second edition ed. 2001, San Diego, CA: Academic Press.
93. Simkus, C.R. and C. Stricker, *Properties of mEPSCs recorded in layer II neurones of rat barrel cortex*. *J Physiol*, 2002. **545**(2): p. 509-20.
94. Melnick, I., et al., *Developmental switch in neuropeptide Y and melanocortin effects in the paraventricular nucleus of the hypothalamus*. *Neuron*, 2007. **56**(6): p. 1103-15.
95. Somogyi, P. and I. Soltesz, *Immunogold demonstration of GABA in synaptic terminals of intracellularly recorded, horseradish peroxidase-filled basket cells and clutch cells in the cat's visual cortex*. *Neuroscience*, 1986. **19**(4): p. 1051-65.
96. Peters, A., *A Guide to the Cellular Structure of the Nervous-System - 2 Citation-Classical Commentary on the Fine-Structure of the Nervous-System - the Neurons and Supporting Cells by Peters,A., Palay,S.L., and Webster,H.D.* *Current Contents/Life Sciences*, 1991(22): p. 9-9.
97. Ishibashi, H., et al., *Excitation of locus coeruleus noradrenergic neurons by thyrotropin-releasing hormone*. *J Physiol*, 2009. **587**(Pt 23): p. 5709-22.
98. Gershengorn, M.C. and R. Osman, *Molecular and cellular biology of thyrotropin-releasing hormone receptors*. *Physiol Rev*, 1996. **76**(1): p. 175-91.
99. Sun, Y., X. Lu, and M.C. Gershengorn, *Thyrotropin-releasing hormone receptors -- similarities and differences*. *J Mol Endocrinol*, 2003. **30**(2): p. 87-97.
100. Ballerini, L., et al., *Electrophysiological interactions between 5-hydroxytryptamine and thyrotropin releasing hormone on rat hippocampal CA1 neurons*. *Eur J Neurosci*, 1994. **6**(6): p. 953-60.
101. Sanchez, E., et al., *Differential responses of thyrotropin-releasing hormone (TRH) neurons to cold exposure or suckling indicate functional heterogeneity of the TRH system in the*

- paraventricular nucleus of the rat hypothalamus*. Neuroendocrinology, 2001. **74**(6): p. 407-22.
102. Okauchi, Y., et al., *Thyrotropin-releasing hormone release in normal and hyperthyroid rats as measured by microdialysis*. Tokushima J Exp Med, 1996. **43**(3-4): p. 93-100.
 103. Wang, X., et al., *A subunit of the mediator complex regulates vertebrate neuronal development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(46): p. 17284-9.
 104. Carvalho, A.L., et al., *Role of the brain-derived neurotrophic factor at glutamatergic synapses*. Br J Pharmacol, 2008. **153 Suppl 1**: p. S310-24.
 105. Brigadski, T. and V. Lessmann, *The physiology of regulated BDNF release*. Cell Tissue Res, 2020. **382**(1): p. 15-45.
 106. Freund, T.F., I. Katona, and D. Piomelli, *Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling*. Physiol Rev, 2003. **83**(3): p. 1017-66.
 107. Kim, M.H., et al., *Glutamate transporter-mediated glutamate secretion in the mammalian pineal gland*. J Neurosci, 2008. **28**(43): p. 10852-63.
 108. Jameson JL, *Mechanisms of thyroid hormone action*. In: DeGroot LJ, Jameson JL, eds. Endocrinology 2001. 4th ed, vol 2. Philadelphia: WB Saunders; 1327–1344

10. Publikációs lista

1. 2016 Farago N, Kocsis AK, Brasko C, Lovas S, Rozsa M, Baka J, **Kovacs B**, Mikite K, Szemenyei V, Molnar G, Ozsvar A, Olah G, Pizar I, Zvara A, Patocs A, Barzo P, Puskas LG, Tamas G Human neuronal changes in brain edema and increased intracranial pressure ACTA NEUROPATHOLOGICA COMMUNICATIONS 4:(1) Paper 78.11 p.
2. 2018 Boldog E, Bakken TE, Hodge RD, Novotny M, Aevermann BD, Baka J, Borde S, Close JL, Diez-Fuertes F, Ding SL, Farago N, Kocsis AK, **Kovacs B**, Maltzer Z, McCarrison JM, Miller JA, Molnar G, Tamas G et al. Transcriptomic and morphophysiological evidence for a specialized human cortical GABAergic cell type NATURE NEUROSCIENCE 21 : 9 pp. 1185-1195. , 11 p.
3. 2019 Csajbók ÉA, Kocsis ÁK, Faragó N, Furdan S, **Kovács B**, Lovas S, Molnár G, Likó I, Zvara Á, Puskás LG et al. Expression of GLP-1 receptors in insulin-containing interneurons of rat cerebral cortex DIABETOLOGIA 62 : 4 pp. 717-725. , 9 p.
4. 2020 Farkas E*,Varga E*, **Kovács B***, Szilvásy-Szabó A* et al. A Glial-neuronal circuit in the median eminence regulates thyrotropin-releasing hormone-release via the endocannabinoid system iSCIENCE 27;23(3):100921 (*A szerzők egyenlő mértékben járultak hozzá a publikációhoz)

12. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban köszönettel tartozom Dr. Fekete Csabának, aki lehetőséget biztosított arra, hogy a kutatócsoportjában dolgozzak. Hálás vagyok, hogy biztosította az új technikák elsajátításához szükséges színvonalas oktatást és eszközöket egyaránt. Továbbá szeretném megköszönni az évek során nyújtott segítségét valamint szakmai irányítását és türelmes hozzáállását is. Köszönöm Dr. Péterfi Zoltánnak az elektrofiziológiával kapcsolatos kérdésekben nyújtott segítségét.

Köszönöm Dr. Varga Edinának, hogy munkássága nyomán a témát folytathattam, kibővíthettem.

Köszönöm Dr. Zelena Dóranak, hogy biztosította az optogenetikai kísérletekhez az egerekbe történő AAV beadást.

Köszönettel tartozom a labor jelenlegi és volt munkatársainak, akik részt vettek a disszertációm alapjául szolgáló kísérletek kivitelezésében.

Köszönöm mindenkinek, aki jó tanácsokkal, kedves szavakkal és támogató légkörrel vett körbe a disszertációval kapcsolatosan.

Végül az állatházi dolgozóknak köszönöm segítségüket.

Pályázatok: OTKA K109710, EU H2020 THYRAGE no. 666869, 2017-1.2.1-NKP-2017-00002