

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

Doktori (Ph.D.) értekezés **Tézisfüzete**

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)

Bevezetés

A hipotalamusz alapvető szerepet játszik a szervezet hormonális rendszerének szabályozásában. Két hipotalamikus rendszer, a hipotalamo-neurohipofizeális és a kissejtes tuberoinfundibuláris neuroszekréciós rendszerek vesznek részt közvetlenül a hormontermelés irányításában.

A kissejtes tuberoinfundibuláris rendszer idegsejtjei az arcuatus idegmagban, a hipotalamusz paraventriculárismagjában (PVN), a periventriculáris területen és a preoptikus területen helyezkednek el. Ezen úgynevezett hipofiziotróf neuronok közös tulajdonsága, hogy axonjuk az eminencia mediána (EM) külső zónájában végződik, ahol a hormonjaikat az extracelluláris térbe ürítik. 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 hipofizis első lebenyébe jutva szabályozzák a hipofizis hormonok szekrécióját és ezáltal a perifériás endokrin szervek működését.

Munkacsoportunk fő kutatási területe a pajzsmirigy működés agyi szabályozásának vizsgálata, mely szabályozásban kritikus szerepet játszanak a PV-ben elhelyezkedő hipofizeotróf tirotropin-releasing hormon (TRH) termelő idegsejtek. 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, a központi idegrendszer fejlődését és működését is.

A sejtekben a PMH hatását főként magi PMH receptorok közvetítik, 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. A PMH aktív formája, a T₃, a magi PMH receptorok preferált ligandja. A T₄-T₃ átalakulást dehidáz enzimek végzik, elsősorban az agyban és a perifériás szövetekben is megtalálható 2-

es típusú dehidrogenáz enzim (D2). A szöveti PMH hatás szabályozásához hozzájárul a PMH transzporterek, receptorok, receptor koregulátorok sejtszintű szabályozása is.

A vér PMH szintjének szabályozását a HHP tengely végzi. A tengely fő központi idegrendszeri szabályozója a PVN-ben elhelyezkedő hipofiziotróf TRH termelő sejtcsoport. A TRH egy tripeptid-amid (pGlu-His-ProNH₂), ami számos más biológiai funkció szabályozása mellett az agyalapi mirigy TSH szintézisének, felszabadulásának és biológiai aktivitásának szabályozását is végzi. Hipofiziotróf TRH sejtek egérben csak a PVN középső részén helyezkednek el, részben a magnocelluláris almagban a vazopresszin és oxitocin a neuronok között, azonban a TRH sejtek e területen is parvocelluláris sejtek. A hipofiziotróf TRH idegsejtekből szekretált TRH a hipofízis portális keringésén keresztül az agyalapi mirigybe jut, ahol szabályozza a tirotróp sejtek TSH szintézisét és felszabadulását. A hipofiziotróf TRH neuronok 2-es típusú vezikuláris glutamát transzportert (VGLUT2) is termelnek, ami a sejtek glutamáterg fenotípusára utal. Mivel az EM TRH axonterminálisai tartalmaznak VGLUT2 proteint, feltételezhető, hogy a glutamát a TRH-val együtt szabadul fel az EM külső zónájában. 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: A hipotalamusz arcuatus magjának táplálkozást szabályozó sejtcsoportjai az éhezés és a leptin hatását közvetítik a TRH idegsejtek felé. A hipotalamusz dorzomediális magjának (DMN) idegsejtjei az energiaegyensúllyal és a cirkadián ritmussal kapcsolatos információkat továbbíthatják, míg az agytörzsi katekolamin termelő idegsejtek a hideg stressz hatására serkentik a TRH idegsejteket.

Ezen inputok mellett a PVN TRH idegsejtjeit számos peptiderg rendszer idegsejtjei is beidegzik. A PVN-ben gyakorlatilag az összes TRH idegsejt felszínén nagyszámú TRH-tartalmú axonvarikozitás figyelhető meg. A TRH-tartalmú varikozitások és neuronok közt szimmetrikus típusú szinapszisokat figyeltek meg. 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. Zhang és munkatársai azonban kimutatták, hogy TRH mikrodialízissel történő PVN-be juttatása megemeli a vér PMH szintjét. Ezen adat megkérdőjelezi a TRH-TRH kapcsolatok gátló jellegét.

Morfológiai adatok alapján a TRH sejtek szabályozásában retrográd transzmitter rendszerek is szerepet játszanak.

Az endokannabinoid rendszer egyik fő lipid transzmittere, a 2-arachidonoylglycerol (2-AG), az idegrendszerben a posztzinaptikus idegsejtekből szabadul fel és a preszinaptikus axonterminálisok 1-es típusú kannabinoid receptorán hatva gátolja a transzmitterek felszabadulását. Az endokannabinoidok ürülését kiválthatja klasszikus transzmitterek, mint glutamát vagy GABA, fokozott ürülése, de a rendszer részt vesz hormonok és neuropeptidek hatásának közvetítésében is. Így például a ghrelin az endokannabinoid rendszer közvetítésével gátolja a PVN kissejtes neuronjainak serkentő beidegzését. Munkacsoportunk kimutatta, hogy a CB1 jelen van a PVN TRH idegsejtjeit beidegző axonokban is, megfigyelhető a TRH idegsejtek GABA-erg és glutamaterg beidegzésében is. Azonban az endokannabinoid rendszer szerepe a TRH idegsejtek szabályozásában egyelőre még nem tisztázott.

Az endokannabinoidokhoz hasonlóan az agyi eredetű neurotrof faktort (BDNF) is használják az idegsejtek retrográd transzmitterként. A BDNF receptora a tropomiozin receptor tirozin kináz (TrkB). A BDNF preszinaptikus TrkB-n hatva képes serkenteni a preszinaptikus terminálisok aktivitását. Mivel a TRH idegsejtek egy része termel BDNF-et a PVN-ben feltételeztük, hogy a BDNF-TrkB

retrográd szignálings rendszer is részt vehet a TRH idegsejtek TRH általi szabályozásában.

Az idegi inputokon kívül a HHP tengely szabályozásában alapvető szerepet játszik a PMH negatív *feedback* szabályozás. A PMH gátolja a TRH szintézist a hipofiziotróf sejtekben és emellett a hipofizis tiotrop sejteire közvetlenül hatva is gátolja a TSH szintézisét és ürülését ezáltal gátolva a pajzsmirigy működését. 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, mely atást elsősorban a β_2 PMH receptor (TR β_2) közvetíti. E receptor hiányában a PMH nem képes szabályozni a TRH termelődését.

A hipotalamuszban a T4-T3 átalakulást katalizáló D2 enzim kizárólag egy speciális gliasejt típusban a tanicitákban termelődik. A taniciták a látóideg kereszteződés mögött bélelik a harmadik agykamra oldalfalát és az EM kamrai felszínét. Hosszú bazális nyúlványuk az EM külső zónájába illetve az arcuatus, ventromediális magok és a DMN területére vetülnek. Az EM külső zónájában a taniciták nyúlványai a hipofizeális portális keringés fenesztrált kapillárisai körül végződnek ahol közvetlen kapcsolatot létesítenek a hipofiziotróf idegsejtek axonterminálisaival. Ez az anatómiai kapcsolat azt sugallja, hogy az EM-be vetülő taniciták (β_2 -taniciták) részt vehetnek a neurohipofizeális rendszerek működésének szabályozásában.

A taniciták D2 mellett OATP1C1 és MCT8 PMH transzportereket is termelnek. Így e sejtek képesek T4-et felvenni és T3-at szekretálni. 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. Habár a D2 termelődését a legtöbb sejtben a PMH szint negatívan regulálja, a taniciták D2 aktivitására nem hat a vér PMH szintje, ezért a taniciták a vér T4 szint változását a hipotalamusz T3 szint változásává konvertálják, ami kritikus nem csak a TRH idegsejtek negatív feedback

szabályozásához, hanem számos más hipotalamikus funkció regulációjához is.

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.

Továbbá, a taniciták endokannabinoidokon keresztül is szabályozzák a hipofiziotróf axonok TRH szekrécióját. Munkacsoportunk nemrégiben megfigyelte, hogy az EM külső zónájában a hipofiziotróf TRH idegsejtek axonvégződése tartalmaznak CB1-et. Ez felvetette a lehetőségét, hogy az endokannabinoidok is szabályozhatják a TRH felszabadulását az EM-ben. A legtöbb esetben az endokannabinoidok posztszinaptikus idegsejtekből szabadulnak fel, és a preszinaptikus axonterminálisokon elhelyezkedő CB1 receptorokra hatnak. Munkacsoportunk kimutatta, hogy az EM-ben taniciták termelik az endokannabinoid 2-AG termelését katalizáló enzimet a diacylglycerol lipáz alfát (DAGL α), sőt a DAGL α -tartalmú tanicita nyúlványok közvetlen kapcsolatot létesítenek a CB1-tartalmú TRH axonokkal. 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. 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 recetorokon hatva fokozza a posztszinaptikus neuron endokannabinoid termelését. Mivel a PVN TRH idegsejtjei glutamaterg idegsejtek, felvetettük a lehetőségét, hogy a TRH sejtek glutamát ürítése serkenti a tanicitákat, mely sejtek emelkedett endokannabinoid termelése ezt követően gátolja a TRH axonok aktivitását.

Célkitűzés

A HHP tengely centrális szabályozásának jobb megértése érdekében az alábbi célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

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

Alkalmazott módszerek

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

A TRH TRH sejtekre kifejtett hatásának vizsgálatához felnőtt, hím (P40 és P80 napos) TRH-IRES-TdTomato egereket használtunk.

A PVN hipofiziotróf és nem-hipofiziotróf TRH idegsejtjeinek azonosításához a TRH-IRES-TdTomato egerek laterális farokvénájába Fluoro-Gold (FG) retrográd jelölőanyagot injektáltunk (15 µg/testtömeg g 100 µl fiziológiás sóoldatban). 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 FG-t és a TRH idegsejteket jelölő TdTomato fluoreszcens fehérjét immuncitokémiával detektáltuk, míg a vizsgált idegsejtek biocitin tartalmát sztreptavidin-konjugált fluorokróm segítségével detektáltuk. A szeletekről Zeiss LSM 780 konfokális mikroszkóppal (Zeiss Company, Jena, Németország) készítettünk felvételeket.

Az elektrofiziológiai vizsgálatokhoz az egereket mély izoflurán altatásban dekapitáltuk. Az agyakat a koponyából történő gyors eltávolítást követően 95% O₂/ 5% CO₂ keverékével buborékoltatott, jéghideg szeletelő oldatba merítettük. VT1200S vibratómmal (Leica) koronális, 250 µm vastag PVN vagy az EM-t tartalmazó szeleteket készítettünk, majd a szeleteket mesterséges cerebrospinális folyadékkal töltött kamrában inkubáltuk legalább 1,5 órán keresztül.

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.

A TRH sejtek vizsgálatához 4-6 M Ω ellenállású, a taniciták vizsgálatához 6-8 M Ω ellenállású boroszilikát kapillárisból (OD = 1,5 mm vastagságú fal, Garner Co.) készült patch pipettákat használtunk. A kísérletekhez a miniatűr gátló posztszinaptikus áramok (mIPSC) elemzésének kivételével, a patch pipettákat alacsony klorid-tartalmú intracelluláris recording oldattal töltöttük meg. Az mIPSC vizsgálatokhoz magas klorid-tartalmú intracelluláris pipetta oldatot használtunk.

A TRH idegsejteket a tdTomato vörös fluoreszcenciája alapján azonosítottuk rövid epifluoreszcens megvilágítás mellett. A β_2 -tanicitákat tipikus morfológiájuk és a sejttestük elhelyezkedése alapján azonosítottuk 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.

A taniciták vizsgálatokor konnexin 43 csatornákat gátló karbenoxolont (CBX; 100 μ M, Tocris) tartalmazó aCSF-et használtunk, hogy blokkoljuk a gap junction kapcsolatokon keresztüli intercelluláris kommunikációt. A glutamát tanicitákra kifejtett hatásának vizsgálatokor a lehetséges közvetett hatások megelőzése érdekében a feszültségfüggő nátrium csatorna gátlót, a TTX-et (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 hipofiziotróf TRH axonok tanicitákra kifejtett hatásának vizsgálatához optogenetikai segítségével aktiváltuk a TRH axonokat az EM külső zónájában és patch clamp elektrofiziológia alkalmazásával mértük a TRH axonok tanicitákra kifejtett hatását. E

vizsgálatokhoz felnőtt, hím TRH-IRES-Cre egereket használtunk. AAV5.EF1a.DIO.hChR2(H134R)-eYFP.WPRE.hGH vírust injektáltunk az egerek PVN-jébe mindkét oldalon sztereotaxikus kontroll mellett. Az egereken két héttel az AAV beadás után végeztük el az elektrofiziológiai vizsgálatot. Az EM-et tartalmazó agyszeletekben 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 taniciták elektrofiziológiai vizsgálatát a fentebb leírtaknak megfelelően végeztük. Minden MP 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 lézertény 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 channelrhodopszint.

Eredmények

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. $3,42 \pm 0,77$; $p < 0,005$). Ezekben a TRH neuronokban a kezelés átlagosan 3,67 mV depolarizációt okozott (kontroll vs. TRH, mV-ban megadva: $-47,12 \pm 1,19$ vs. $-44,45 \pm 1,17$; $p < 0,005$). A TRH idegsejtek fennmaradó 42%-ában (N = 10) a TRH nem serkentette a tüzelési frekvenciát (kontroll vs. TRH, Hz-ben megadva: $3,76 \pm 0,85$ vs. $3,61 \pm 0,80$; $P = 0,91$), és nem befolyásolta a MP-t (kontroll vs. TRH, mV-ban megadva: $-43,27 \pm 2,39$ vs. $-42,69 \pm 2,48$; $P = 0,98$). A TRH kezelésre tüzelés 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.

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 a TRH sejtek MP-ját megközelítőleg 3 mV-val depolarizálta (N = 20; kontroll vs. TRH, (mV): $-44,86 \pm 1,25$ vs. $-43,01 \pm 1,26$; $p < 0,05$), ami arra utal, hogy a TRH közvetlenül serkenti a PVN TRH idegsejtjeit.

A TRH-nak a PVN hipofiziotróf és nem-hipofiziotróf TRH neuronjaira gyakorolt hatásának összehasonlításához, FG 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 FG 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. $3,83 \pm 1,14$; $P = 0,09$). 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. $3,03 \pm 1,44$; $P = 0,28$).

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). 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 felszélesség).

A TRH mEPSC frekvenciára gyakorolt hatása alapján a TRH idegsejteteket három kategóriába soroltuk. A TRH neuronok körülbelül felében (a 28 vizsgált sejtéből 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. $1,47 \pm 0,13$; $p < 0,05$). A TRH neuronok 40%-ban (a 28 vizsgált sejtéből 11, 39,29%) a TRH kezelés gátolta az mEPSC-k frekvenciáját (kontroll vs. TRH (Hz): $0,87 \pm 0,14$ vs. $0,53 \pm 0,07$; $p < 0,001$). Az mEPSC-k egyéb mért paramétereit a TRH kezelés nem befolyásolta. Két TRH neuron esetében (a 28 vizsgált sejtéből 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). 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 TRH egyetlen sejtben sem serkentette az mEPSC frekvenciát. A CTX-B azonban nem befolyásolta a TRH mEPSC frekvenciát gátló hatását. A sejtek 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. $0,51 \pm 0,21$; $p < 0,05$). Az endokannabinoid rendszernek a TRH mEPSC frekvenciát gátló hatásának közvetítésében játszott szerepének vizsgálatához CTX-B mellett CB1 antagonistá AM251-et is adagoltunk az extracelluláris oldathoz. A vizsgált 14 sejtéből 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.

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).

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.

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), és a kainát (125 μ M; $8,04 \pm 2,08$ mV, N = 7, p < 0,001) 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.

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). A VU 0155041 GRM4 (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). Ez arra utal, hogy valószínűleg, hogy a GRM4 aktiválása hozzájárulna a taniciták glutamát által kiváltott depolarizációjához.

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). Ezért megvizsgáltuk, hogy a receptorokon kifejtett hatás mellett a 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). 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.

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 ($p < 0,001$). 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. 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; $p < 0,01$). Ennek a depolarizációnak a sebessége szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a csak glutamát által kiváltott depolarizáció sebessége ($0,004 \pm 0,002$; $p < 0,05$). A MP első deriváltjának (dV / dt) csak egy csúcsa volt az antagonisták jelenlétében, ami azt jelzi, hogy ennek a hatásnak csak egy fázisa van. A két antagonistista 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.

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

Feltételeztük, hogy a TRH axonok aktivitásának tanicitákra gyakorolt hatásának közvetítésében részt vesz a TRH axonok fő peptiderg transzmittere a TRH, ezért vizsgáltuk a TRH taniciták MP-jére kifejtett hatását. TRH kezelés ($1\mu\text{M}$) azonban nem befolyásolta a β_2 -taniciták MP-ját, míg a vizsgált taniciták MP-ja glutamát ($500\mu\text{M}$) 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 $P = 0,37$).

A tanicitáknak a TRH axonok optogenetikai ingerlésére adott válaszában glutamát független fázisát 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 (2 mM) 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, $N = 8$; $P = 0,09$).

Összefoglalás

A TRH idegsejtek két típusú kapcsolatának hatását vizsgáltuk meg. Egyrészt feltártuk a TRH-nak a PVN-ben található TRH neuronokra kifejtett hatását, másfelől leírtuk a hipofiziotróf TRH axonok és az EM-ban található β_2 -taniciták kölcsönhatást.

Elmondható, hogy a PVN TRH neuronok két alcsoportja hasonló arányban reagál AP frekvencia növekedéssel TRH-ra, ez további alpopulációk meglétére utal. Eredményeink alapján, a TRH közvetlenül is és retrográd transzmitterek közvetítésével a TRH idegsejtek serkentő beidegzését befolyásolva is szabályozza a TRH neuronok aktivitását. A TRH peptid a TRH sejtek felében serkenti a glutamáterg inputokat, míg a TRH idegsejtek harmadában gátolja azt. A TRH ezen hatásait a G-proteinek intracelluláris blokkolása kivédi igazolva, hogy retrográd transzmitterek segítségével szabályozza a TRH sejtek beidegzésének aktivitását. Adataink igazolják, hogy a TRH glutamáterg inputokat serkentő hatását a BDNF/TrkB útvonal, míg a gátló hatását az endokannabinoid útvonal közvetíti.

Kimutattuk, hogy a hipofiziotróf TRH axonok aktiválása a β_2 taniciták kétfázisú depolarizációját okozza. Ezen hatás első, gyorsabb fázisát a TRH axonokból ürülő glutamát közvetíti. A TRH axon aktiváció következtében kialakuló tanicita depolarizáció második lassabb fázisát közvetítő transzmitter azonosítása további vizsgálatokat igényel, azonban eredményeink kizárták a TRH és a G protein kapcsolt receptorok szerepét a hatás kialakításában. Mivel a β_2 -taniciták endokannabinoid felszabadulás útján szabályozzák a TRH szekrécióját a EM-ben, és a glutamát fokozza a taniciták endokannabinoid termelését, eredményeink arra utalnak, hogy a β_2 -taniciták és a hipofiziotróf TRH axon terminálisok között reciprok mikro-szabályozó kör létezik az EM külső zónájában.

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 iránymutatását 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 Dórának, 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.

Tudományos közlemények listája

MTMT azonosító: 10054235

Értekezés alapjául szolgáló közlemény:

2020 Farkas E*, Varga E*, Kovács B*, Szilvász-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 IF: 5.08

**A szerzők egyenlő mértékben járultak hozzá a publikációhoz.*

Egyéb közlemények:

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. IF: 6.023

2018 Boldog E, Bakken TE, Hodge RD, Novotny M, Aebermann BD, Baka J, Borde S, Close JL, Diez-Fuertes F, Ding SL, Farago N, Kocsis AK, Kovacs B, Maltzer Z, McCorrison 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. IF: 21,126

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. IF: 5.414

Összesített IF: 37,643

Nyilatkozat

Mint az alábbi közlemény felelős szerzője igazolom, hogy Kovács Balázs társelsőszerző Ph.D. jelölt jelentős mértékben hozzájárult az alábbi tudományos publikáció létrehozásához, és tézisében közölt eredményeit más Ph.D. értekezésben nem használjuk fel.

2020 Farkas E*, Varga E*, Kovács B*, Szilvássy-Szabó A*, Kádár A, Kővári D, Gereben B, Lechan M.R, Charli L-J, Joseph-Bravo P, Fekete C 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.*

Kelt:

Dr. Fekete Csaba
Felelős szerző

Kovács Balázs
Társelsőszerző

Mint az alábbi közlemény felelős szerzője igazolom, hogy Kovács Balázs társszerző Ph.D. jelölt hozzájárult az alábbi tudományos publikáció létrehozásához.

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, Piszar 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.

Kelt:

Prof. Dr. Tamás Gábor
Felelős szerző

Kovács Balázs
Társszerző