A reprodukciót szabályozó kisspeptin neuronrendszer kémiai karakterizálása és kapcsolatrendszerének morfológiai vizsgálata emberi hipotalamuszban

Doktori értekezés

Skrapits Katalin

Biológia Doktori Iskola, iskolavezető: Prof. Erdei Anna

Molekuláris Sejt- és Neurobiológia Doktori Program, programvezető: Prof. Sass Miklós

Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar

Témavezető: Prof. Sass Miklós, egyetemi tanár, D.Sc.

Konzulens: Dr. Hrabovszky Erik, tudományos tanácsadó, D.Sc.

Készült:

Magyar Tudományos Akadémia Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézete

Endokrin Neurobiológia Kutatócsoport

Budapest, 2015

Tartalom

Rövidítések jegyzéke **4**

1. Bevezetés **6**

1.1. Az emlősök szaporodásának neuroendokrin szabályozása **6**

1.2. A GnRH neuronok **8**

1.2.1. A GnRH neuronok fejlődése, migrációja és projekciói 8

1.2.2. A GnRH „pulzusgenerátor” 9

1.2.3. Az ösztrogének hatása a GnRH pulzusgenerátor működésére 10

1.3. A GnRH idegsejtek működését befolyásoló interneuronok **11**

1.4. A kisspeptin **13**

1.5. A kisspeptin neuronok szerepe és neurokémiai tulajdonságai laboratóriumi állatokban **15**

1.5.1. A kisspeptin neuronok ko-transzmitterei a preoptikus területen 15

1.5.1.1. Met-enkefalin *15*

1.5.1.2. Galanin *16*

1.5.1.3. Tirozin-hidroxiláz *16*

1.5.1.4. GABA és glutamát *17*

1.5.2. A kisspeptin idegsejtek ko-transzmitterei a *nucleus arcuatus* területén: a „KNDy neuronok” 17

1.5.2.1. A neurokinin B és receptora *20*

1.5.2.2. A dinorfin és receptora *21*

1.5.2.3. Galanin *21*

1.5.2.4. GABA és glutamát *22*

1.6. Az emberi kisspeptin neuronok neurokémiai tulajdonságai **23**

1.6.1. Neurokinin B ko-expresszió 23

1.6.2. Dinorfin ko-expresszió 24

1.6.3. Subtance P ko-expresszió 24

2. Célkitűzés **27**

3. Anyagok és módszerek **28**

3.1. Humán szövetminták **28**

3.2. Szövettani metszetek **28**

3.3. Fénymikroszkópos immunhisztokémia **30**

3.4. Ellenanyagok **31**

3.5. Ellenanyag-specificitási kontrollok **33**

3.6. Képalkotás **36**

3.7. Kvantitatív anatómiai vizsgálatok **37**

3.7.1. Neuropeptid ko-expresszió vizsgálata sejttestekben 37
3.7.2. Neuropeptid ko-expresszió kvantitatív elemzése axonokban 38
4. Eredmények 39
4.1. Az emberi kisspeptin sejtek immunhisztokémiai profilja 39
4.1.1. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) megjelenése KP-IR és NKB-IR neuronokban 39
4.1.1.1. A CART-immunreaktivitás mennyiségi jellemzése a KP-IR és NKB-IR perikarionokban 41
4.1.1.2. Új kvantitatív megközelítés axonális neuropeptid kolokalizáció elemzésére 41
4.1.1.3. A CART-immunreaktív KP és NKB axonok relatív előfordulási gyakorisága a nucleus infundibularisban 42
4.1.1.4. Átfedés hiánya a CART peptidet termelő NKB és agouti-related protein (AGRP) sejtpopulációk között 44
4.1.1.5. Átfedés a SP-termelő és CART-termelő KP és NKB neuronok között 44
4.1.1.6. Bő axo-szomatikus és axo-dendritikus kapcsolatok a nucleus infundibularis CART peptidet kifejező KP, NKB és SP neuronjai között 46
4.1.2. Proenkefalin (pENK) férfi hipotalamusz minták KP és NKB neuronjaiban 48
4.1.3. Az emberi KP és NKB neuronok által nem termelt neuropeptidek és neurotranszmitterek 48
4.2. Új aspektusok a GnRH neuronok afferens szabályozásában 51
4.2.1. CART/KP/NKB ko-expresszió a GnRH idegsejtek axo-dendritikus bemeneteiben. 51
4.2.2. A KP, NKB és SP neuronok axo-axonális kapcsolatai GnRH idegsejtekkel 51
5. Az eredmények megvitatása 55
5.1. Fajok közötti neurokémiai különbségek: az emberi KP neuronok által kifejezett neuropeptidek lehetséges szerepe a reprodukció szabályozásában 55
5.2. Az együtt kifejeződő neuropeptidek sejten belüli megoszlása: kolokalizációs arányok a perikarionok és az axonok szintjén 58
5.3. Az axo-axonális kapcsolatok jelentősége a GnRH neuronok működésének szabályozásában 60
6. Összefoglalás 64
7. Summary 66
8. Köszönetnyilvánítás 68
9. Irodalomjegyzék 69

Rövidítések jegyzéke

3V	**3**rd **v**entricle (III. agykamra)
ABC	avidin-biotin-peroxidáz komplex (**a**vidin-**b**iotin-peroxidase **c**omplex)
AMCA	aminometil kumarin acetát (**am**inomethyl **c**oumarin **a**cetate)
AGRP	**ag**outi **r**elated **p**rotein
α-MSH	**α**-**m**elanocita **s**timuláló **h**ormon
ARC	*nucleus **arc**uatus*
AVPV	*nucleus periventricularis anteroventralis* (**a**ntero**v**entral **p**eri**v**entricular nucleus)
CART	**c**ocaine- and **a**mphetamine-**r**egulated **t**ranscript
CCK	kolecisztokinin (**c**hole**c**ysto**k**inin)
Cy3, Cy5	cianin-3, cianin-5 (**cy**anine-**3**, **cy**anine-**5**)
DAB	**d**i**a**mino**b**enzidin
DMH	*nucleus **d**orso**m**edialis **h**ypothalamicus*
Dyn	dinorfin (**dyn**orphin)
E2	17β-ösztradiol
EM	***e**minentia **m**ediana*
ER-α és -β	α és β típusú ösztrogén receptorok (**e**strogen **r**eceptor-**α** and **-β**)
ERE	ösztrogén-válasz elem (**e**strogen **r**esponse **e**lement)
FITC	**f**luoreszcein **i**zo**t**io**c**ianát
FSH	**f**ollikulus **s**timuláló **h**ormon
Fx	***f**orni**x***
GAD-67	glutaminsav dekarboxiláz-67 (**g**lutamic **a**cid **d**ecarboxylase-**67**)
GAL	**gal**anin
GnRH	**g**o**n**adotropin-**r**eleasing **h**ormon
GPR54	**G**-**p**roteinhez-kapcsolt **r**eceptor-**54**
HHG	**h**ipotalamo-**h**ipofizeo-**g**onadális (tengely)
Inf	*nucleus **inf**undibularis*
InfS	**inf**undibular **s**talk (*infundibulum*)
IR	**i**mmun**r**eaktív
ISH	***i**n **s**itu* **h**ibridizáció
KISS1R	**kiss**peptin **r**eceptor
KNDy	**k**isspeptin/**n**eurokinin B/**dy**norphin

KOR	**κ**-**o**pioid **r**eceptor
KP	**k**iss**p**eptin
LH	**l**uteinizáló **h**ormon
LHA	**l**aterális **h**ipotalamikus **a**rea
Ltu	*nucleus tuberalis lateralis* (**l**ateral **tu**beral nucleus)
mENK	**m**et-**enk**efalin
NHS	normál lószérum (**n**ormal **h**orse **s**erum)
NK1/2/3R	**n**euro**k**inin-**1/2/3 r**eceptor
NKB	**n**euro**k**inin **B**
NPY	**n**euro**p**eptid **Y**
NT	**n**euro**t**enzin
Opt	*tractus **opt**icus*
OVLT	***o**rganum **v**asculosum **l**aminae **t**erminalis*
PBS	foszfát puffer (**p**hosphate **b**uffered **s**aline)
pENK	**p**ro**enk**efalin
PoA	**p**re**o**ptikus **a**rea
POMC	**p**ro**o**pio**m**elano**c**ortin
PVpo	*nucleus preopticus periventricularis* (**p**eri**v**entricular **p**re**o**ptic nucleus)
RP3V	a III. agykamra rosztrális periventrikuláris területe (**r**ostral **p**eriventricular area of the **3**rd **v**entricle)
SEM	a középérték közepes hibája (**s**tandard **e**rror of **m**ean)
SP	**s**ubstance **P**
SS	**s**zomato**s**ztatin
TH	**t**irozin-**h**idroxiláz
vGluT2	**v**ezikuláris **glu**tamát **t**ranszporter-**2**
VMH	*nucleus **v**entro**m**edialis **h**ypothalamicus*

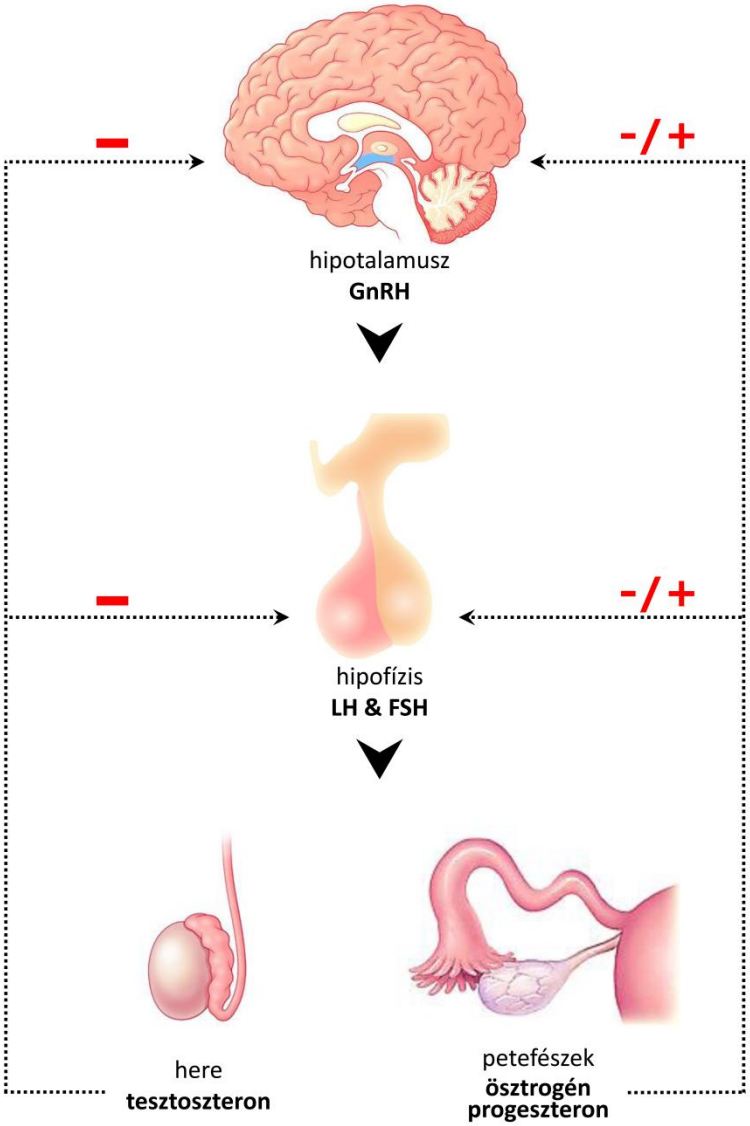
1. Bevezetés

1.1. Az emlősök szaporodásának neuroendokrin szabályozása

Az élő szervezetek alapvető tulajdonsága a reprodukcióra való képesség. A szaporodás során az élőlények a genetikai információ továbbadásával önmagukhoz hasonló utódot hoznak létre, biztosítva ezzel a faj fennmaradását.

Az emlősök szaporodásának szabályozását a reproduktív tengely végzi, melynek hierarchikusan egymásra épülő három szintje a hipotalamusz, a hipofízis, valamint a gonádok. A szintek között bonyolult és pontosan szabályozott, kémiai jelátvitelen alapuló kölcsönhatás zajlik. A hipotalamo-hipofizeo-gonadális (HHG) tengely kulcsszereppel bíró egysége a gonadotropin-releasing hormont (GnRH) termelő idegsejtek rendszere. A központi és perifériáról érkező hatások függvényében kialakuló GnRH szekréciós mintázat képezi a hipotalamusz végső kimeneti jelét a hipofízis felé. A GnRH neuronok hormontartalmukat szabályos – 30-90 percenként jelentkező – pulzusok formájában ürítik a hipofízis portális kapillárisainak perikapilláris térségébe (Carmel és mtsai., 1976; Knobil, 1980; Clarke és Cummins, 1982; Krsmanovic és mtsai., 1996; Terasawa, 1998; Moenter és mtsai., 2003; Krsmanovic és mtsai., 2010). A GnRH az adenohipofízis szintjén a luteinizáló hormon (LH), valamint a follikulus stimuláló hormon (FSH) elválasztását serkenti. Ez a két gonadotrop hormon felelős az ivarmirigyekben történő nemi szteroidok – a herékben a tesztoszteron, a petefészkekben az ösztrogének és a progeszteron – termelődéséért, valamint az ivarsejtképződés zavartalan működéséért.

A HHG-tengely szintjei közti kapcsolat nem egyirányú: a gonádokban termelődő nemi hormonok specifikus receptoraik közvetítésével a reproduktív tengely felsőbb szintjeire hatva, „feedback” mechanizmusok révén befolyásolják azok működését (Karsch és Foster, 1975; Knobil, 1980; Herbison, 1998) (**1. ábra**). Másrészt, a nemi hormonok a receptoraikat kifejező szervek, szervrendszerek működésére is hatást gyakorolnak. A GnRH neuronok topográfiájáról, a pulzatilis hormonszekréciót befolyásoló tényezőkről (különös tekintettel az ösztrogének szerepére), valamint a GnRH neuronok afferens szabályozásában résztvevő és az ösztrogénhatás közvetítésében kulcsfontosságú szerepet játszó interneuronokról a következő fejezetekben lesz szó.



1. ábra: A reproduktív tengely szintjei közötti kapcsolat. A hipotalamikus GnRH neuronokból felszabaduló neurohormon (GnRH) serkenti az adenohipofízisben a gonadotrop hormonok (LH, FSH) szekrécióját, ami az ivarszervekben (herék, petefészkek) a nemi szteroid hormonok (tesztoszteron, ösztrogén, progeszteron) felszabadulásához vezet. A nemi hormonok a tengely felsőbb szintjeire visszacsatolva befolyásolják azok működését.

1.2. A GnRH neuronok

1.2.1. A GnRH neuronok fejlődése, migrációja és projekciói

A GnRH neuronok az egyedfejlődés során az orrplakodból fejlődnek, és még születés előtt a szaglóideg mentén az előagyba vándorolnak (Schwanzel-Fukuda és Pfaff, 1989; Wray, 2001). A GnRH neuronok migrációja a reprodukció szempontjából kritikus. A folyamat zavara – a fejlődő szaglórendszerrel alkotott szoros kapcsolat miatt – a jellemzően anozmiával súlyosbított, elmaradó pubertással járó hipogonadotrop hipogonadizmushoz vezethet (Kallmann-szindróma) (Schwanzel-Fukuda és mtsai., 1989). A GnRH neuronok végső megoszlása a vándorlás befejeztével fajonként eltér. Míg rágcsálókban a perikarionok nagy része a szeptális-preoptikus régióban található (Sétáló és mtsai., 1976; Merchenthaler és mtsai., 1980), addig más fajoknál – pl. birkákban (Lehman és mtsai., 1986) vagy majmokban (King és Anthony, 1984) – a preoptikus régiótól kaudálisabban elhelyezkedő mediobazális hipotalamusz/*nucleus arcuatus* (ARC) területén is megfigyelhetőek diszkrét GnRH sejtcsoportok. Emberben immunreaktív (IR) sejttestek találhatók a *nervus terminalis* mentén, az olfaktorikus területeken, a szeptális régióban, a Broca-féle diagonális köteg területén, a preoptikus régióban, a periventrikuláris hipotalamikus magokban és a mediobazális hipotalamusz infundibuláris régiójában (*nucleus infundibularis*, Inf; *infundibulum* = infundibular stalk, InfS) (Barry, 1976; 1977; Paulin és mtsai., 1977; Silverman és mtsai., 1979; Anthony és mtsai., 1984; King és Anthony, 1984; King és mtsai., 1985; Song és mtsai., 1987; Abe és mtsai., 1990; Najimi és mtsai., 1990; Stopa és mtsai., 1991; Bloch és mtsai., 1992; Rance és mtsai., 1994; Dudás és mtsai., 2000; Dudás és Merchenthaler, 2006). A hipofizeotróf GnRH axonok többsége a posztinfundibuláris eminentia/*eminentia mediana* (EM) területén végződik; ez az erekkel sűrűn átszőtt terület tartalmazza a hipofízis portális ereibe torkolló, feszíni és mély kapillárisok hálózatát. Itt történik mindazon releasing – így a GnRH –, illetve release-inhibiting hormonok szekréciója, melyek végül – a portális keringési rendszeren keresztül – elérik az adenohipofízist (Duvernoy és mtsai., 1971).

Ahogy az immunreaktív perikarionok megoszlása fajonként más és más, a hipofizeotróf GnRH axonterminálisok anatómiai vetületei is eltérnek. Például, míg patkányokban a nyúlványok zöme az *organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT)

és az EM külső zónájának vér-agy gát mentes övezetében végződik (Merchenthaler és mtsai., 1980), addig majmokban és emberben az axonok kisebb része az InfS régióján keresztül eléri a neurohipofízist is (Anthony és mtsai., 1984; King és Anthony, 1984).

1.2.2. A GnRH „pulzusgenerátor”

A GnRH neuronok anatómiai és funkcionális hálózatot alkotva szinaptikus (Witkin és Silverman, 1985) és parakrin (Lehman és Silverman, 1988) módon kommunikálnak egymással, illetve számos más idegsejttől fogadnak afferens információkat (Herbison, 1998); ez a kapcsolatrendszer „pulzusgenerátor”-ként működve felel az epizodikus GnRH szekréció kialakításáért (Knobil, 1990). A pulzatilis hormonszekréció általános jelenség, és elengedhetetlenül fontos a hormon-specifikus receptorok deszenzitizációjának megakadályozásában, és így, a célsejtek hormonérzékenységének fenntartásában. A GnRH pulzusok frekvenciája és amplitúdója kódolja a két hipofízis gonadotrop hormon szekréciós mintázatát.

A női nemi ciklus korai, follikuláris fázisára az FSH ürülését serkentő alacsonyabb frekvenciájú GnRH szekréció jellemző, az ovulációt közvetlenül megelőző szakaszban a magasabb frekvenciával ürülő GnRH az LH hiperszekrécióját eredményezi (Wildt és mtsai., 1981; Dalkin és mtsai., 1989; Marshall és Griffin, 1993; Burger és mtsai., 2002; Counis és mtsai., 2005). Bár az immortalizált GT1-7 GnRH sejtvonalon végzett vizsgálatok eredményei azt mutatják, hogy a GnRH sejt maga is rendelkezik a pulzatilis hormonürítés képességével (Krsmanovic és mtsai., 1992; Wetsel és mtsai., 1992; Vazquez-Martinez és mtsai., 2001), az epizodikus szekréció *in vivo* szabályozása jóval bonyolultabb, többszereplős folyamat. Míg *in vitro* a pulzatilis hormonszekréció hátterében az egyedi GnRH neuronok Ca^{2+}-tranziensének időben összehangolt megjelenése áll (Terasawa, 1998), *in vivo*, a GnRH idegsejtek 2 percig tartó 10 Hz-es tüzelése szükséges egy LH szekréciós pulzus kiváltásához. Meglepő módon, a GnRH neuronok szinkronizált „burst” aktivitása nem eredményez pulzatilis LH ürülést (Campos és Herbison, 2014). A GnRH szekréció végső mintázatát a keringő nemi hormonok szintje (Herbison, 1998; Petersen és mtsai., 2003), továbbá cirkadián (Christian és mtsai., 2005), szezonális (Revel és mtsai., 2009), metabolikus (Sullivan és mtsai., 2003) és egyéb szignálok alakítják ki.

A GnRH dekapeptid maga is befolyásolja saját expresszióját, feltehetően egy gátló visszacsatolás révén (Wetsel és mtsai., 1992; Vella és mtsai., 2001). Érdekes módon, a biológiailag aktív, a dekapeptidből proteolitikus hasítással létrejövő GnRH(1-5) pentapeptid viszont serkenti a GnRH kifejeződését GT1-7 sejtekben (Wu és mtsai., 2005), valamint – a pulzusok amplitúdójának növelésével – az epizodikus hormonszekréciót mind GT1-7 sejtekben, mind patkány hipotalamusz explantátumában, illetve enzimatikus emésztést követően szétoszlatott sejtjeiben (Larco és mtsai., 2014).

1.2.3. Az ösztrogének hatása a GnRH pulzusgenerátor működésére

A gonádokban termelődő nemi hormonok a hipotalamusz szintjén lévő GnRH neuronokra hatva befolyásolják a reproduktív tengely működését. Az ösztrogének hatásának közvetítéséért ligandum-függő transzkripciós faktorként működő ösztrogén receptor (ER) típusok – ER-α és ER-β – felelnek. Ezek a receptorok a promóter régió ösztrogén-válasz eleméhez (estrogen response element, ERE) kötődve befolyásolják az ösztrogén-érzékeny gének kifejeződését (Marks és mtsai., 1993; Petersen és mtsai., 1995; Pak és mtsai., 2006; Varjú és mtsai., 2009); ez az ösztrogének klasszikus, genomiális hatása, mely a GnRH szintézisét, ürülését, neuropeptid- és neurotranszmitter-termelését befolyásolja. Emellett létezik egy nem-genomiális, másodlagos hírvivő molekulákon keresztül különböző jelátviteli útvonalakat aktiváló, gyors ösztrogénszabályozás is (Genazzani és mtsai., 2005), mely többek között a GnRH neuronok elektromos aktivitására van hatással.

A feedback mechanizmusok révén történő szabályozás a nemek között eltér. Hímekben a perinatális kor egy kritikus periódusában bekövetkező tesztoszteroncsúcs ugyanis megváltoztatja a szabályozó neuronhálózat kapcsolatrendszerét (maszkulinizáció/defeminizáció) (Barraclough, 1961; Barraclough és Gorski, 1961; Gogan és mtsai., 1980). Ez a tesztoszteron, illetve az abból aromatizációval keletkező 17β-ösztradiol (E2) epigenetikus változások révén érvényesülő organizációs hatása. Az így kialakuló, (csak) hímekre jellemző idegsejtkapcsolatok működésének következményeként a tesztoszteron és az E2 folyamatosan gátolja a GnRH neuronok működését. Az E2 organizációs hatása a szexuális magatartásban is megnyilvánul, kialakítva a hímekre, illetve nőstényekre jellemző, párosodás alkalmával megjelenő viselkedésformát.

Nőstényekben a petefészkek által termelt ösztrogének szintje az ovariális ciklus során változik. A ciklus nagy része alatt – az ösztrusz, metösztrusz és diösztrusz fázisok idején – az ösztrogének kis mennyiségben vannak jelen. Ez az alacsony E2-szint gátolja a GnRH pulzusgenerátor működését (negatív feedback). A ciklus közepén, proösztrusz fázisban az E2 szintje jelentősen megnő. A kialakuló pozitív ösztrogén visszacsatolásra a GnRH neuronok megnövekedett frekvenciájú és amplitúdójú hormonszekrécióval válaszolnak (Sarkar és mtsai., 1976; Moenter és mtsai., 1990; Pau és mtsai., 1993). Ez a „GnRH-surge". Miközben a hipofizeális gonadotrop sejtek GnRH érzékenysége is fokozódik (Aiyer és mtsai., 1974; Adams és mtsai., 1981), a GnRH-surge kiváltja az adenohipofízis LH-csúcs szekrécióját („LH-surge"). A magas LH-szint hatására a petefészekben az érett tüsző megreped, és bekövetkezik az ovuláció.

Nőkben a nemi működés havi periodicitása 50 éves kor környékére megszűnik (menopauza); ekkorra a petefészkek már nem tartalmaznak érésre alkalmas tüszőt, a hormontermelés leáll. Posztmenopauzás nőkben az ösztrogén hiánya egy sor élettani változással jár; az ösztrogén célszerveinek – így a központi idegrendszernek – a működésében is zavarok jelentkezhetnek (Morrison és mtsai., 2006). Az életkor előrehaladtával nőstény rágcsálókban is megfigyelhető a reproduktív funkciók hanyatlása, azonban ennek hátterében nem a tüszők eltűnése – és az emiatt bekövetkező alacsony ösztrogénszint –, hanem valószínűleg az E2-szintek változékonysága áll.

1.3. A GnRH idegsejtek működését befolyásoló interneuronok

A reproduktív neuroendokrinológia egyik kulcskérdése a GnRH neuronokra gyakorolt pozitív és negatív ösztrogén visszacsatolás mechanizmusának megértése. Shivers és munkatársai 1983-ban kimutatták, hogy a GnRH neuronok nem képesek közvetlenül fogadni az ösztrogén szignált (Shivers és mtsai., 1983), mivel – ahogy az később bizonyítást nyert – nem expresszálják az ER-α receptort (Herbison és Theodosis, 1992; Watson és mtsai., 1992; Lehman és Karsch, 1993). Következésképpen, az ösztrogén hatása a GnRH neuronokra ösztrogén-érzékeny interneuronok közvetítésével valósulhat meg. A későbbiekben az ösztrogén receptor β izoformájának (ER-β) felfedezése (Kuiper és mtsai., 1996), és GnRH neuronokban történő detektálása (Hrabovszky és mtsai., 2000; Hrabovszky és mtsai., 2001; Kalló és mtsai., 2001; Skinner és Dufourny, 2005; Hrabovszky és mtsai., 2007) ismét

felvetette annak lehetőségét, hogy az E2 közvetlenül is képes befolyásolni a GnRH sejtek működését; mivel azonban a GnRH-specifikus ER-β-mutáns egerek zavartalan ösztrusz ciklust mutatnak és a receptor hiánya az ösztrogén negatív feedback hatását sem befolyásolja, a GnRH neuronban lévő ER-β valószínűleg nem kulcsfontosságú az ösztrogénhatás közvetítésében (Cheong és mtsai., 2014). Másrészről azonban, az ER-α-génkiütött hím és nőstény egér egyaránt szaporodásképtelen (Korach és mtsai., 1996; Wintermantel és mtsai., 2006). Vitathatatlan tehát, hogy az E2 hatásának GnRH idegsejtek felé történő továbbításában az ER-α-t kifejező interneuronok nélkülözhetetlen szerepet játszanak.

Az ösztrogén-szenzitív interneuronok közös jellemzője, hogy rendelkeznek ER-α receptorral, neuronális kapcsolatot létesítenek a GnRH neuronokkal és specifikus receptorokon keresztül kommunikálnak (Herbison, 1998; Petersen és mtsai., 2003) klasszikus neurotranszmitterek [GABA (Christian és mtsai., 2005), glutamát (Christian és mtsai., 2009)], neuromodulátorok [pl. hisztamin (Sawyer, 1955; Noris és mtsai., 1995; Fekete és mtsai., 1999)] vagy neuropeptidek [pl. NPY (Bauer-Dantoin és mtsai., 1992; Kalra és Crowley, 1992; Campbell és mtsai., 2001)] segítségével. A GnRH neuronműködés afferens szabályozásában résztvevő neuropeptidek közül a dolgozat központi témáját adó kisspeptinnel (KP) a következő fejezetben részletesen foglalkozunk.

1.4. A kisspeptin

A szaporodás agyi szabályozásában fontos szerepet játszó neuropeptidek egyik legjelentősebbike a – csupán az elmúlt évtizedben felfedezett – KP. A KP neuropeptidet a *KISS1* gén kódolja. Emberben a gén elsődleges terméke a 145 aminosav hosszúságú prepro-KP, mely különböző érési fázisokon megy keresztül. Az érett, 54 aminosavból álló KP (KP-54, más néven metastin), valamint rövidebb, de biológiailag szintén aktív C-terminális fragmentumai (KP-14, -13 és -10) a *KISS1R* gén (régebben *GPR54*) által kódolt G-fehérjéhez kapcsolt KP receptorhoz kötődnek, aktiválva azt (Kotani és mtsai., 2001; Muir és mtsai., 2001; Ohtaki és mtsai., 2001). A KP jelátviteli útvonal reprodukcióban betöltött kétségtelenül nélkülözhetetlen szerepére utal, hogy a *KISS1* (Topaloglu és mtsai., 2012), illetve a *KISS1R* (de Roux és mtsai., 2003; Seminara és mtsai., 2003) génekben bekövetkező inaktiváló mutációk emberben a részleges vagy elmaradó pubertással járó hipogonadotrop hipogonadizmust, míg az aktiváló mutációk korai serdülést (pubertas praecox) okoznak (Teles és mtsai., 2008; Silveira és mtsai., 2010). A KP/KISS1R szignalizáció evolúciósan erősen konzervált folyamat. Ezt bizonyítja, hogy *Kiss1* (d'Anglemont de Tassigny és mtsai., 2007; Lapatto és mtsai., 2007), illetve *Kiss1r* (Funes és mtsai., 2003; Seminara és mtsai., 2003) génkiütött egerek reproduktív fenotípusában az emberi hipogonadotrop hipogonadizmushoz hasonló deficit jelentkezik.

Fő hatásként, a KP erőteljesen serkeni a hipofízisben az LH, valamint az FSH elválasztását (Navarro és mtsai., 2005a; Navarro és mtsai., 2005b); ez a stimuláló hatás teljes mértékben kivédhető GnRH receptor antagonista alkalmazásával (Gottsch és mtsai., 2004; Shahab és mtsai., 2005). A KP-t termelő idegsejtek GnRH neuronokra gyakorolt hatásának közvetlen jellegét számos megfigyelés támasztja alá. Egyrészről, a KP-IR axonok kontaktust képeznek a GnRH neuronokkal (Kinoshita és mtsai., 2005; Clarkson és Herbison, 2006; Ramaswamy és mtsai., 2008; Smith és mtsai., 2008), mely utóbbiak kifejezik a *Kiss1r* génjét (Irwig és mtsai., 2004; Han és mtsai., 2005; Messager és mtsai., 2005). Másrészről, KP hatására a GnRH neuronok sejtmagi c-Fos expresszióval (Irwig és mtsai., 2004; Matsui és mtsai., 2004), valamint depolarizációval (Han és mtsai., 2005; Dumalska és mtsai., 2008; Pielecka-Fortuna és mtsai., 2008) válaszolnak. Egerekben mind a GnRH-specifikus (Novaira és mtsai., 2014), mind a globális *Kiss1r* génkiütés

terméketlenséget okoz (Kirilov és mtsai., 2013). A GnRH neuronokon belüli *Kiss1r* meghatározó szerepére döntő bizonyíték, hogy globális *Kiss1r*-génkiütött állatokban a fertilitás helyrehozható a receptor GnRH neuronokban történő szelektív kifejeztetésével (Kirilov és mtsai., 2013).

A legtöbb emlős fajban a KP-t termelő neuronoknak két fő alcsoportja létezik. Az egyik KP idegsejt-populáció a hipotalamusz preoptikus területén helyezkedik el, ahol diszkrét sejtcsoportokat lehet megfigyelni a *nucleus periventricularis anteroventralis* (AVPV), valamint a *nucleus preopticus periventricularis* (PVpo) területén, melyeket együttesen a III. agykamra rosztrális periventrikuláris területének („RP3V") nevezünk. A másik KP idegsejtcsoport a mediobazális hipotalamusz területén, a *nucleus arcuatus*ban (ARC) található (Lehman és mtsai., 2010b). Mindkét neuronpopuláció emberben is létezik, de a KP-t termelő neuronok legnagyobb sejtszámmal jellemezhető csoportja a mediobazális hipotalamusz infundibuláris területén (Inf) helyezkedik el (Rometo és mtsai., 2007; Hrabovszky, 2013), és funkcionális szempontból valószínűleg analóg populációt alkot az ARC sejtjeivel.

Bár e neuronok névadó neuropeptidje a KP, mind az RP3V, mind az ARC/Inf területén található sejtpopuláció egyéb neurotranszmittereket, neuromodulátorokat és neuropeptideket is kifejez. A különböző emlősfajok két KP neuronpopulációjának, valamint emberben az Inf területén található KP sejtcsoportnak a neurokémiai jellemzésére az 1.5., illetve az 1.6. fejezetben kerül sor.

1.5. A kisspeptin neuronok szerepe és neurokémiai tulajdonságai laboratóriumi állatokban

1.5.1. A kisspeptin neuronok ko-transzmitterei a preoptikus területen

Az RP3V területén elhelyezkedő KP neuronok felelősek valószínűleg az ösztrogén pozitív hatásának GnRH neuronokra történő közvetítéséért (Herbison, 2008). Ezt a neuronpopulációt ugyanis ösztrogén-érzékeny, ER-α-t tartalmazó idegsejtek alkotják (Franceschini és mtsai., 2006), melyek KP termelése E2 hatására nő (Oakley és mtsai., 2009). Az RP3V KP neuronpopulációt nemi dimorfizmus jellemzi: rágcsálóknál a nőstény egyedekben, ahol az ovulációt a pozitív ösztrogén visszacsatolás által kiváltott GnRH/LH-csúcs előzi meg, a KP-IR sejtek száma jelentősen meghaladja a hímekben kimutatható neuronokét (Clarkson és Herbison, 2006; Adachi és mtsai., 2007; Kauffman és mtsai., 2007). A preoptikus területen található KP neuronok közvetlenül a GnRH/LH-csúcs kialakulása előtt aktiválódnak, rágcsálókban (Adachi és mtsai., 2007; Clarkson és mtsai., 2008; Robertson és mtsai., 2009), birkában (Smith és mtsai., 2009; Hoffman és mtsai., 2011; Merkley és mtsai., 2012) és kecskében (Matsuda és mtsai., 2014) egyaránt. A következő fejezetek rövid áttekintést nyújtanak a preoptikus KP idegsejtekben kifejezett neuropeptidekről és neurotranszmitterekről.

1.5.1.1. Met-enkefalin

A III. agykamra mentén, rosztro-kaudális irányban haladva a met-enkefalint (mENK) szintetizáló neuronok a KP-IR sejtekéhez hasonló megoszlást mutatnak. Porteous és munkatársai kettős immunhisztokémiai festést alkalmazva bemutatták, hogy felnőtt nőstény egerekben a preoptikus terület AVPV régiójában lévő KP neuronok 29%-a, míg a PVpo területén találhatók 38%-a egyidejűleg mENK-t is kifejez. A mENK-IR sejtek több, mint fele – régiótól függetlenül – KP-immunpozitivitást is mutat (58% az AVPV-ben és 68% PVpo területén). A kettősen jelölődő axonok a preoptikus területen kívül az elülső hipotalamusz, valamint az ARC régiójába vetülnek (Porteous és mtsai., 2011).

1.5.1.2. Galanin

Pubertás idején a patkány GnRH-t termelő idegsejtjei galanint kezdenek expresszálni. Ez a folyamat valószínűleg fontos a reprodukciós tengely éréséhez (Rossmanith és mtsai., 1996). *In situ* hibridizációs és immunhisztokémiai kísérletek eredményei azt bizonyítják, hogy – hasonlóan a mENK-hoz –, a preoptikus területen található, további galanint kifejező sejtek egy csoportjának megoszlása részben átfed e régió KP-IR neuronjaival (Porteous és mtsai., 2011; Kalló és mtsai., 2012). Kalló és munkatársai szerint a petefészekirtott, de folyamatos ösztrogénpótlást kapó egerek RP3V KP sejtjeinek 87%-a tartalmaz galanin immunjelet, és a sejtek 38%-ában a galanin mRNS-e is detektálható (Kalló és mtsai., 2012). Porteous és munkatársai a fentieknél alacsonyabb kolokalizációs arányt figyeltek meg: a KP sejtek mindössze 7%-a, míg a galanint expresszáló neuronok 21%-a fejezte ki egyidejűleg a másik neuropeptidet is, függetlenül attól, hogy az RP3V régióján belül mely területen (AVPV vagy PVpo) helyezkedtek el a sejtek (Porteous és mtsai., 2011).

1.5.1.3. Tirozin-hidroxiláz

A katekolamin szintézis sebességmeghatározó kulcsenzime a tirozin-hidroxiláz (TH). Rágcsálókban a TH-t kifejező neuronok a preoptikus KP sejtekéhez hasonló szexuális dimorfizmust mutatnak (Kauffman és mtsai., 2007; Clarkson és Herbison, 2011). Kolokalizációs tanulmányok eredményei szerint, nőstény patkányokban az RP3V KP neuronjainak 20-50%-a fejezi ki a TH mRNS-ét, a hormonális állapot függvényében (Kauffman és mtsai., 2007). Nőstény egerekben ez az arány megközelítőleg 50%, és hasonló a KP-t is tartalmazó TH-IR idegsejtek aránya is – függetlenül attól, hogy az egyedek az ösztrusz ciklus mely fázisában vannak. Valószínűleg ezek a TH-t is tartalmazó KP rostok jelentik a dopamin fő forrását is a GnRH neuronok dopamin általi szinaptikus szabályozásában (Clarkson és Herbison, 2011).

1.5.1.4. GABA és glutamát

Kettős *in situ* hibridizációs tanulmányok eredményei szerint az AVPV régiójában lévő KP neuronok kb. 20%-a kifejezi a 2. típusú vezikuláris glutamát transzportert (vGluT2) mint a glutamáterg fenotípus általánosan elfogadott markerét. A sejtek 75%-a viszont GABAerg fenotípust mutat, és a glutaminsav derkarboxilázt (GAD-67) expresszálja (Cravo és mtsai., 2011). Tehát az AVPV területén található, KP-t szintetizáló idegsejtek – a neuropeptidek és a dopamin mellett – aminosav-transzmitterek segítségével is kommunikálnak.

1.5.2. A kisspeptin idegsejtek ko-transzmitterei a *nucleus arcuatus* területén: a „KNDy neuronok”

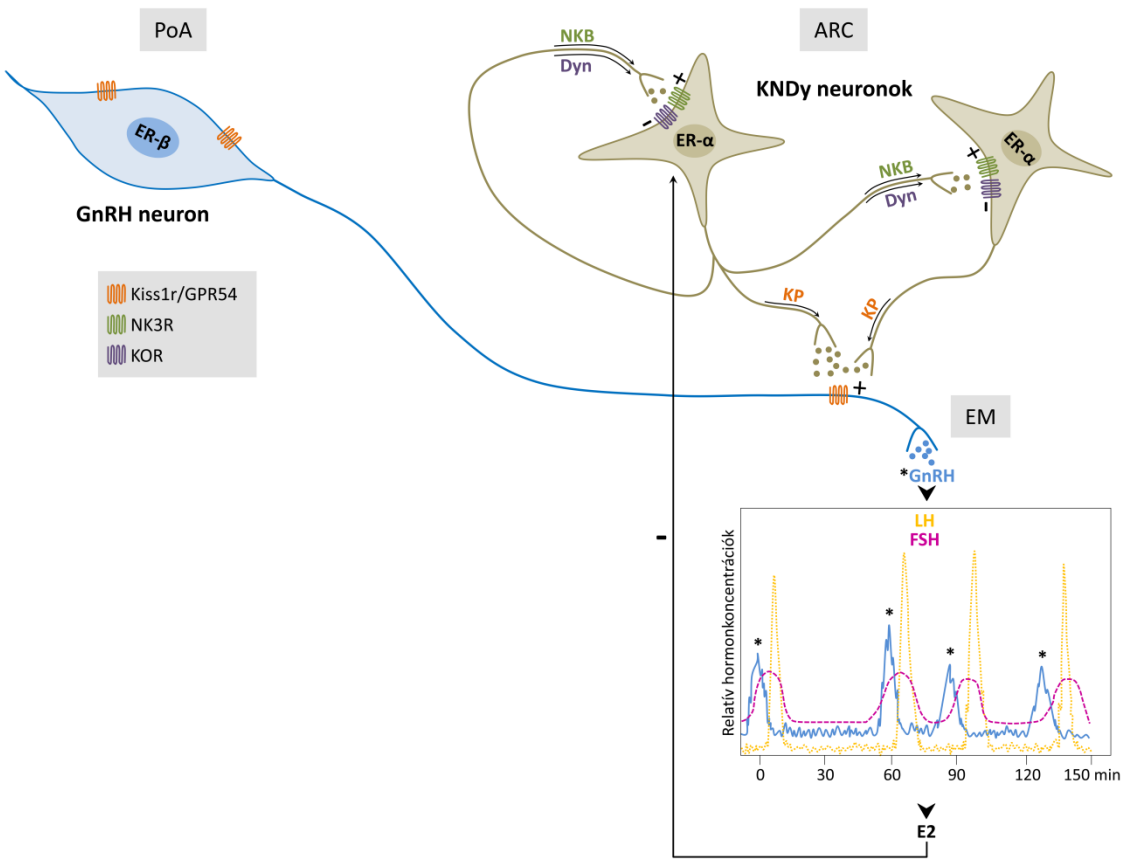
A hipotalamusz preoptikus területén elhelyezkedő KP neuronokhoz hasonlóan az ARC KP-t termelő idegsejtjei is kifejezik az ER-α-t (Franceschini és mtsai., 2006), viszont az E2 – a preoptikus KP neuronokra gyakorolt hatásával ellentétben – ezekben az idegsejtekben gátolja a KP expresszióját (Oakley és mtsai., 2009). Számos emlősfajban az ARC-beli KP neuronok egyidejűleg két másik neuropeptidet, neurokinin B-t (NKB) és dinorfint (Dyn) is kifejeznek (Burke és mtsai., 2006; Foradori és mtsai., 2006; Goodman és mtsai., 2007; Navarro és mtsai., 2011b; Bartzen-Sprauer és mtsai., 2014). E három neuropeptid (KP, NKB, Dyn) együttes jelenléte alapján ezeket az idegsejteket „KNDy” neuronoknak nevezzük (Lehman és mtsai., 2010a). Ez a terminológia széles körben használatos, annak ellenére, hogy mára már világossá vált, hogy az említett neuropeptideket termelő idegsejtek nem alkotnak neurokémiailag homogén populációt, és a KNDy peptidek egy neuronban való egy időben történő kifejeződésének aránya csak részleges (Cheng és mtsai., 2010; Hrabovszky és mtsai., 2010; Hrabovszky és mtsai., 2011; Hrabovszky és mtsai., 2012; Overgaard és mtsai., 2014); a kolokalizáció mértéke nemtől, fajtól, valamint hormonális állapottól erősen függhet. Vitathatatlan azonban, hogy a KNDy neuronok funkcionális kapcsolatban állnak egymással: a KNDy sejtek egymással folytatott intenzív kommunikációját morfológiai és elektrofiziológiai bizonyítékok is alátámasztják (Burke és mtsai., 2006; Foradori és mtsai., 2006; Goodman és mtsai.,

2007; Navarro és mtsai., 2011a; Navarro és mtsai., 2011b; de Croft és mtsai., 2013; Ruka és mtsai., 2013).

A fent említett sejtek közötti kommunikáció, valamint az egyedi KNDy neuronok autoregulációja valószínűleg az NKB/neurokinin-3 receptor (NK3R), valamint a Dyn/κ-opioid receptor (KOR) jelátviteli útvonalakon keresztül zajlik. Az NKB serkentő és a Dyn gátló hatásának eredményeképpen alakul ki a KNDy neuronok által a GnRH idegsejtek felé közvetített végső kimeneti információ. A GnRH neuronok aktivációja a KP/Kiss1r jelátviteli úton keresztül valószínűleg nélkülözhetetlen szerepet játszik az epizodikus hormonszekrécióban, azaz a GnRH/LH pulzusok kialakításában (Navarro és mtsai., 2009; Ohkura és mtsai., 2009; Wakabayashi és mtsai., 2010). (**2. ábra**)

A pulzusgenerálás mellett a KNDy sejtek felelősek valószínűleg a nemi hormonok negatív hatásának GnRH neuronok felé történő közvetítéséért. Nőstény patkányokban ugyanis a petefészek-eltávolítást követő LH-szint emelkedése kivédhető a KNDy neuronok kiirtásával (Mittelman-Smith és mtsai., 2012). Birkában és főemlősökben azonban az ARC területe lehet a színhelye a pozitív ösztrogén feedbacknek is: petefészekirtott birkákban a KNDy sejtek ösztradiol hatására c-Fos expresszióval válaszolnak (Smith és mtsai., 2009), míg nőstény rhesusmajmokban a mediobazális hipotalamusz rosztrálisabb területektől való elválasztása esetén is fennmarad az ösztrogén pozitív feedback hatásának következtében kialakuló LH- és FSH-csúcs (Krey és mtsai., 1975; Plant és mtsai., 1979).

A preoptikus régióban elhelyezkedő KP neuronokhoz hasonlóan az ARC területének KP-t termelő idegsejtjei a KNDy peptideken kívül más neuropeptideket, neuropeptid-receptorokat és neurotranszmittereket is kifejeznek. Az alábbiakban ezeket foglaljuk össze.



2. ábra: A KNDy neuronok szerepe a GnRH pulzusok kialakításában. A KNDy sejtek közötti kommunikáció, valamint az egyedi KNDy neuronok autoregulációja valószínűleg az NKB/NK3R és a Dyn/KOR jelátviteli útvonalakon keresztül zajlik. Az NKB serkentő és a Dyn gátló hatásának eredményeképpen alakul ki a KNDy neuronok által a GnRH idegsejtek felé közvetített végső kimeneti információ, mely valószínűleg fontos szerepet játszik a pulzatilis GnRH szekréció szabályozásában. Az ábrát Navarro és munkatársai (Navarro és mtsai., 2009) nyomán a szerző módosította.

1.5.2.1. A neurokinin B és receptora

Az NKB reprodukcióban betöltött nélkülözhetetlen szerepére a peptidet, valamint annak receptorát (NK3R) kódoló génekben (*TAC3*, illetve *TAC3R*) bekövetkezett mutációk hatásának vizsgálata derített fényt (Lasaga és Debeljuk, 2011): emberben mind a *TAC3*, mind a *TAC3R* génekben bekövetkező defektus – a KP/KISS1R jelátvitel hiányakor fellépő fenotípushoz hasonló – hipogonadotrop hipogonadizmust okoz (Guran és mtsai., 2009; Topaloglu és mtsai., 2009). A legtöbb laboratóriumi emlősfajban az ARC/Inf területén található KP sejtek jelentős része NKB-t és NK3R-t is kifejez, bár a kolokalizáció mértéke erősen függ az adott fajtól, annak nemétől és korától (Burke és mtsai., 2006; Goodman és mtsai., 2007; Navarro és mtsai., 2009; Amstalden és mtsai., 2010; Cheng és mtsai., 2010; Ramaswamy és mtsai., 2010; Wakabayashi és mtsai., 2010; Hrabovszky és mtsai., 2011; Navarro és mtsai., 2011b; Hrabovszky és mtsai., 2012; Overgaard és mtsai., 2014). Petefészekirtott egerekben például a KP neuronok 90%-a fejezi ki egyidejűleg az NKB mRNS-ét (*Tac2*), és megközelítőleg az összes KP sejt az NK3R (*Tac3r*) génjét is expresszálja. Ösztradiolpótlás hatására azonban a két neuropeptidet ko-szintetizáló neuronok aránya 53%-ra csökken, valamint az *Tac3r* KP sejtekben való kifejeződése is erőteljesen gátlódik (Navarro és mtsai., 2009). Hímekben a *Tac2* mRNS-t expresszáló sejtek csupán fele fejezi ki a *Kiss1* mRNS-t is – hereirtott, illetve tesztoszteronpótlást kapó egyedekben egyaránt (Navarro és mtsai., 2011b). A változó kolokalizációs arányok hátterében az ösztradiol (Navarro és mtsai., 2009) és a tesztoszteron *Tac2*, illetve *Tac3r* gének expressziójára gyakorolt negatív hatása állhat (Navarro és mtsai., 2011b). A nemi hormonok által gátolt génexpresszió csökkent mértékű NKB/NK3R jelátvitelhez vezet, melynek következtében az ARC területén található KNDy sejtek aktivitása is lecsökken. Az egerekhez hasonlóan, a hereirtott patkányokban is igen jelentős csoportot alkotnak az ARC kaudális területén elhelyezkedő, csak NKB-t kifejező idegsejtek (Overgaard és mtsai., 2014). Bár az EM területén egyszeresen jelölt NKB-IR axonok megfigyelhetők nőstény patkányokban is (True és mtsai., 2011), a kizárólag NKB immunjelet tartalmazó idegsejt-populáció petefészekirtott egyedekben nem detektálható (Overgaard és mtsai., 2014).

A rágcsálókban leírt kolokalizációs tanulmányok eredményeivel ellentétben, újszülött korban hereirtáson átesett, felnőtt hím majmokban az ARC területén

található KP neuronok csupán 40-60%-a tartalmaz NKB immunjelet is, és csak NKB neuropeptidet kifejező, egyes-jelölt idegsejtek nem figyelhetők meg (Ramaswamy és mtsai., 2010).

Bár morfológiai vizsgálatok eredményei szerint a KNDy neuronokon csupán két tachykinin receptor, az NK1R és az NK3R van jelen (Navarro és mtsai., 2014), hím egereken végzett elektrofiziológiai vizsgálatok azt bizonyítják, hogy az NKB az ARC-beli KP sejtekre gyakorolt serkentő hatását mindhárom tachykinin receptor (NK1R, NK2R, NK3R) együttes aktiválásán keresztül fejti ki (de Croft és mtsai., 2013). Ezzel szemben, petefészekirtott kecskékben az NKB hatásának közvetítéséért valószínűleg egyedül az NK3R felelős (Yamamura és mtsai., 2014).

1.5.2.2. A dinorfin és receptora

A dinorfin – a harmadik KNDy peptid – a *Pdyn* gén terméke. Előfordulását az ARC területén elhelyezkedő, KP-t és NKB-t szintetizáló neuronokban elsőként birkákban írták le: petefészekirtott, majd ösztrogénpótlásban részesített nőstényekben a Dyn-t expresszáló sejtek 95%-a KP-t is kifejez (Goodman és mtsai., 2007). A KP és Dyn neuropeptidek közötti kolokalizáció aránya – hormonális állapottól függetlenül – nőstény egerekben is 90% fölötti (Navarro és mtsai., 2009). *In situ* hibridizációs kísérletek eredményei pedig azt mutatják, hogy a KP neuronok egy kisebb csoportja a Dyn receptorát, a KOR-t is kifejezi, hím és nőstény egerekben egyaránt (Navarro és mtsai., 2009).

1.5.2.3. Galanin

Egerekben a KP neuronok nem csak az RP3V régiójában (Porteous és mtsai., 2011; Kalló és mtsai., 2012), hanem a ARC területén is expresszálják a galanint: petefészekirtott nőstényekben a KP idegsejtek 42,5%-ában volt detektálható a galanin mRNS-e, miközben a neuronok 12,5%-a immunhisztokémiai vizsgálatokban galanin-immunpozitivitást is mutatott (Kalló és mtsai., 2012).

1.5.2.4. GABA és glutamát

Hasonlóan a preoptikus régióban elhelyezkedő KP-t termelő idegsejtekhez, az ARC KP neuronjai is használnak aminosav ko-transzmittereket egymással, illetve más idegsejtekkel folytatott kommunikációjukhoz. *In situ* hibridizációs vizsgálatok eredményei azt mutatják, hogy ezen sejtek alcsoportjaiban mind vGluT2, mind GAD-67 mRNS előfordul (Cravo és mtsai., 2011). Azonban – az AVPV területén elhelyezkedő, főleg GABAerg KP idegsejtekkel ellentétben –, a KNDy neuronok többsége glutamáterg fenotípust mutat (Cravo és mtsai., 2011). A vGluT2 jelenlétét NKB/Dyn neuronokban immunhisztokémiai módszerekkel is kimutatták, hím és nőstény patkányokban egyaránt (Ciofi és mtsai., 2006).

1.6. Az emberi kisspeptin neuronok neurokémiai tulajdonságai

Ahogy az már az 1.4. fejezetben említésre került, emberben is létezik a laboratóriumi állatokban megfigyelt, KP-t szintetizáló mindkét neuronpopuláció, bár a preoptikus területen elhelyezkedő KP idegsejtek neurokémiai jellemzőiről nincsenek adataink. Az emberi reprodukció szabályozásában valószínűleg meghatározó szereppel bíró, infundibuláris régióban található KP sejtpopuláció neurokémiai karakterét ugyanakkor – laboratóriumunk immunhisztokémiai vizsgálatainak köszönhetően – részben már ismerjük. Az Inf területén elhelyezkedő humán KP idegsejtek neuropeptid-fenotípusát az alábbiakban foglaljuk össze.

1.6.1. Neurokinin B ko-expresszió

A laboratóriumi állatok ARC KP sejtjeihez hasonlóan, az Inf régiójában lévő humán KP neuronok is szintetizálnak NKB-t (Hrabovszky és mtsai., 2010) – és fordítva. Az immunhisztokémiával kimutatható sejtek előfordulási gyakorisága, illetve a neuropeptid ko-expresszió mértéke azonban nagymértékben függ az egyedek nemétől (Hrabovszky és mtsai., 2011) (**3. ábra, A és B**), valamint életkorától (Molnár és mtsai., 2012). Míg az NKB-t is expresszáló KP neuronok előfordulási gyakorisága hasonlóan magas a különböző nemű és korú egyedek esetében (71-78%), a KP-t is kifejező NKB-IR idegsejtek aránya posztmenopauzás nőkben magas (84%) (**3. ábra, A**), idős – 50 év feletti – férfiakban valamivel alacsonyabb (68%) (**3. ábra, B**), és fiatal férfiakban mindössze 36% (Hrabovszky, 2013). Az eltérő mértékű kolokalizáció valószínű oka a KP-szintézis erőteljes függése a nemi hormonok jelenlététől/hiányától. Fiatal férfiakban a magas tesztoszteronszint jelenléte és annak KP-szintézisre gyakorolt negatív hatása miatt a KP kifejeződése jelentős gátlás alatt állhat. Ezzel szemben, idősebb korban a folyamatosan gyengülő negatív visszacsatolás (csökkenő tesztoszteronszint) miatt az NKB neuronok KP-expressziójának mértéke megnőhet. Ezzel a magyarázattal összhangban áll, hogy posztmenopauzás nők esetében – ahol az ösztrogén hiánya miatt annak gátló hatása teljesen megszűnik – figyelhető meg az NKB idegsejtekben a legmagasabb KP-expresszió. Érdemes megjegyezni azonban, hogy az Inf területén található rostok legnagyobb része mindhárom modellben egyszeresen jelölődő KP-,

vagy NKB-IR axon, és a GnRH neuronokkal kontaktust képező, neuropeptid kolokalizációt mutató rostok aránya is igen alacsony: fiatal férfiaknál 8-10%, de posztmenopauzás női mintákban is csupán 25-30% (Hrabovszky és mtsai., 2011; Molnár és mtsai., 2012).

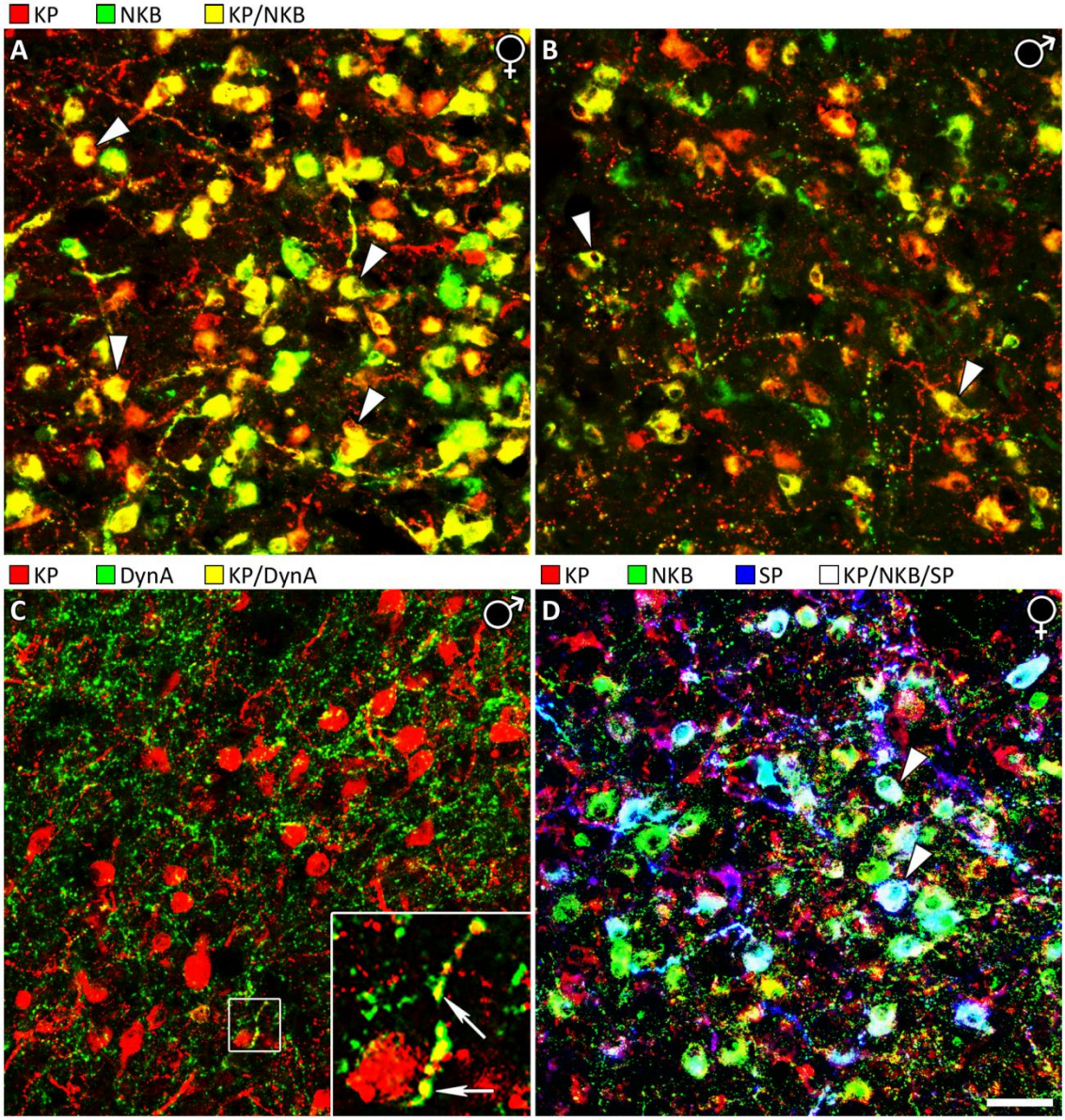
1.6.2. Dinorfin ko-expresszió

In situ hibridizációs kísérletek eredményei azt bizonyítják, hogy – hasonlóan a KP-t és NKB-t szintetizáló neuronokhoz – menopauza után az Inf területén lévő Dyn-t expresszáló sejtek hipertrofizálnak (Rometo és Rance, 2008), azaz posztmenopauzás nőkben a sejtek, illetve sejtmagok mérete növekszik. Noha a Dyn sejtek, valamint a KP és NKB neuronok menopauza során bekövetkező morfológiai átalakulása közti hasonlóság szembetűnő, továbbá a laboratóriumi állatokon végzett vizsgálatok eredményeit alapul véve a három neuropeptid kolokalizációja feltételezhető, emberben e neuronok mégsem alkotnak egyetlen egységes sejtpopulációt. Laboratóriumunk korábbi vizsgálataiból úgy tűnik, hogy Dyn jel nem mutatható ki a humán KP, illetve NKB neuronok perikarionjaiban, és a KP-IR axon varikozitásokban is csak elvétve detektálható (Hrabovszky és mtsai., 2012) (**3. ábra, C**). Az emberi szövetmintákon tett megfigyelések tehát éles ellentétben állnak a laboratóriumi állatok esetében tapasztaltakkal, ráirányítva a figyelmet a lehetséges faji különbségekre is. Így a „KNDy neuron” terminológia emberi KP és NKB neuronok jelölésére csak bizonyos fenntartással használható.

1.6.3. Subtance P ko-expresszió

Az NKB mellett egy másik, a tachykininek családjába tartozó, a *TAC1* gén által kódolt peptid, a subtance P (SP), mely főként az NK1R tachykinin receptoron keresztül fejti ki hatását. Egy Rance és munkatársai által végzett *in situ* hibridizációs tanulmány szerint a *TAC1* és a *TAC3* expressziója menopauza után jelentősen megnő, és a két mRNS infundibuláris területen való megoszlása részben átfed (Rance és Young, 1991). A SP és NKB, illetve a KP sejtek Inf régióban való hasonló megoszlását laboratóriumunkban végzett immunhisztokémiai vizsgálatok peptid

szinten is megerősítették (Hrabovszky és mtsai., 2013). Ráadásul posztmenopauzás nőkben a SP neuronok száma és immunfestődésük intenzitása – a KP sejtekéhez hasonlóan – meghaladta az idős férfiakban megfigyelteket (Hrabovszky és mtsai., 2013). A hármas immunfluoreszcens vizsgálatok eredményeinek tanúsága szerint a KP és NKB neuronok jelentős része SP neuropeptidet is kifejez (**3. ábra, D**) – hasonló neuropeptid-fenotípust laboratóriumi állatokban eddig még nem figyeltek meg. Az emberi KP sejtek 31%-a és NKB neuronok 25%-a tartalmazott SP jelet, míg az észlelt neuronok 16,5%-a egyidejűleg mindhárom neuropeptidet expresszálta (Hrabovszky és mtsai., 2013). A kettős és hármas immunpozitivitást mutató axonok nem csak az Inf régiójában, hanem a hipofízis felé futó rostok között, a nyél (InfS) területén is detektálhatóak voltak, felvetve annak lehetőségét, hogy a három neuropeptid együttesen ürül a hipofízis portális keringési rendszerébe. Ezek az anatómiai megfigyelések arra engednek következtetni, hogy a SP – valószínűleg autokrin és/vagy parakrin módon – képes szabályozni a KP, illetve az NKB szekrécióját.



3. ábra: Az emberi hipotalamusz infundibuláris régiójában elhelyezkedő kisspeptin neuronok neuropeptid-fenotípusa. Emberben, vélhetően az ösztrogén negatív hatásának megszűnése miatt posztmenopauzás nőkben a legmagasabb a KP-t és NKB-t termelő neuronok száma az infundibuláris régióban (**A**). Idős férfiakban, mivel a tesztoszteron termelődése az életkor előrehaladtával csak gyengül, de nem szűnik meg (így a negatív visszacsatolás megmarad), alacsonyabb KP és NKB sejtszám tapasztalható (**B**). A két neuropeptid egy neuronban való együttes előfordulásának (nyílhegyek) aránya is magasabb nőkben, mint férfiakban (vö. **A** és **B**). A laboratóriumi állatokkal ellentétben, emberben a KP neuronok legnagyobb része nem expresszálja a harmadik KNDy peptidet, a dinorfint (**C**); a kolokalizáció többnyire csak az axonok szintjén, elvétve detektálható (nyilak a kinagyított képkockán). Posztmenopauzás nőkben a KP-t és NKB-t termelő idegsejtek viszont gyakran SP-t is kifejeznek – hasonló fenotípust laboratóriumi állatokban eddig még nem írtak le. A **D** képen a nyílhegyekkel megjelölt sejttestek mindhárom neuropeptidet kifejezik. Lépték: **A**-**D**: 40 µm, **C** kinagyított képkocka: 10 µm

2. Célkitűzés

1. Fő célkitűzésünk az emberi hipotalamusz KP-t és NKB-t kifejező neuronjainak további neurokémiai karakterizálása és ko-transzmitter-fenotípusuk meghatározása volt. Kísérleteinket *post mortem* emberi hipotalamusz szövetmintákon végeztük, immunhisztokémiai módszerek segítségével. Munkánk során kiemelt figyelmet fordítottunk az ember és a laboratóriumi állatok között megfigyelt faji különbségekre, hiszen – a szaporodás finomszabályozásának eltérő volta miatt – a laboratóriumi állatokon végzett kísérletek eredményeiből származó ismereteink csak részben vonatkoztathatók emberre, és használhatók fel a humán szaporodásbiológiai kérdések megoldására. Reményeink szerint a KP-t és NKB-t kifejező idegsejtek neuropeptid-tartalmáról nyert információk közelebb vihetnek az emberi szaporodás agyi szabályozásának megértéséhez.

2. További célunk a KP-t és NKB-t kifejező neuronok kapcsolatrendszerének feltárása volt, különös tekintettel a hipotalamikus jeleket integráló GnRH neuronokon képzett axo-szomatikus és axo-dendritikus bemenetekre.

3. Ugyancsak anatómiai megközelítést használva, végül felvetettük a KP-t, NKB-t és SP-t tartalmazó idegsejtek lehetséges axo-axonális kapcsolatait GnRH neuronokkal, az utóbbiak hipofizeotróf axonvetületei mentén.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Humán szövetminták

A humán hipotalamusz minták igazságügyi boncolásokból származtak. A minták gyűjtését a Debreceni Egyetem Igazságügyi Orvostani Intézet munkatársai végezték. A személyes adatok anonimek voltak, a neurológiai és endokrin kórtörténet egyik személy esetében sem volt ismert. Minden esetben jellemző volt azonban a hirtelen bekövetkező halál és a kevesebb, mint 48 óra *post mortem* idő.

Az emberi szövetmintákon végzett kísérletek a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Tudományos Bizottságának Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottságának engedélye (DEOEC RKEB/IKEB: 3183-2010) alapján, valamint a hatályban lévő magyar törvény (1997 CLIV és 18/1998/XII.27. EU¨M rendelet) szerint folytak.

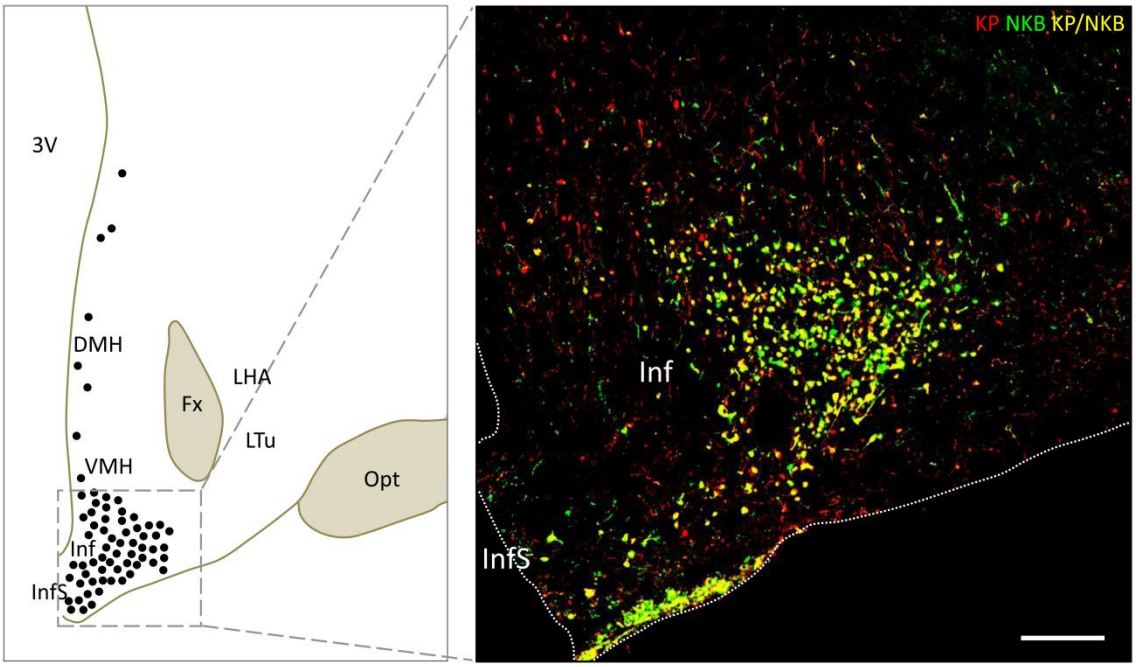
3.2. Szövettani metszetek

A kimetszett hipotalamikus szövetblokkokat boncolást követően az Igazságügyi Orvostani Intézetben dolgozó kollaborátoraink csapvízzel leöblítették, majd 4%-os formaldehid oldatban (0,1 M PBS oldatban, pH=7,4) 7-14 napig tárolták 4 °C-on. A szövetek további feldolgozása az MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézetének laboratóriumában történt. A fixált minták méretét tovább csökkentettük a következő segédmetszésekkel: frontális síkú metszések a *chiasma opticumtól* rosztrálisan és a *corpus mamillarétól* kaudálisan, horizontális metszés a *commissura anteriortól* dorzálisan (Hrabovszky és mtsai., 2007). Ezt követően mindkét oldalon a mediánszagittális síktól 2 cm-re szagittális metszéseket ejtettünk, majd az így kapott blokkokat a középvonalban félbe vágtuk és 20%-os szacharóz oldattal itattuk át 5 napig 4 °C-on.

A féloldali hipotalamusz blokkot „Jung" szövetfagyasztó médiummal (1:1 arányban 0,9%-os NaCl oldattal; Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Németország) körbevettük, majd porított szárazjégen lefagyasztottuk. Ezt követően Leica SM 2000R típusú fagyasztó mikrotómmal (Leica Microsystems Nussloch GmbH)

30 µm vastag koronális metszeteket készítettünk. A metszeteket ezután fagyálló oldatban (30% etilén-glikol, 20% glicerin és 0,05 M, pH=7,4 foszfát puffer oldata) tároltuk -20 °C-on.

Az immunhisztokémiai kísérletek során az egyes emberek jobb oldali hipotalamuszmintáiból az infundibuláris mag hátsó régiójából származó metszetek kerültek feldolgozásra, mivel a KP sejttestek száma itt a legmagasabb (Hrabovszky, 2013) (**4. ábra**). Az immunhisztokémai jelölés előtt a metszeteket a krioprotektív oldatból kivéve 2x5 percig PBS-ben öblítettük, és 20 percig 0,2% Triton X-100-at és 0,5% hidrogén-peroxidot (H_2O_2) tartalmazó PBS-oldatban szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az antigének jobb feltárásának érdekében ezután a szeleteket 3x5 perces PBS-ben történő mosást követően 0,1 M citrát pufferben (pH=6,0) 80 °C-on 30 percig inkubáltuk. Azért, hogy a nem-specifikus antitestkötődést elkerüljük, a mintákat 2% normál lószérumban (NHS, normal horse serum) 20 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten.



4. ábra: Posztmenopauzás nő hátsó Inf régiójának sematikus ábrája koronális metszeten és az ugyanerről a régióról készített reprezentatív fluoreszcens rétegfelvétel. Rövidítések: 3V: III. agykamra; DMH: *nucleus dorsomedialis hypothalamicus*; VMH: *nucleus ventromedialis hypothalamicus*; LHA: *area hypothalamica lateralis*; Ltu: *nucleus tuberalis lateralis*; Fx: *fornix*; Opt: *tractus opticus*; Inf: *nucleus infundibularis*; InfS: „infundibular stalk", *infundibulum*. Lépték: 300 µm

3.3. Fénymikroszkópos immunhisztokémia

A kísérleteink során az ellenanyagokat 2% NHS-t és 0,2% nátrium-azidot tartalmazó egyszeres PBS-oldatban, a táblázatban (**5. ábra**) található hígításnak megfelelően alkalmaztuk.

A fluoreszcens immunhisztokémiai jelölésnél a mintákat az elsődleges (primer) ellenanyago(ka)t tartalmazó oldatban 4 ^{o}C-on 48 óráig inkubáltuk. Ezt 3x5 percig tartó PBS-ben történő mosás követte, majd a metszeteket másodlagos (szekunder) antitesteket tartalmazó oldatba helyeztük, ahol 5 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az immunjelölés után az úsztatott mintákat 0,1 M Tris-HCl pufferoldatból (pH=7,6) tárgylemezre húztuk fel ecsettel, majd Mowiollal lefedtük.

A peroxidáz-kimutatáson alapuló immunhisztokémiai jelölésnél a szeleteket 4 ^{o}C-on 48 óráig inkubáltuk a primer ellenanyagot tartalmazó oldatban, majd a 3x5 perces PBS-ben való öblítést követően azokat az elsődleges ellenanyag gyártására használt faj ellen termeltetett, biotinnal konjugált másodlagos ellenanyaggal reagáltattuk. Szobahőmérsékleten 1 órán át végzett inkubálás után a metszeteket 3x5 percig PBS-ben öblítettük, majd avidin-biotin-peroxidáz komplexet (ABC, avidin-biotin-peroxidase complex; Vector, Burlingame, Kalifornia, USA) tartalmazó 0,1 M Tris-HCl oldatban inkubáltuk (1:1000 hígításban, szobahőmérsékleten, 1 órán keresztül). Ezt követően a metszeteket 3x5 percig mostuk PBS-ben. A peroxidáz jelet 0,005% H_2O_2 jelenlétében 0,2 mg/ml diaminobenzidint (DAB), vagy a 0,5 mg/ml DAB és 0,005% H_2O_2 mellett 0,15% nikkel-ammónium-szulfátot is tartalmazó 0,1 M Tris-HCl oldat („Ni-DAB”) segítségével tettük láthatóvá. A metszeteket ezután PBS-ben, illetve a nikkel-ammónium-szulfát tartalmú oldat használata esetén – mivel a nikkel jel PBS oldatban nem stabil – Tris-HCl pufferoldatban öblítettük. Immunhisztokémiai kettős jelölés alkalmazása esetén a Ni-DAB festést a jelet erősítő és stabilizáló ezüst/arany intenzifikáció követte („ezüstözés”). Ehhez a metszeteket 4x5 percig 2% nátrium-acetát oldatban öblítettük, majd az 5% nátrium-karbonátot és formalinos Gallyas-féle előhívószert egyenlő arányban tartalmazó, előzőleg -20 ^{o}C-ra hűtött oldatba helyeztük. A reakciót 50-120 másodpercet követően 0,5% ecetsavval állítottuk le, majd a metszeteket 2x5 percig 2% nátrium-acetát oldatban mostuk. A 2x5 percig tartó 0,05% arany-klorid oldatban történő inkubálást követően a mintákat újra 2% nátrium-acetát oldatban öblítettük. Ezt 2x5 perc 3% nátrium-tioszulfát oldatban való inkubálás követte, mely után megismételtük az előbbi mosási lépést.

3.4. Ellenanyagok

Az immunhisztokémiai kísérletek során általunk használt elsődleges és másodlagos ellenanyagokat, az immunizált állatfajt, valamint a forrást, illetve referenciákat táblázatban foglaltuk össze (**5. ábra**).

Az általunk használt összes másodlagos antitestet szamárban termeltették (Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, Pennsylvania, USA). A többszörös immunjelölést alkalmazó kísérleteinkben a másodlagos ellenanyagok egymással való keresztreagálásának lehetőségét valamelyik primer ellenanyag használatának elhagyásával zártuk ki. A használt elsődleges ellenanyagok specificitásának megerősítésére, vagyis annak kizárására, hogy a látott fluoreszcens jel műtermék, kontroll kísérleteket végeztünk.

	Ellenanyag	Termeltetve	Hígítás		Forrás/referencia
			fluoreszcens kimutatáshoz	peroxidáz alapú kimutatáshoz	
ELSŐDLEGES	anti-AGRP	tengerimalac	1:1000		GP-029-50; Biosensis Pty. Ltd.
	anti-αMSH	birka	1:5000		J. Tatro (Elias és mtsai., 1998b)
	anti-CART	nyúl	1:1000		M.J. Kuhar (Koylu és mtsai., 1997)
	anti-CART	egér	1:1000		J.T. Clausen (Vrang és mtsai., 1999)
	anti-CCK	nyúl	1:30 000		IS-15/8 (Ciofi és mtsai., 1990)
	anti-sertés/humán Dyn A	nyúl	1:1000		T-4268; Peninsula Laboratories
	anti-Dyn B	nyúl	1:1000		IS-35 (Ciofi és mtsai., 2006)
	anti-GAL	kecske	1:1000		EB09679; Everest Biotech Ltd.
	anti-GnRH	tengerimalac	1:5000	1:50 000	#1018 (Hrabovszky és mtsai., 2011)
	anti-humán KP	birka	1:1000	1:150 000	GQ2 (Dhillo és mtsai., 2005)
	anti-humán preproKP	nyúl	1:1000		AAS26420C; Antibody Verify
	anti-humán preproKP	nyúl	1:1000		AAS27420C; Antibody Verify
	anti-mENK	nyúl	1:250		IS-30 (Magoul és mtsai., 1993; Covenas és mtsai., 2004)
	anti-humán NKB	egér	1:3000	1:50 000	M-871-100; Biosensis Pty. Ltd.
	anti-humán proNKB	nyúl	1:1000	1:100 000	IS-681; IS-682 (Hrabovszky és mtsai., 2010)
	anti-NPY	birka	1:10 000		FJL no.14/3A; Merchenthaler István (Wittmann és mtsai., 2002)
	anti-NT	patkány	1:1000		IS-RNT (Porteous és mtsai., 2011)
	anti-pENK	kecske	1:1000		EB08195; Everest Biotech Ltd.
	anti-SP	patkány	1:3000	1:30 000	8450-0505; AbD Serotec
	anti-SP	nyúl	1:1000	1:150 000	505D3; Petrusz Péter (Conti és mtsai., 1992)
	anti-SS	tengerimalac	1:1000		IS 7/51 (Ciofi és mtsai., 2006)
	anti-TH	csirke	1:1000		TYH; Aves Laboratories
MÁSODLAGOS	AMCA-konjugált anti-*x*	szamár	1:50		Jackson Immuno Research Lab.
	biotin-konjugált anti-*x*	szamár	1:500		Jackson Immuno Research Lab.
	Cy3-konjugált anti-*x*	szamár	1:1000		Jackson Immuno Research Lab.
	Cy5-konjugált anti-*x*	szamár	1:500		Jackson Immuno Research Lab.
	FITC-konjugált anti-*x*	szamár	1:250		Jackson Immuno Research Lab.
	peroxidáz-konjugált anti-*x*	szamár	1:250		Jackson Immuno Research Lab.

5. ábra: Az immunhisztokémiai kísérletek során alkalmazott ellenanyagok. A táblázat oszlopai (sorrendben) az ellenanyagok nevét, az immunizált állatfajt, az immunhisztokémiai kísérletek során alkalmazott hígítást, valamint a forrást/referenciát tartalmazza.

3.5. Ellenanyag-specificitási kontrollok

Az anti-KP elsődleges ellenanyagunkat a KP-54 peptid ellen termeltetették birkában. Olyan poliklonális antiszérum (GQ2), mely felismeri a teljes hosszúságú KP-54 fehérjét, valamint a biológiailag szintén aktív hasítási termékeket, a KP-14 és a KP-10-et. Az ellenanyag radioimmunassay-el tesztelve nem mutat keresztreakciót (<0,01%) más RF-amid peptiddel (pl. prolaktin-releasing peptid, neuropeptid FF, neuropeptid AF és RF-amid related peptidek: RFRP1, RFRP2, RFRP3) (Dhillo és mtsai., 2005). A GQ2 antiszérumot más immunhisztokémiai tanulmányokban is sikeresen használták a KP detektálására rhesusmajomban (Ramaswamy és mtsai., 2008; Ramaswamy és mtsai., 2010) és emberben (Hrabovszky és mtsai., 2010; Hrabovszky és mtsai., 2011; Hrabovszky és mtsai., 2012; Molnár és mtsai., 2012; Hrabovszky és mtsai., 2013) egyaránt.

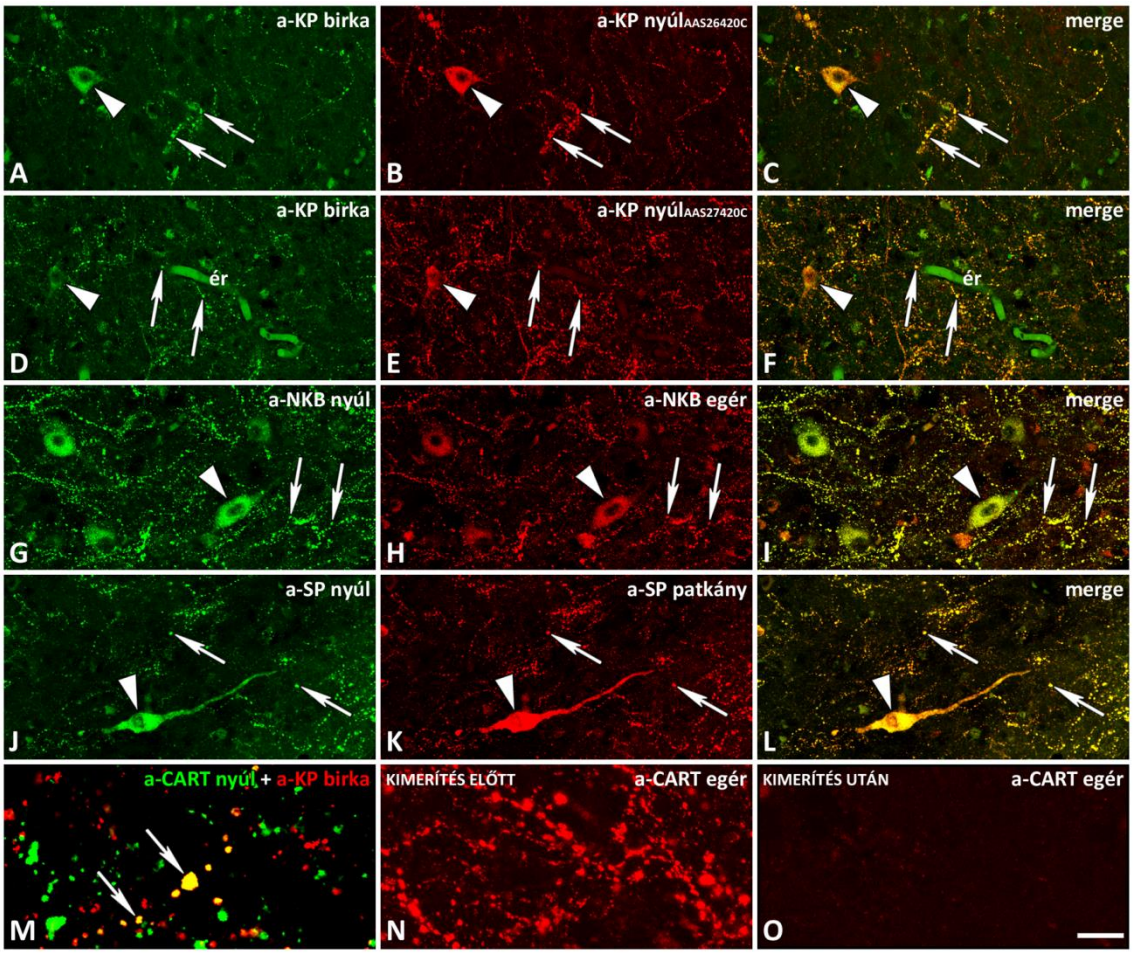
A GQ2 ellenanyag specifikusságát további két, nyúlban termeltetett ellenanyag segítségével is igazoltuk. Az AAS26420C ellenanyag a 138 aminosavból álló humán pro-KP fehérje 21-81, míg az AAS27420C ellenanyag 47-107 aminosav-szekvenciáját ismeri fel. Ezek a szakaszok nem tartalmazzák a KP fehérje RF-amid motívumát, kizárva annak a lehetőségét, hogy keresztreakciót mutasson az RF-amid peptidcsalád más tagjaival. A kétféle ellenanyaggal (GQ2 és AAS26420C vagy AAS27420C) elvégzett immunhisztokémiai vizsgálatok során ugyanazt a festődési mintázatot láttuk (**6. ábra, A-F**).

Az NKB és SP ellenanyagok specifikusságának megállapításához, pozitív kontrollként két különböző fajban termeltetett ellenanyagot használtunk. A nyúlban termeltetett poliklonális antiszérum a humán pro-NKB (IS-681; IS-682) (Hrabovszky és mtsai., 2010) a C-terminus utolsó 28 aminosavát ismeri fel, míg az egérben termeltetett monoklonális ellenanyagot a humán NKB ellen tervezték (M-871-100; Biosensis Pty. Ltd.). A Dr. Petrusz Péter által rendelkezésünkre bocsátott, nyúlban termeltetett SP ellenanyag (505D3) a SP karboxil-terminusát ismeri fel, és kevesebb, mint 0,05%-ban mutat keresztreakciót a neurokinin A-val vagy B-vel (Conti és mtsai., 1992). A monoklonális SP ellenanyagot patkányban termeltették (8450-0505; AbD Serotec). A kétféle ellenanyaggal kivitelezett immunfluoreszcens vizsgálatok eredményei mindkét esetben ugyanolyan festődési mintázatot mutattak (**6. ábra, G-I**, illetve **J-L**).

Az egérben termeltetett monoklonális CART ellenanyagunk (Vrang és mtsai., 1999) – amit Dr. Jes Thorn Clausen bocsátott rendelkezésünkre – specifikusságát a

preabszorpciós (kimerítéses) kísérlet eredménye is megerősítette. Ehhez a 10^{-4} M humán CART 54-102 peptidet az általunk használt, egérben termeltetett CART antitesttel egy éjszakán keresztül inkubáltuk. A posztmenopauzás női mintákból származó tesztmetszeteken a CART-peptid/anti-CART komplexet tartalmazó oldatban való inkubálás után immunfluoreszcens festést végeztünk. Mivel a CART ellenanyag a CART-peptidhez való kötődése után a szöveti antigénekkel már nem volt képes további kötések kialakítására, a kimerítés előtt elvégzett immunfestés eredményével (**6. ábra, N**) ellentétben a mintákban nem láttunk CART immunreaktivitást (**6. ábra, O**). Pozitív kontrollként további immunhisztokémiai jelölést végeztünk: a KP-IR rostok egy része a már karakterizált (Koylu és mtsai., 1997), nyúlban termeltetett poliklonális CART antitesttel való festést követően is mutatott CART-immunpozitivitást (**6. ábra, M**). Az ellenanyagot Dr. Michael J. Kuhar bocsátotta rendelkezésünkre.

A hármas, illetve négyes immunjelölés alkalmazásánál az ellenanyag-karakterizálás és specificitási tesztek elvégzése mellett az ellenanyagok közötti keresztreakciók lehetőségének kizárásához további kontrollnak tekinthetők a mintákban kétszeresen és háromszorosan jelölődő sejttestek és axonok mellett az egyértelműen detektálható, egyszeres immunreaktivitást mutató idegelemek.



6. ábra: Pozitív kontroll kísérletek eredményei az immunhisztokémiai vizsgálatok során használt ellenanyagok specifikusságának megállapítására. Az ellenanyag-specificitás ellenőrzésének egyik általánosan elfogadott módja, ha két, különböző fajban termeltetett antiszérum a kettős fluoreszcens immunjelölés során ugyanazt a festődési mintázatot mutatja. Kontroll kísérleteinkben az „a-KP birka" (GQ2, birkában termeltetett KP ellenanyag; **A** és **D**), az „a-NKB nyúl" (IS-682; **G**) és az „a-SP nyúl" (505D3; **J**) ellenanyagok mellett ezért „a-KP nyúl" (AAS26420C; **B** és AAS27420C; **E**), „a-NKB egér" (M-871-100; **H**) és „a-SP patkány" (8450-0505; **K**) antiszérumot alkalmaztunk. A sejttestek és rostok legnagyobb része mind a négy esetben kettős (FITC és Cy3) festődést mutatott, így sárga színben tűnt elő (**C**, **F**, **I**, **L**, fehér nyílfejek és nyilak). A kísérletekben használt „a-CART egér" ellenanyaghoz hasonlóan – melynek specifikusságát kimerítéses kísérlettel is igazoltuk (**N** és **O**) –, a nyúlban termeltetett CART ellenanyag is jelölt KP-tartalmú rostokat (**M**, fehér nyilak). Az erek zöld autofluoreszcenciát mutatnak (**D**, **F**). „a"=anti; lépték: A-L: 35 μm; M-O: 10 μm.

3.6. Képalkotás

Az immunfluoreszcens vizsgálatok során négy különböző fluorokrómot használtunk. Ezek nevét, a gerjesztő fény hullámhosszát, valamint a dikroikus tükrök által reflektálható fény maximális hullámhosszát és az emittált fénynek az emissziós filterek által átengedett hullámhossz-tartományát a **7. ábra** foglalja össze**.**

Fluorokróm ▼	A gerjesztő fény hullámhossza	A dikroikus tükrök/emissziós szűrők által reflektálható/átengedett fény hullámhossz-értékei
AMCA	405 nm	500 nm/420-480 nm
FITC	488 nm	560 nm/500-540 nm
Cy3	543 nm	650 nm/560-610 nm
Cy5	637 nm	660-nm-long pass filter

7. ábra: Az immunfluoreszcens kísérleteinkben alkalmazott fluorokrómok

A fluoreszcensen jelölt szövetmintákból Radiance 2100 konfokális mikroszkóppal (Bio-Rad Laboratories, Hemel Hempstead, Egyesült Királyság) készítettünk ~2 µm vastag reprezentatív rétegfelvételeket. Az elemzésre használt kis nagyítású „áttekintő", valamint a neuronok kapcsolatrendszerét vizualizáló nagy nagyítású képek az Inf területéről készültek.

A konfokális képek készítésénél a szkennelés alatt egyszerre mindig csak egy lézer és emissziós detektor működött (lambda strobing funkció), elkerülve ezáltal a bleed-through jelenségét, azaz a gerjesztés során a fluorofór molekulák közötti „áthallást". A bleed-through lehetőségének teljes kizárása érdekében minden kísérletben egyszeresen jelölt negatív kontrollokat is alkalmaztunk. A zöld, vörös és távoli-vörös csatornákon készített képeket ImageJ program segítségével egyesítettük, majd Adobe Photoshop (PSD) fájlként RGB módban kezeltük. A négyes immunjelölésnél a negyedik flurofórt (AMCA) a PSD fájlban vagy fekete-fehér képként külön illusztráltuk (SP), vagy ugyanazon a képen barna színnel (pseudocolor) jelenítettük meg (GnRH).

A peroxidáz alapú kimutatás után a metszetekről Zeiss AxioImager M1 mikroszkóp (Carl Zeiss, Göttingen, Németország) AxioCam MRc 5 digitális kamerájának segítségével készítettünk reprezentatív felvételeket.

3.7. Kvantitatív anatómiai vizsgálatok

3.7.1. Neuropeptid ko-expresszió vizsgálata sejttestekben

A CART neuropeptid KP-IR és NKB-IR sejttestekben való jelenlétének kvantitatív vizsgálatát öt posztmenopauzás női mintán végeztük. Emberenként 1-3 reprezentatív rétegfelvételt készítettünk, ahol a KP és NKB sejttesteket megszámoztuk, peptidtartalmukat pedig dokumentáltuk. Az öt mintából származó eredményeinket Microsoft Excel 2010 program segítségével %±SEM (standard error of mean, a középérték közepes hibája) értékben fejeztük ki, és grafikusan ábrázoltuk. A kördiagramon az összes észlelt KP-IR és/vagy NKB-IR neuront vettük 100%-nak (N=515 az öt egyedből). Az egyszeresen jelölt CART sejttesteket – melyek egy része valószínűleg azonos az Inf más területén található AGRP/NPY sejtekkel (Menyhért és mtsai., 2007) – nem ábrázoltuk a diagramon, mivel ezek a neuronok a KP és NKB sejtcsoportokra fókuszáló mintavétel mellett alulreprezentáltak voltak az Inf ezen régiójában. Eredményeinket oszlopdiagramokon is illusztráltuk, amelyek az egy (KP vagy NKB), kettő (KP/NKB, CART/KP, illetve CART/NKB) vagy mindhárom (CART/KP/NKB) neuropeptidet kifejező KP-IR és NKB-IR sejttestek relatív gyakoriságát ábrázolják.

A pENK relatív gyakoriságának meghatározását KP és NKB sejtekben három posztmenopauzás női (69, 74, 88 évesek) és három idős férfi (51, 64, 78 évesek) mintán végeztük. Az Inf területén a férfi metszetekről készült adott rétegfelvételen detektálható összes KP (N=142) és NKB (N=182) sejttest peptidtartalmát dokumentáltuk, eredményeinket pedig %±SEM értékben fejeztük ki.

A többi, általunk vizsgált neuropeptid (α-MSH, AGRP, CCK, galanin, NPY, NT, SS), illetve neurotranszmitter (TH) KP és NKB sejtekben való előfordulásához a posztmenopauzás női vagy idős férfi egyedekből származó metszetek egy adott síkjáról készült felvételen megtalálható perikarionok közül a véletlenszerűen kiválasztott 100 KP, illetve NKB neuron peptidtartalmát határoztuk meg.

3.7.2. Neuropeptid ko-expresszió kvantitatív elemzése axonokban

A CART peptid KP-IR, illetve NKB-IR rostokban való relatív gyakoriságának meghatározásához a sejttestekben lévő kolokalizációs arányok kvantifikálásához készült felvételeket használtuk. Az analizált terület mérete az egyedek esetében 720000-810000 μm^2 volt. A 2 μm vastag rétegfelvételekre elsőként egy 20 μm x 20 μm-es négyzetekbő álló rácsot helyeztünk. Azokat a varikozitásokat, amelyek a rácsvonalakra estek vagy érintették azokat, neuropeptid-tartalmuknak megfelelően kategorizáltuk és dokumentáltuk. A rácsvonalakra eső, de sejttesteket, ereket, metszetszakadásokat és egyéb artifaktokat tartalmazó területek nem kerültek elemzésre. A három neuropeptid axon varikozitásokban való relatív előfordulását az öt mintából átlagolva %±SEM értékben fejeztük ki, és grafikusan ábrázoltuk. A kördiagramon az összes észlelt KP-IR és/vagy NKB-IR varikozitást vettük 100%-nak (az öt egyedből összesen N=11270). Az egyszeresen jelölt CART-IR varikozitásokat a fentebb említett megfontolásnak megfelelően itt sem ábrázoltuk. Az egy, kettő vagy mindhárom neuropeptid axon varikozitásokban való relatív előfordulását oszlopdiagramokon illusztráltuk, ahol 100%-nak az összes észlelt KP-IR, illetve NKB-IR axon varikozitás feleltethető meg.

Annak eldöntésére, hogy az Inf területén található CART peptidet is kifejező KP-IR és NKB-IR idegsejtek azonosak-e a már korábban leírt CART/AGRP neuronpopulációval, CART/NKB/AGRP immunfluoreszcens hármas jelölést alkalmaztunk. A CART peptid NKB-IR, illetve AGRP-IR axon varikozitásokban való jelenlétének kvantitatív vizsgálatát három posztmenopauzás női mintán végeztük az ismertetett metodika szerint. Az elemzett terület nagysága minden ember esetében 240000 μm^2 volt.

A fenti metodikát alkalmazva a pENK KP-IR, illetve NKB-IR rostokban való relatív gyakoriságát is meghatároztuk. A perikarionokban tapasztalható kolokalizációs arányok meghatározásához használt felvételeken összesen 266 KP-IR, illetve 532 NKB-IR axon varikozitás peptidtartalmát dokumentáltuk. A három idős férfiból származó adatokat %±SEM értékben fejeztük ki.

A sejttestek szintjén is vizsgált további neuropeptidek KP-IR és NKB-IR rostokban való előfordulását a véletlenszerűen kiválasztott rácsvonalak mentén detektált első 100 KP-t, illetve első 100 NKB-t tartalmazó axon varikozitás peptidtartalmának dokumentálásával határoztuk meg.

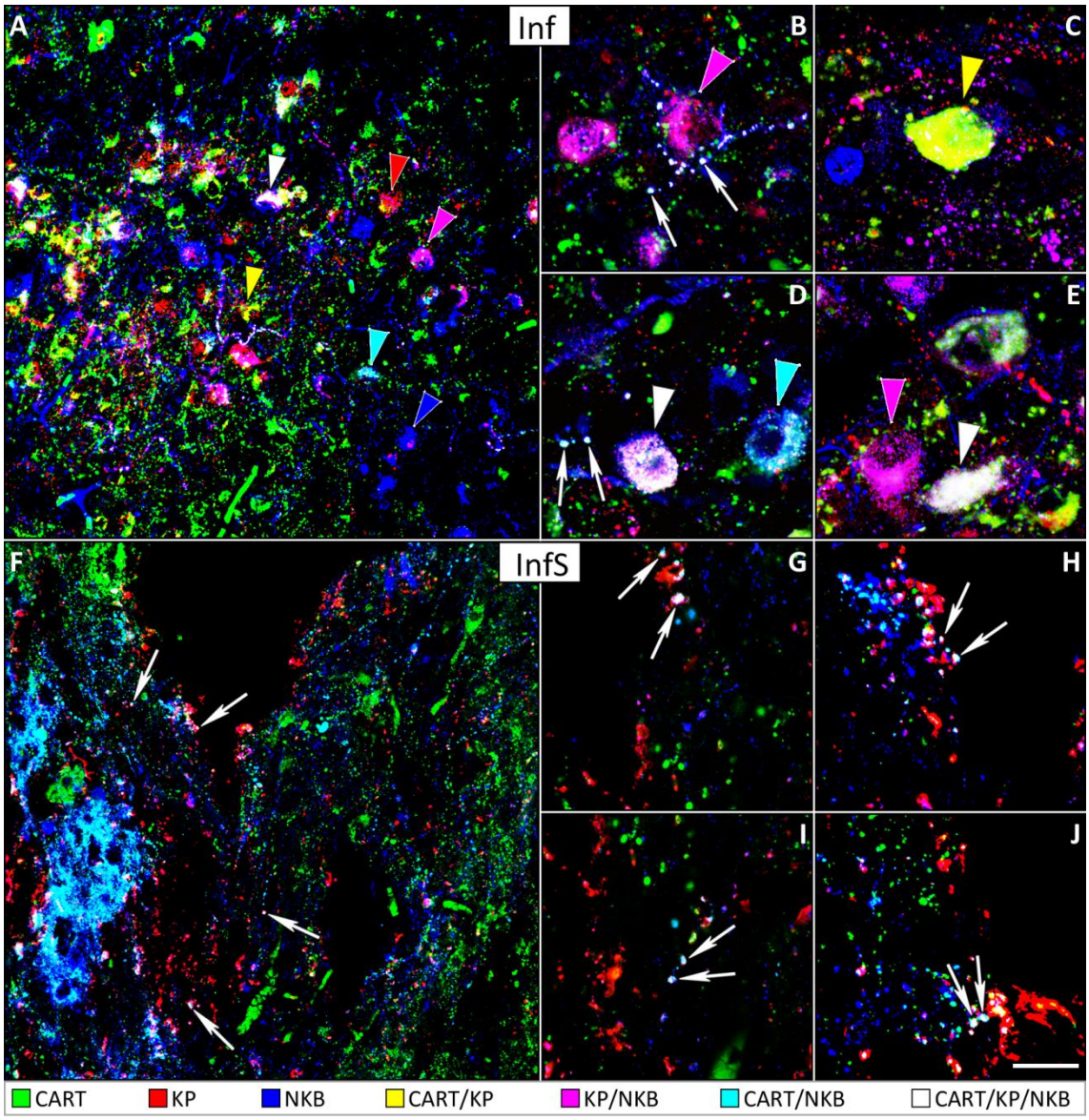
4. Eredmények

4.1. Az emberi kisspeptin sejtek immunhisztokémiai profilja

Az emberi KP-t kifejező idegsejtek minél szélesebb körű neurokémiai karakterizálása, illetve azok neuropeptid-tartalmának megismerése érdekében átfogó immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk. Kísérleteinket posztmenopauzás női – ahol a KP-expresszió (Rometo és mtsai., 2007), illetve -immunreaktivitás (Hrabovszky és mtsai., 2010) mértéke a legnagyobb –, és idős férfi mintákon végeztük; így információt nyerhettünk a nemi hormonok hiánya/jelenléte által okozott esetleges neurokémiai változásokról. Vizsgálataink középpontjában olyan neuropeptidek és neurotranszmitterek álltak, amelyeket a hipotalamusz infundibuláris régiójában található neuroncsoportok kifejeznek (AGRP, α-MSH, CART, CCK, NPY, NT, SS), illetve a rágcsálókon végzett kolokalizációs vizsgálatok eredményeit alapul véve kolokalizációjuk KP-nel és NKB-vel valószínűsíthető volt (TH, pENK, galanin).

4.1.1. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) megjelenése KP-IR és NKB-IR neuronokban

A KP, NKB és CART jelenlétét detektáló, hármas immunfluoreszcens jelölést alkalmazó vizsgálataink eredményei azt mutatták, hogy a KP-t és NKB-t szintetizáló idegsejtek egy populációja az infundibuláris régióban a CART neuropeptidet is kifejezi. A konfokális mikroszkóppal készített képek tanúsága szerint a CART jel a KP-t és NKB-t kifejező neuronok sejttestjeiben és rostjaiban egyaránt detektálható (**8. ábra, A-E**). Az infundibuláris nyél (InfS) területén található axonok egy része szintén kifejezte egyidejűleg mindhárom neuropeptidet (**8. ábra, F-J**).



8. ábra: A cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) lokalizációja az emberi hipotalamusz infundibuláris régiójában elhelyezkedő, kisspeptint (KP) és neurokinin B-t (NKB) szintetizáló neuronokban. A hármas fluoreszcens immunjelölés eredménye szerint posztmenopauzás nőkben a KP (piros) és NKB (kék) neuronok jelentős része CART (zöld) neuropeptidet is kifejez az infundibuláris mag (Inf; **A**-**E**), illetve nyél (InfS; **F**-**J**) területén. A kis (**A**, **F**) és nagy nagyítású (**B**-**E**, **G**-**J**) konfokális felvételeken a megfelelő színű nyílhegyek (színkódot ld. a kép alatt) egyes-, kettős-, illetve hármas-jelölt sejttesteket jeleznek (**A**-**E**), míg a fehér nyilak hármas-jelölt axon varikozitásokra mutatnak az Inf (**B**, **D**), illetve InfS (**F**-**J**) területén. A CART a neuroszekrétoros axonterminálisokon hatva autokrin vagy parakrin módon szabályozhatja a reprodukciót, illetve a portális keringési rendszerbe jutva az adenohipofízis működésére lehet hatással. Lépték: A: 50 µm; F: 60 µm; B-E, G-J: 20 µm.

4.1.1.1. A CART-immunreaktivitás mennyiségi jellemzése a KP-IR és NKB-IR perikarionokban

A KP-t és NKB-t kifejező sejtekben előforduló CART jel relatív gyakoriságának meghatározásához öt posztmenopauzás női mintából összesen 515 sejttestet kategorizáltunk neuropeptid-tartalmuknak megfelelően. A kvantitatív elemzést követően a különböző peptidtartalommal rendelkező neuronok infundibuláris régióban való előfordulási gyakorisága – a KP-t és/vagy NKB-t kifejező neuronokat 100%-nak véve – az alábbiak szerint alakult: a KP-t és NKB-t egyaránt kifejező sejttestek 32,4±4,5%-ban, az egyszeresen jelölt NKB perikarionok 26,9±4,4%-ban fordultak elő, míg 24,0±4,1% volt azoknak a sejttesteknek az aránya, amelyek a CART, KP és NKB peptidet egyidejűleg kifejezték. 10% alatt volt a CART/KP, az egyszeresen jelölt KP, illetve a CART/NKB perikarionok aránya (sorrendben: 9,9±2,2%; 5,4±2,6%; illetve 1,5±0,8%) (**9. ábra, A**).

Az összes, általunk detektált KP-IR sejttest 78,4±2,9%-a tartalmazott NKB-t, 47,9±6,6% fejezett ki CART-ot, valamint 33,3±4,9%-a mindhárom neuropeptidet egyidejűleg expresszálta (**9. ábra, C**). Másrészről, az összes NKB-IR sejttest 66,5±5,1%-a mutatott KP-immunpozitivitást, 30,0±4,9% tartalmazott CART-ot, és 28,2±4,6%-a volt hármas-jelölt (**9. ábra, D**).

4.1.1.2. Új kvantitatív megközelítés axonális neuropeptid kolokalizáció elemzésére

Míg egy adott agyi régióban tapasztalt idegrostsűrűség különböző szoftverek segítségével egyszerűen meghatározható, az axonokban egyidejűleg jelenlévő neuropeptidek relatív gyakoriságának meghatározására eddig kevesen vállalkoztak. Mivel általában az axonok hordozzák az idegsejtek végső kimeneti jelét, azok peptidtartalmáról kapott információk közelebb vihetnek bizonyos funkcionális kérdések megoldásához. Az együtt lokalizálódó struktúrák/anyagok meghatározására léteznek ugyan szoftverek, ám ezek esetünkben – a vizsgált agyterületet sűrűn behálózó axonok miatt – nem alkalmazhatók, a rétegfelvételek vastagságából adódóan ugyanis elkerülhetetlen a különböző neuropeptideket tartalmazó, de egymásra vetülő rostok kolokalizációként való értékelése. Éppen ezért szükségét éreztük egy olyan egyszerűen alkalmazható, csak valós kolokalizációs adatokat dokumentáló módszer

kidolgozásának, melynek segítségével az axonokban kettő vagy több együtt előforduló neuropeptid mintán belüli aránya meghatározható.

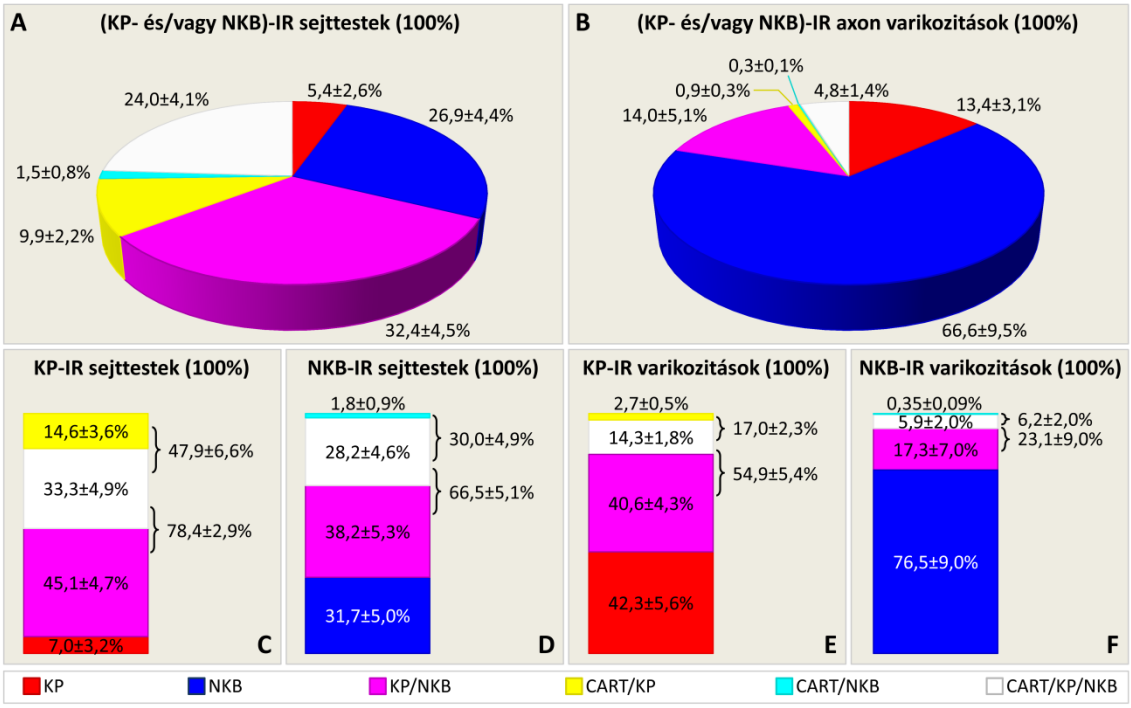
Mivel a szövetmintákról készült rétegfelvételek vastagsága (2 μm), illetve az axonok peptiderg volta miatt az egyedi rostok lefutását nem tudtuk pontosan nyomon követni, a viszonylag egyszerűen számolható egyedi varikozitások peptidtartalmát határoztuk meg. Ehhez feltételeztük, hogy a varikozitásokban lévő neuropeptidek megoszlása megegyezik az egyedi rostokban lévőkkel. Reprezentatív mintavételhez, a rétegfelvételekre egy 20 μm x 20 μm négyzetekből álló, és a különböző kísérletekben mintánként 240000-810000 μm^2 metszetfelületet borító rácsot helyeztünk, és azokat a varikozitásokat, amelyek a rácsvonalakra estek vagy érintették azokat, neuropeptid-tartalmuknak megfelelően kategorizáltuk és dokumentáltuk. Munkánk során ügyeltünk arra, hogy a rácspontokra eső varikozitások peptidtartalma csak egyszer szerepeljen az adatok között. A rácsvonalakra eső, de sejttesteket, ereket, metszetszakadásokat és egyéb artifaktokat tartalmazó területek nem kerültek elemzésre.

4.1.1.3. A CART-immunreaktív KP és NKB axonok relatív előfordulási gyakorisága a nucleus infundibularisban

Korábbi megfigyeléseinket, melyek szerint a neuropeptidek kolokalizációjának mértéke az axonokban nem olyan gyakori, mint a sejttestekben, jelen tanulmányban is megerősíthetjük. Az általunk kidolgozott kvantifikációs módszert alkalmazva, 11270 varikozitást kategorizáltunk és dokumentáltunk neuropeptid-tartalmuknak megfelelően. Az öt posztmenopauzás női minta elemzését követően – az összes KP-IR és/vagy NKB-IR varikozitást 100%-nak véve – azt tapasztaltuk, hogy a leggyakrabban előforduló rosttípus csak NKB-t tartalmazott (66,6±9,5%). A KP-t és NKB-t egyaránt kifejező rostok relatív gyakorisága 14,0±5,1% volt, míg az egyszeresen jelölt KP-IR rostok 13,4±3,1%-ban fordultak elő az Inf területén. A CART, KP és NKB neuropeptidet egyaránt tartalmazó, valamint a CART/KP és CART/NKB kettősen jelölt rostok relatív gyakorisága – a sejttestekben tapasztalható kolokalizációs arányokhoz képest – alacsony volt (sorrendben: 4,8±1,4%; 0,9±0,3%; illetve 0,3±0,1%) (**9. ábra, B**).

Az összes, általunk detektált KP-IR varikozitás 54,9±5,4%-a tartalmazott NKB jelet, 17,0±2,3%-a volt CART-pozitív, és 14,3±1,8%-a fejezte ki egyszerre mindhárom neuropeptidet (**9. ábra, E**). Az NKB-IR axon varikozitások 23,1±9,0%-a expresszált

KP-t, 6,2±2,0%-a tartalmazott CART jelet, és 5,9±2,0%-a volt hármas-jelölt (**9. ábra, F**).



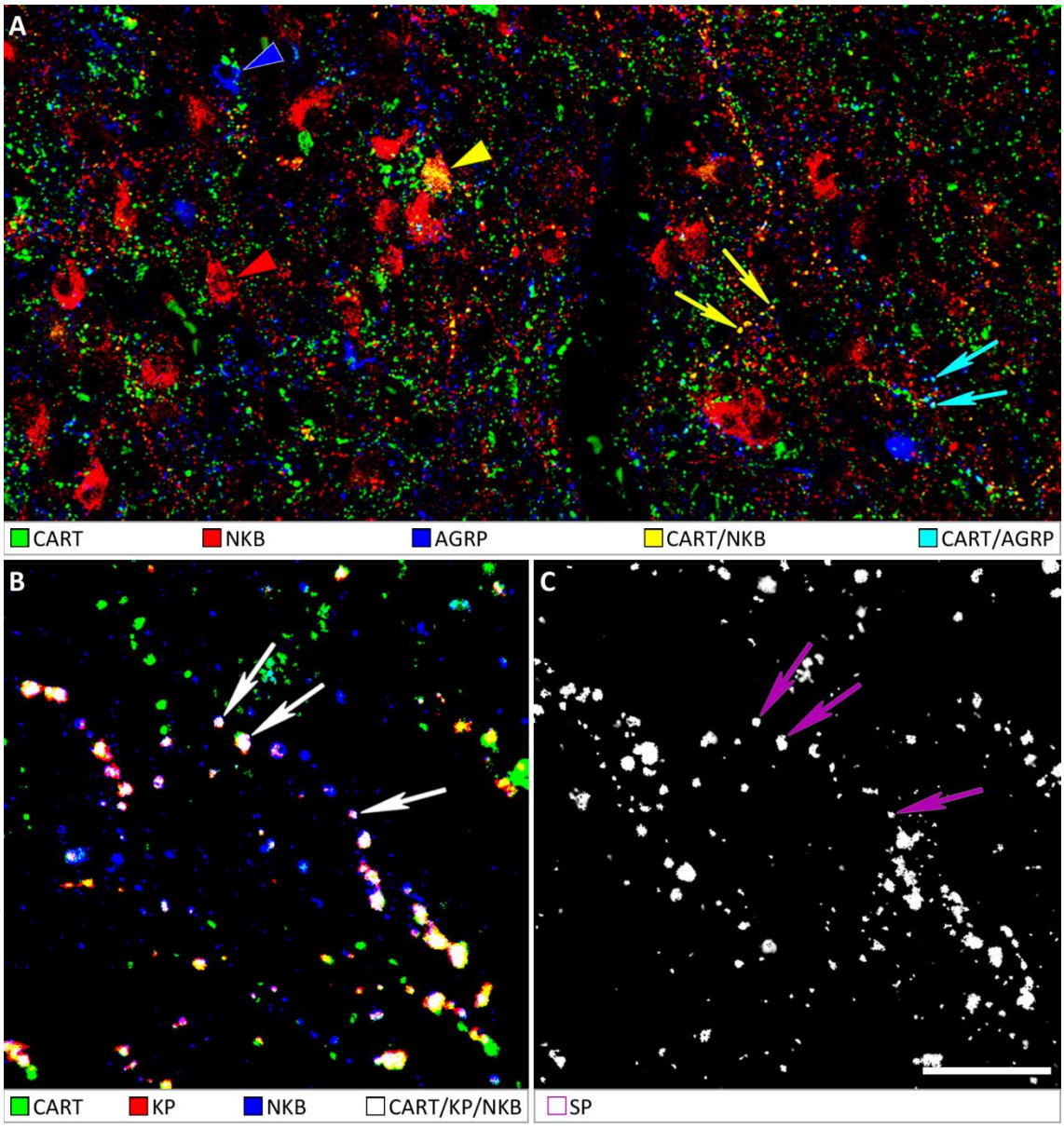
9. ábra: A KP-, NKB- és CART-IR perikarionok és axon varikozitások relatív előfordulási gyakorisága az infundibuláris régióban. A kördiagramokon a különböző neuropeptid-fenotípusok (egyszeres, kettős vagy hármas jelölődés) relatív előfordulási gyakoriságát ábrázoltuk. Az értékeket átlag±SEM%-ban fejeztük ki, ahol az általunk detektált összes (KP- és/vagy NKB)-IR sejttestet (**A**, N=515), illetve varikozitást (**B**, N=11270) vettük 100%-nak. A kvantitatív elemzést öt posztmenopauzás női mintából készítettük. Érdemes megjegyezni, hogy míg perikarionok esetében a három leggyakrabban előforduló neuropeptid-fenotípus – sorrendben – a KP/NKB (32,4±4,5%), egyszeres NKB (26,9±4,4%), illetve CART/KP/NKB (24,0±4,1%), addig rostoknál az egyszeres NKB (66,6±9,5%), KP/NKB (14,0±5,1%), illetve egyszeres KP (13,4±3,1%) peptidfenotípusok domináltak. Általánosságban elmondható, hogy a neuropeptidek ko-expressziójának mértéke sejttestekben nagyobb, mint rostokban (vö. **A** és **B**). Az oszlopdiagramok a KP-IR (**C**, **E**), illetve NKB-IR (**D**, **F**) neuronális elemek (sejttestek: **C**, **D**; axon varikozitások: **E**, **F**) által kifejezett neuropeptidek relatív előfordulási gyakoriságát, illetve a kolokalizáció arányát ábrázolják. A KP-IR sejttestek 78,4±2,9%-a tartalmaz NKB jelet, 47,9±6,6%-a expresszál CART-ot és 33,3±4,9%-a fejezi ki mindhárom neuropeptidet (**C**). Az NKB-IR perikarionok 66,5±5,1%-a tartalmaz KP-t is, 30,0±4,9%-a CART-ot és 28,2±4,6%-a hármas-jelölt (**D**). A KP-IR axon varikozitások 54,9±5,4%-a expresszál NKB-t, 17,0±2,3%-a tartalmaz CART-ot és 14,3±1,8%-a mindhárom neuropeptidet kifejezi (**E**). Az NKB-IR varikozitások 23,1±9,0%-a KP-tartalmú, 6,2±2,0%-a expresszál CART-ot és csupán 5,9±2,0%-a CART/KP/NKB hármas-jelölt (**F**).

4.1.1.4. Átfedés hiánya a CART peptidet termelő NKB és agouti-related protein (AGRP) sejtpopulációk között

Rágcsálókkal ellentétben, emberben a CART nem az anorexigén – azaz táplálékfelvételt csökkentő – szereppel bíró, α-melanocita stimuláló hormont (α-MSH) szintetizáló proopiomelanocortin (POMC) neuronokban fejeződik ki, hanem az ellentétes hatású, orexigén – azaz a táplálékfelvételt serkentő – AGRP/NPY sejtekben (közel egyharmadukban) expresszálódik (Menyhért és mtsai., 2007). Jelen tanulmányban megerősítettük ezt a megfigyelést: a három posztmenopauzás női mintából származó 1171 AGRP-IR varikozitás 5,9±1,1%-a tartalmazott CART-immunpozitivitást is. A kvantitatív elemzés során megvizsgált 2417 CART-IR varikozitás 6,2±1,6%-a expresszált NKB-t, míg 2,9±0,7%-a AGRP neuropeptidet; a CART/AGRP, illetve a CART/NKB rostpopuláció között azonban átfedést nem tapasztaltunk. Eredményeink azt mutatják, hogy az NKB-t kifejező CART neuronok, illetve az AGRP-t expresszáló CART sejtek külön populációt alkotnak az Inf területén. (**10. ábra, A**).

4.1.1.5. Átfedés a SP-termelő és CART-termelő KP és NKB neuronok között

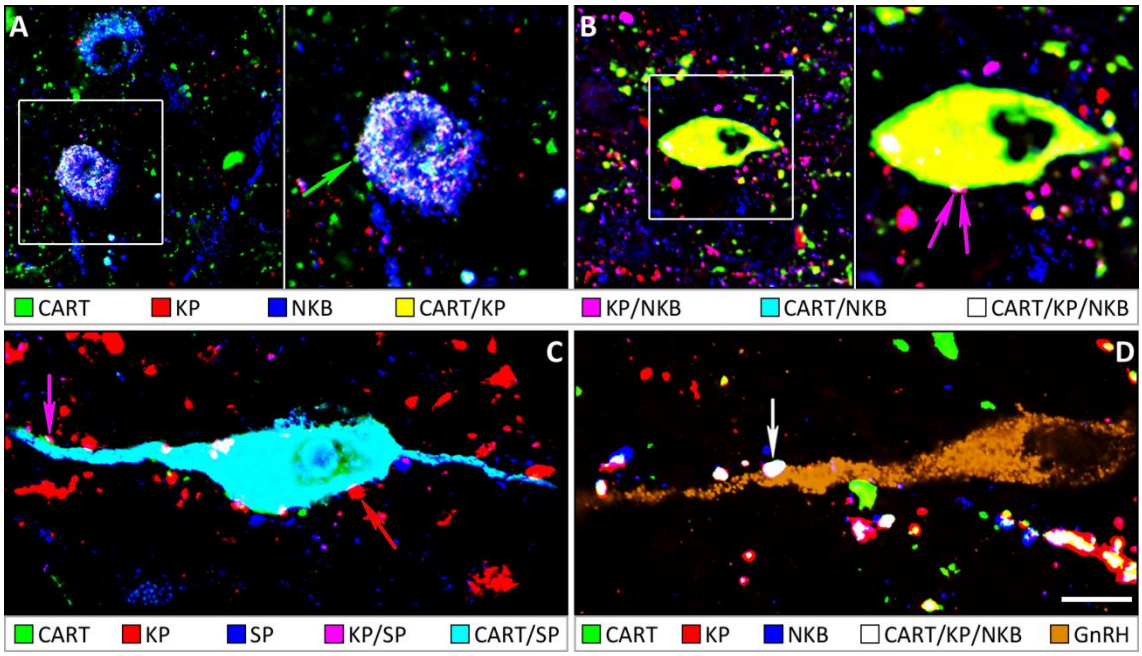
Mivel a KP és NKB neuronok egy része az infundibuláris régió területén SP-t is kifejez (Hrabovszky és mtsai., 2013), kíváncsiak voltunk arra, hogy a SP/KP/NKB sejtek azonosak-e a CART/KP/NKB neuronokkal. Négyes immunfluoreszcens jelöléssel sikerült CART/SP/KP/NKB-IR rostokat kimutatni az Inf régióban. Megfigyelésünk arra utal, hogy a CART-tartalmú, illetve a SP-t kifejező KP és NKB neuronok populációja – legalább részben – átfed (**10. ábra, B-C**).



10. ábra: A CART-IR KP és NKB neuronok további karakterizálása. A CART, NKB, AGRP hármas immunjelölés eredménye szerint a CART-tartalmú NKB rostok (**A**, sárga nyilak) nem azonosak azokkal a CART-IR rostokkal, amelyek az orexigén hatású AGRP neuropeptidet is expresszálják (**A**, türkiz nyilak). A színkódnak (ld. a kép alatt) megfelelő színű nyílhegyek a jelölt sejttestekre mutatnak (**A**). A CART, KP, NKB és SP négyes immunfluoreszcens festést követően megállapítottuk, hogy a SP-t kifejező (Hrabovszky és mtsai., 2013), illetve a CART-ot expresszáló KP és NKB neuronok részben átfednek: a **B** képen lévő fehér nyilak olyan CART/KP/NKB-tartalmú axon varikozitásokra mutatnak, melyek egyidejűleg SP-t is kifejeznek (lila nyilak a **C** képen). A színkódot ld. a kép alatt. Lépték: A: 60 µm; B, C: 20 µm

4.1.1.6. Bő axo-szomatikus és axo-dendritikus kapcsolatok a nucleus infundibularis CART peptidet kifejező KP, NKB és SP neuronjai között

Az immunfluoreszcens vizsgálatok eredményeit alapul véve elmondhatjuk, hogy a CART-tartalmú KP, NKB és SP idegsejtek egymással appozíciót, axo-szomatikus és axo-dendritikus kapcsolatot létesítettek az infundibuláris mag területén. A különböző peptidek sokféle kombinációban fordultak elő a kontaktust képező axon varikozitásokban. A általunk látott és dokumentált kapcsolatok sokféleségét a **11. ábrán** demonstráljuk. Az **A** képén egy CART-IR rost axo-szomatikus kapcsolatot létesít egy CART/KP/NKB neuron perikarionján, a **B** képen lévő CART/KP sejttestet egy KP/NKB axon idegez be, míg az **C** képen KP- és KP/SP-tartalmú rostok képeznek appozíciót egy CART/SP neuron perikarionján és dendritjén.



11. ábra: A CART-IR KP, NKB és SP neuronok közötti kapcsolatok morfológiai vizsgálata az infundibuláris régióban. Az CART-IR KP és/vagy NKB és/vagy SP neuronok (színkódot ld. a képek alatt) egymással kontaktust képeznek az Inf területén: egyszeres-, kettős-, valamint hármas-jelölt axonok kapcsolatot létesítenek más peptiderg, gyakran CART-ot is kifejező idegsejttel. Az **A** képen egy CART-tartalmú rost képez axo-szomatikus kontaktust egy CART/KP/NKB sejttesten (zöld nyíl), míg a **B** képen egy KP/NKB-IR axon idegez be egy CART/KP neuront (lila nyilak). A **C** képen látható CART/SP idegsejt perikarionján KP-tartalmú (piros nyíl), valamint KP/SP-IR (lila nyíl) rostok képeznek appozíciót. A **D** képen egy CART/KP/NKB rost axo-dendritikus kapcsolatot létesít a barna színnel (pseudocolor) megjelenített GnRH neuronnal (fehér nyíl; ld. 4.2.1. fejezet). Lépték: A, B: 20 µm (nagyítás: 10 µm); C: 12 µm; D: 10 µm

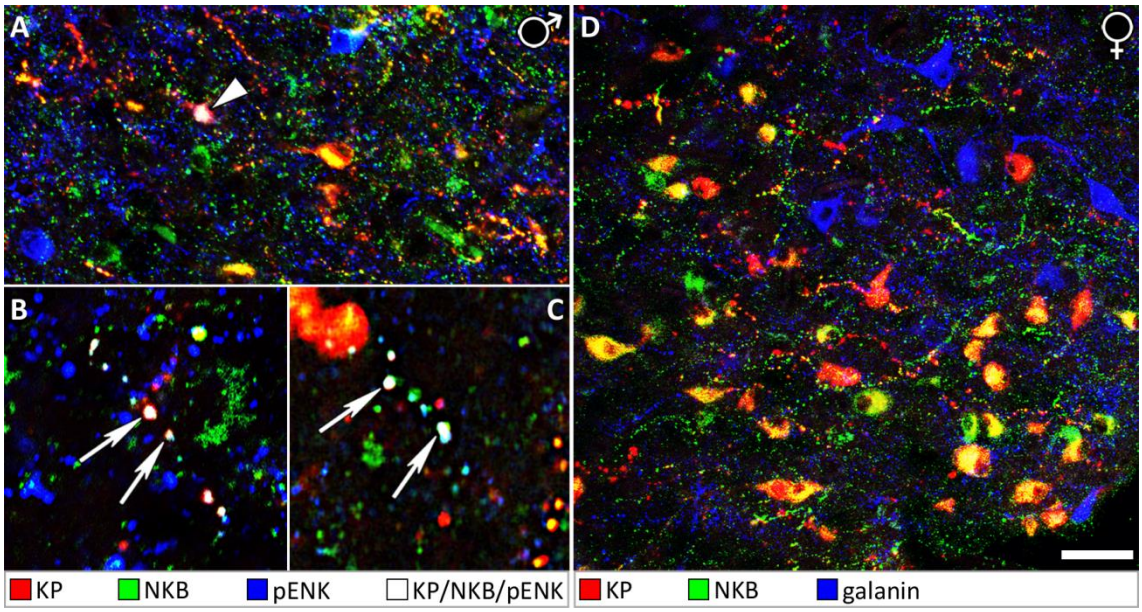
4.1.2. Proenkefalin (pENK) férfi hipotalamusz minták KP és NKB neuronjaiban

Az idős férfi mintákról (n=3; 51, 68 és 78 évesek), KP, NKB és pENK hármas immunfluoreszcens jelölést követően készült konfokális rétegfelvételek értékelése alapján megállapítottuk, hogy a pENK kifejeződik a KP és NKB idegsejtek egy kis részében, sejttestekben (**12. ábra, A**) és rostokban (**12. ábra, B-C**) egyaránt. Érdekes módon, hasonló kolokalizációt posztmenopauzás női mintákban (n=3) nem tapasztaltunk. Az elemzés adatai szerint a KP neuronok 1,9±1,0%-a, míg az NKB idegsejtek 12,5±5,1%-a kifejezte a pENK-t. A ko-expresszió a rostok szintjén is megfigyelhető volt: a KP-IR axon varikozitások 4,9±1,8%-ában, míg az NKB-IR rostok 5,7±2,5%-ában detektáltunk pENK jelet.

4.1.3. Az emberi KP és NKB neuronok által nem termelt neuropeptidek és neurotranszmitterek

Az emberi KP és NKB sejtek további neurokémiai karakterizálásához posztmenopauzás női és idős férfi mintákon hármas immunfluoreszcens festéseket végeztünk. Vizsgálataink tárgyát olyan, infundibuláris régióban (is) kifejeződő neuropeptidek és neurotranszmitterek képezték, melyek KP sejtekben való jelenlétét vagy már vizsgálták különböző laboratóriumi állatokban, vagy amelyekről feltételezhető, hogy a KP sejtekben expresszálódnak (**13. ábra**). A kolokalizációs kísérletek eredményei szerint az emberi KP és NKB sejtek nem tartalmaznak agouti-related proteint, α-melanocita stimuláló hormont, kolecisztokinint, galanint (**12. ábra, D**), neuropeptid Y-t, neurotenzint, szomatosztatint, valamint tirozin-hidroxilázt.

A humán KP-t és NKB-t kifejező idegsejtek neurokémiai karakterizálására irányuló kolokalizációs tanulmányaink eredményeit, valamint ezek összevetését laboratóriumi állatokban megfigyelt ko-expressziós vizsgálatok eredményeivel a **13. ábra** mutatja be.



12. ábra: Az emberi KP és NKB neuronok ko-transzmitter-fenotípusának meghatározására irányuló kolokalizációs kísérletek eredményei. A posztmenopauzás női és idős férfi mintákon hármas immunfluoreszcens jelölés segítségével végzett kolokalizációs tanulmányok eredményei szerint férfiakban a KP és NKB neuronok egy része pENK-t is expresszál. Az **A** képen a fehér nyílhegy egy KP/NKB/pENK sejttestre mutat, míg a **B** és **C** képeken lévő fehér nyilak a három neuropeptid axon varikozitásokban való együttes jelenlétét jelölik. A kolokalizáció jelenségét két különböző ellenanyag alkalmazásával is alátámasztottuk (**B**: EB08195, **C**: IS-30; ld. 5. ábra). Hasonló ko-expressziót nők esetében nem tapasztaltunk. A többi, általunk vizsgált neuropeptid, illetve neurotranszmitter (AGRP, α-MSH, CCK, galanin, NPY, NT, SS, TH) szintén nem expresszálódott az emberi KP és NKB idegsejtekben, sem nőkben, sem férfiakban. A kolokalizáció hiányát a galanin példáján keresztül szemléltettük (**D**). Léptéк: A, D: 40 µm; B, C: 12 µm

A KP neuronok ko-transzmitterei ➤	Laboratóriumi állatokban	Az emberi Inf régióban
KNDy peptidek		
Dyn	Kolokalizáció az ARC KP neuronokban birkában (Goodman és mtsai., 2007), egérben (Navarro és mtsai., 2009, 2011b), patkányban (Overgaard és mtsai., 2014), hörcsögben (Bartzen-Sprauer és mtsai., 2014) és kecskében (Wakabayashi és mtsai., 2010)	KP-IR rostokban nagyon ritka kolokalizáció fiatal férfiaknál (Hrabovszky és mtsai., 2012)
NKB	Kolokalizáció az ARC KP neuronokban birkában (Goodman és mtsai., 2007), egérben (Navarro és mtsai., 2009, 2011b), patkányban (Overgaard és mtsai., 2014), hörcsögben (Bartzen-Sprauer és mtsai., 2014), kecskében (Wakabayashi és mtsai., 2010) és majomban (Ramaswamy és mtsai., 2010)	Kolokalizáció a KP neuronok jelentős hányadában, sejttestekben és rostokban egyaránt (Hrabovszky, 2013; Hrabovszky és mtsai., 2010, 2011; Molnar és mtsai., 2012)
Egyéb neuropeptidek		
AGRP	Nincs kolokalizáció az ARC KP neuronokban birkában (Goodman és mtsai., 2007)	Nincs kolokalizáció a KP és NKB neuronokban
α-MSH, γ-MSH (POMC)	Nincs kolokalizáció az ARC KP neuronokban egérben (Cravo és mtsai., 2011) és birkában (Goodman és mtsai., 2007)	Nincs kolokalizáció a KP és NKB neuronokban
CART	Nem vizsgálták	Kolokalizáció a KP és NKB neuronok jelentős hányadában, sejttestekben és rostokban egyaránt (Skrapits és mtsai., 2014)
CCK	Nincs kolokalizáció az RP3V KP neuronokban egérben (Porteous és mtsai., 2011)	Nincs kolokalizáció a KP és NKB neuronokban
GAL	Kolokalizáció az RP3V és az ARC KP neuronokban egérben (Porteous és mtsai., 2011; Kalló és mtsai., 2012)	Nincs kolokalizáció a KP és NKB neuronokban
mENK, pENK	Kolokalizáció az RP3V KP neuronokban egérben (Porteous és mtsai., 2011)	Kolokalizáció a KP neuronok kis hányadában, sejttestekben és rostokban egyaránt
NPY	Nincs kolokalizáció az ARC KP neuronokban egérben (Cravo és mtsai., 2011)	Nincs kolokalizáció a KP és NKB neuronokban
NT	Nincs kolokalizáció az RP3V KP neuronokban egérben (Porteous és mtsai., 2011)	Nincs kolokalizáció a KP és NKB neuronokban
SP	Nem vizsgálták	Kolokalizáció a KP és NKB neuronok jelentős hányadában, sejttestekben és rostokban egyaránt (Hrabovszky és mtsai., 2013)
SS	Nem vizsgálták	Nincs kolokalizáció a KP és NKB neuronokban
Neurotranszmitterek		
TH	Kolokalizáció az RP3V KP neuronokban egérben (Clarkson and Herbison, 2011) és patkányban (Kauffman és mtsai., 2007)	Nincs kolokalizáció a KP és NKB neuronokban
GAD-67	Kolokalizáció az AVPV és ARC KP neuronokban egérben (ISH) (Cravo és mtsai., 2011)	Nem vizsgáltuk
vGluT2	Kolokalizáció az AVPV és az ARC KP neuronokban egérben (ISH) (Cravo és mtsai., 2011), és az ARC KP neuronokban patkányban (Ciofi és mtsai., 2006)	Nem vizsgáltuk

13. ábra: A KP neuronok ko-transzmitterei laboratóriumi állatokban és emberben

4.2. Új aspektusok a GnRH neuronok afferens szabályozásában

4.2.1. CART/KP/NKB ko-expresszió a GnRH idegsejtek axo-dendritikus bemeneteiben

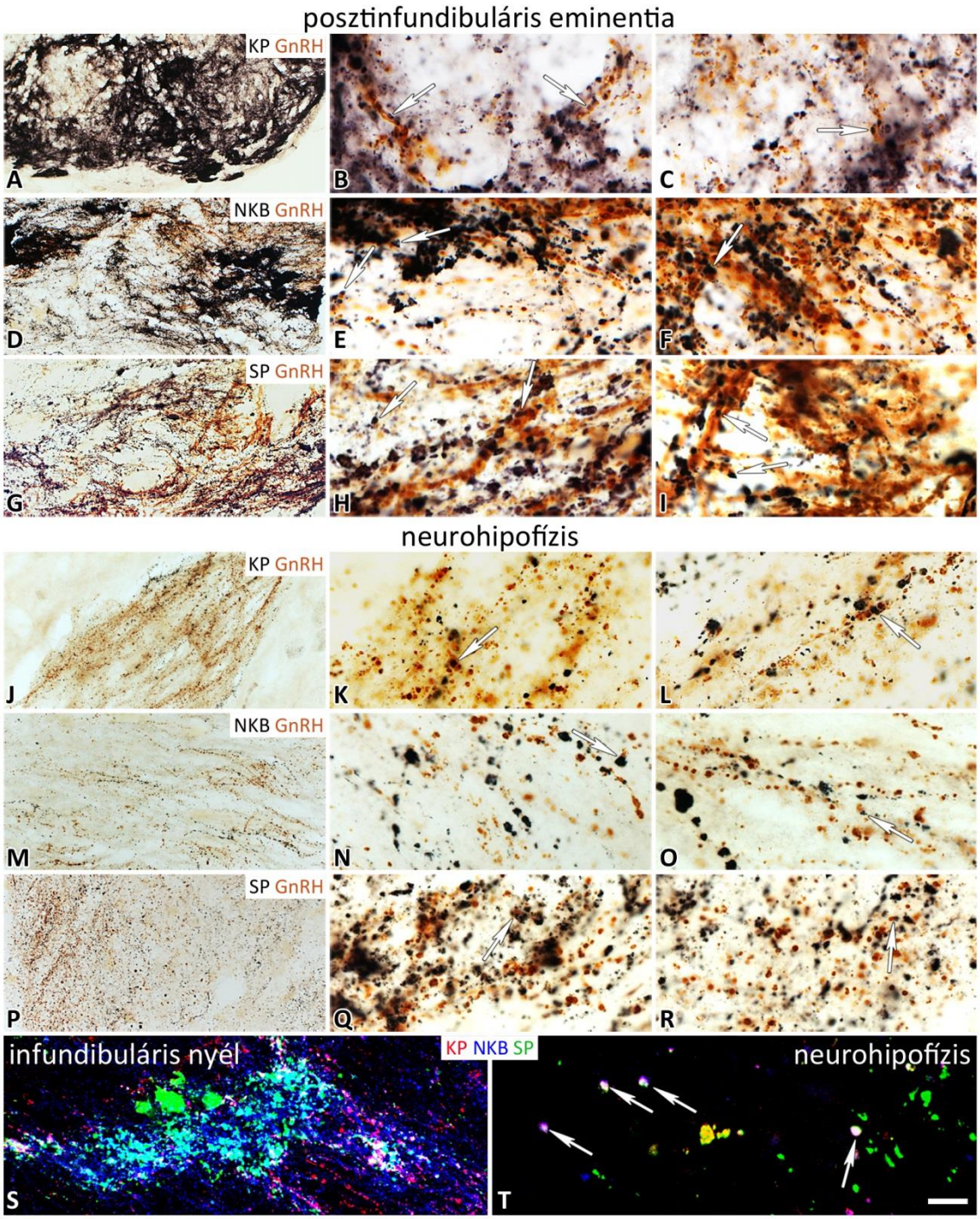
Laboratóriumunk korábban tette azt a megfigyelést, mely szerint a KP és/vagy NKB neuropeptidet kifejező idegsejtek egy része axo-szomatikus és axo-dendritikus kapcsolatot létesít GnRH neuronokkal (Hrabovszky és mtsai., 2010; Hrabovszky és mtsai., 2011; Molnár és mtsai., 2012; Hrabovszky és Liposits, 2013). A CART/KP/NKB/GnRH négyes immunfluoreszcens vizsgálatok elvégzését és a metszetek elemzését követően megállapítottuk, hogy a GnRH neuronokon észlelt KP/NKB-tartalmú axonális appozíciók egy része a CART neuropeptidet is expresszálja. Az **11. ábra D** képén egy CART/KP/NKB rost által beidegzett GnRH neuront láthatunk.

4.2.2. A KP, NKB és SP neuronok axo-axonális kapcsolatai GnRH idegsejtekkel

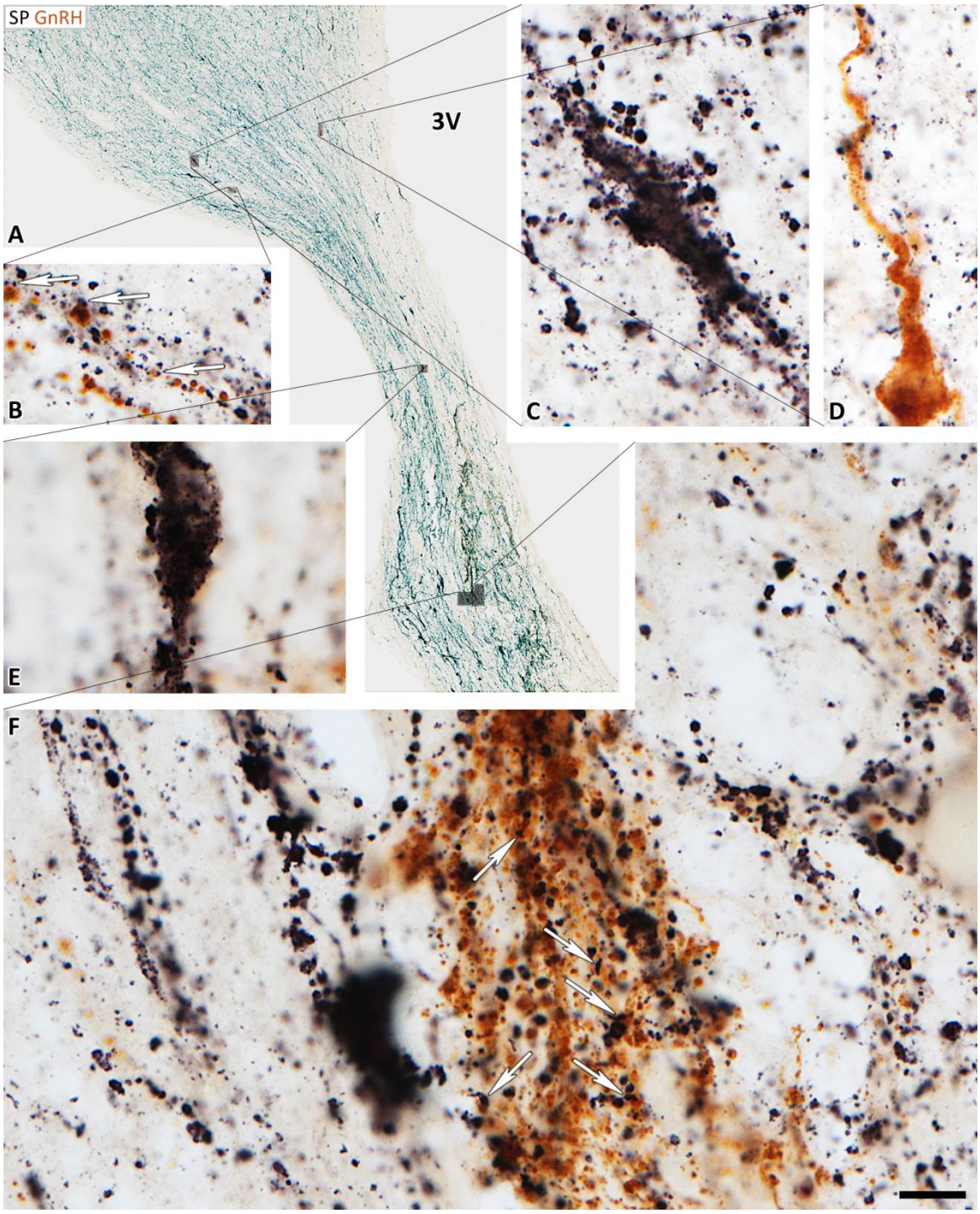
A szélesebb körben tanulmányozott axo-dendritikus és axo-szomatikus beidegzések mellett jelen tanulmányban különös hangsúlyt fektettünk a GnRH neuronok axo-axonális kapcsolatrendszerének morfológiai vizsgálatára. Munkánk során immunhisztokémiai kettős jelölést alkalmaztunk a hipofizeotróf GnRH axonok, illetve a KP-, NKB-, valamint SP-tartalmú rostok vizualizására.

A GnRH neuronok hipofízis felé vetülő axonjai legnagyobb sűrűségben a felszíni és mély hipofizeális portális kapillárisokkal jellemzett posztinfundibuláris eminentia (**14. ábra, A-I**) területén voltak megtalálhatók, de jelentős populációt alkottak a neurohipofízis felé vetülő infundibuláris nyél területén, és elérték magát a neurohipofízist is (**14. ábra, J-R**). A hipofizeális GnRH axonokat ugyanezeken a területeken KP-, NKB-, illetve SP-IR rostok vették körül (**14. ábra, A**, **D**, **G**, illetve **J**, **M**, **P**), és egy részük – a nagy nagyítású fénymikroszkópos képek tanúsága szerint – axo-axonális kapcsolatot létesített a hipofizeotróf GnRH axonokkal (**14. ábra, B, C**, **E, F**, **H, I**, illetve **K, L**, **N, O**, **Q, R**). A metszetek épségétől függően néhány esetben nyomon követhettük, hogy a párhuzamos lefutású, „leszálló” rostokat tartalmazó infundibuláris nyél (**15. ábra, A**) területén a KP, NKB, illetve SP rostok kötegekbe

rendeződve egymás, valamint számos esetben – főként a nyél elülső szakaszában – immunreaktív sejttestek mellett futnak (**15. ábra, C-E)**, és helyenként axo-axonális kapcsolatot létesítenek a GnRH neuronokkal (**15. ábra, B**, **F**). A SP/KP/NKB hármas immunfluoreszcens jelölést bemutató konfokális képek alapján elmondhatjuk, hogy a három neuropeptid az infundibuláris nyél (**14. ábra, S**) és a neurohipofízis (**14. ábra, T**) területén részlegesen kolokalizál az axonokban. Mivel ilyen kolokalizáció az Inf sejttestjeiben fordul elő, valószínűsíthető, hogy a fentebb említett, GnRH neuronokkal axo-axonális kapcsolatot létesítő, leszálló KP, NKB, illetve SP rostok – legalább részben – az Inf területéről származnak.



14. ábra: A GnRH-IR, KP-IR, NKB-IR és SP-IR axonok megoszlása a posztinfundibuláris eminentia, az infundibuláris nyél, valamint a neurohipofízis területén. Posztmenopauzás nőkben a DAB kromogénnel jelölt barna hipofizeotróf GnRH axonokhoz hasonlóan az immunhisztokémiai festés sűrű KP-IR (**A**-**C**), NKB-IR (**D**-**F**) és SP-IR (**G**-**I**) rostozatot jelöl (fekete színű ezüstözött Ni-DAB jel) az eminentia posztinfundibuláris részén a portális kapillárisok körül (**A**-**I**), illetve a neurohipofízis területén (**J**-**R**). A leszálló, neurohipofízist elérő rostok párhuzamos kötegeket is alkothatnak (**J**, **M**). A nagy nagyítású képeken látható fehér nyilak a KP-IR (**B**, **C**, **K**, **L**), NKB-IR (**E**, **F**, **N**, **O**) vagy SP-IR (**H**, **I**, **Q**, **R**) axonok és a GnRH-IR rostok közötti kontaktusokat jelölik. A hármas immunfluoreszcens festés eredménye szerint a GnRH-IR axonokkal feltételezhetően kapcsolatot létesítő KP-IR (piros), NKB-IR (kék) és SP-IR (zöld) rostok részben azonosak (fehér szín az **S**, illetve fehér nyilak a **T** képen), és valószínűleg az infundibuláris magból erednek, ahol e három neuropeptid gyakran kolokalizál (Hrabovszky és mtsai., 2013). Lépték: A, D, G, J, M, P: 60 μm; B, C, E, F, H, I, K, L, N, O, Q, R; 10 μm; S: 30 μm; T: 6 μm.



15. ábra: Az infundibuláris nyélben leszálló SP-IR és GnRH-IR rostok immunhisztokémiai megjelenítése. Egy posztmenopauzás nő jobb oldali hipotalamuszának koronális metszetén, melyen hosszan követhető az infundibuláris nyél, kettős immunhisztokémiai jelölést végeztünk. A SP-IR idegelemek fekete (Ni-DAB festést követő ezüst/arany intenzifikáció), a GnRH neuronok és rostrendszerük barna (DAB kromogén) színben látszanak. A párhuzamos, hosszanti lefutású SP-IR és GnRH-IR axonok kötegekbe rendeződnek, és mélyen az infundibuláris nyélben futnak; számos közülük eléri a neurohipofízist is (**A**). A nagy nagyítású képeken jól látszik, hogy a SP-IR axonok sűrűn körülveszik az immunreaktív sejttesteket (**C**, **D**, **E**), és gyakran kontaktusokat képeznek a GnRH neuronok rostjaival (fehér nyilak, **B**, **F**), megteremtve ezzel egy parakrin kommunikáció lehetőségét. Léptéк: A: 420 µm; B-F: 10 µm.

5. Az eredmények megvitatása

5.1. Fajok közötti neurokémiai különbségek: az emberi KP neuronok által kifejezett neuropeptidek lehetséges szerepe a reprodukció szabályozásában

A mediobazális hipotalamusz területén lévő KP neuronok ko-transzmitter-fenotípusa a fajok között sok esetben eltér. A tachykininek családjába tartozó NKB peptid KP idegsejtekben való kifejeződése azonban általánosnak mondható laboratóriumi állatokban és emberben egyaránt. Emberben az NKB szaporodásban betöltött nélkülözhetetlen szerepét igazolja, hogy a *TAC3*, illetve *TAC3R* génekben bekövetkező funkcióvesztéses mutációk hipogonadotrop hipogonadizmust okoznak, mely súlyos reproduktív deficittel jár (Topaloglu és mtsai., 2009). Klinikai tanulmányok arra utalnak, hogy az NKB/NK3R jelátvitel újszülött korban, a szexuális fejlődés korai szakaszában igen kritikus fontosságú, idővel azonban a reproduktív tengely működésére gyakorolt hatásának jelentősége csökken (Gianetti és mtsai., 2010). Lehetséges, hogy egy másik tachykinin peptid, a SP (Hrabovszky és mtsai., 2013), illetve más neurokinin receptorok (NK1R, NK2R) humán KP sejtekben való kifejeződése éppen az NKB/NK3R szignalizáció csökkenő hatását kompenzálja.

A KP és NKB mellett a harmadik, igen intenzíven tanulmányozott neuropeptid az endogén opioidok családjába tartozó dinorfin. Laboratóriumi állatokban a KP neuronok legnagyobb része az NKB mellett a Dyn-t is expresszálja; e három, az idegsejtekben egyidejűleg kifejeződő neuropeptid képezi a „KNDy terminológia" (Lehman és mtsai., 2010a) és a GnRH pulzusgenerátor „single-neuron" modelljének (Navarro és mtsai., 2009; Ohkura és mtsai., 2009; Wakabayashi és mtsai., 2010) alapját. Így tehát meglepő, hogy emberben a KP neuronok csak igen kis hányada fejezi ki a Dyn-t fiatal férfiakban (Hrabovszky és mtsai., 2012) és posztmenopauzás nőkben egyaránt – némiképp megkérdőjelezve a Dyn általános szerepét a GnRH és LH epizodikus szekréciójának szabályozásában. Nem kizárható azonban, hogy emberben a KP és NKB sejtek egy részében detektált – szintén az opioid peptidek családjába tartozó – pENK helyettesítheti a laboratóriumi állatokban kifejeződő Dyn (egyes) funkcióit.

A CART peptidet a humán KP és NKB neuronok egy jelentős része expresszálja. Hasonló ko-expressziós fenotípus laboratóriumi állatokban nem figyelhető meg (True és mtsai., 2013). A CART humán KP és NKB sejtekben való jelenléte tehát – a már

említett neuropeptid-fenotípus-beli eltérések mellett – egy újabb fajok közötti neurokémiai különbségre utal.

A CART számos neuroendokrin szabályozás alatt álló folyamat működését befolyásolja (Rogge és mtsai., 2008); például a termoregulációban betöltött szerepe mellett, a táplálékfelvétel és a testsúlyszabályozásban is fontos szerepet játszik – bár ez a szerep az irodalmi adatok szerint igen ellentmondásos. Patkányokban és emberben a CART a laterális hipotalamuszban az orexigén (Ludwig és mtsai., 1998) hatású melanin-koncentráló hormont termelő idegsejtekben expresszálódik (Elias és mtsai., 2001; Menyhért és mtsai., 2007). Ugyanakkor rágcsálókban az ARC területén lévő anorexigén hatású α-MSH-t termelő POMC neuronokban is kifejeződik (Elias és mtsai., 1998a), ahol a táplálékmegvonást követően a CART mRNS-szintje lecsökken (True és mtsai., 2013). Érdekes azonban, hogy majmokban a rágcsáló POMC neuronokkal analóg sejtcsoport nem tartalmaz CART peptidet (Grayson és mtsai., 2006); sőt emberben a CART az orexigén szereppel bíró AGRP/NPY rendszer idegsejtjeiben termelődik (Menyhért és mtsai., 2007). Ezt a megfigyelést jelen tanulmányban is megerősítettünk, és azt is, hogy az általunk detektált CART/NKB neuronok nem azonosak az említett CART/AGRP idegsejtekkel. További ellentmondásos adat, hogy a CART intrahipotalamikus – az ARC, illetve a ventromediális magba való – beadása serkenti (Abbott és mtsai., 2001; Kong és mtsai., 2003), míg az agykamrába juttatott CART peptid csökkenti a táplálékfelvételt (Kristensen és mtsai., 1998; Lambert és mtsai., 1998; Abbott és mtsai., 2001).

A CART a metabolikus folyamatok szabályozása mellett a reproduktív tengely működésére is hatást gyakorol: energiaszegény körülmények (éhezés, szoptatás) között ugyanis valószínűleg hozzájárul a szaporodás gátlásához (True és mtsai., 2013). Ennek morfológiai bizonyítéka lehet, hogy patkányokban és hörcsögökben a CART-IR rostok – melyek nagy része α-MSH immunreaktivitást is mutat (True és mtsai., 2013), tehát valószínűleg ARC-eredetű (Elias és mtsai., 1998a) – kontaktust képeznek a GnRH neuronokkal (Leslie és mtsai., 2001; Rondini és mtsai., 2004; True és mtsai., 2013). Elektrofiziológiai kísérletek eredményei azt mutatják, hogy a CART egerekben a GnRH neuronok 15%-át (Roa és Herbison, 2012), míg patkányokban azok 75%-át (True és mtsai., 2013) képes serkenteni. Kalóriamegvonás hatására csökken a CART expressziós szintje, valamint a CART-IR neuronok száma is az AVPV és az ARC területén (True és mtsai., 2013; Kristensen és mtsai., 1998), mely valószínűleg az említett régiók felől a GnRH idegsejtekre érkező serkentő CART bemenetek számának csökkenésével jár.

A CART sejtek – a közvetlen szabályozás mellett – a GnRH neuronok működését indirekt módon is befolyásolhatják. Patkányokban a CART-IR rostok ugyanis kontaktust képeznek az ARC területén lévő KP idegsejtekkel (True és mtsai., 2013), petefészekirtott egerekben pedig serkentő hatást gyakorolnak azok működésére (True és mtsai., 2013). Fontos azonban hangsúlyozni, hogy a CART GnRH és KP neuronok működésére gyakorolt excitatórikus hatását csak rágcsálókban vizsgálták, a kísérletek eredményeiből főemlősökre vonatkozó következtetéseket levonni csak körültekintéssel érdemes. A KP-hez, NKB-hoz, valamint a SP-hez hasonlóan a CART autoreceptorokon, illetve posztszinaptikus peptidreceptorokon keresztül hatva is befolyásolhatja a GnRH és/vagy KP, illetve NKB neuronok működését. A CART efferens kommunikációban betöltött szerepe még nem ismert, a jelátvitel azonban feltehetően egy G-fehérjéhez kapcsolt receptor közvetítésén keresztül valósul meg (Rogge és mtsai., 2008).

Maga a neuropeptid dense-core vezikulumokba lokalizálódik (Smith és mtsai., 1997); annak eldöntéséhez azonban, hogy az általunk detektált CART/KP/NKB/SP-immunpozitivitást mutató axon varikozitásokban a neuropeptidek ugyanazokban, vagy esetleg más vezikulumokban találhatók-e, nagy felbontású morfológiai vizsgálatokat kell végezni. Valószínű azonban, hogy az ugyanazon axonban található neuropeptidek ürülése – a varikozitáson belüli lokalizációjuktól függetlenül – egyszerre történik meg, az együtt szekretálódó neuropeptidek abszolút és relatív aránya pedig igen fontos információt hordozhat a beidegzett sejtek működésének szabályozásához. A neuronok peptidtartalmának, illetve a peptidszekréció mechanizmusának ismerete ezért alapvető fontosságú nem csak a sejttestek, hanem az axon varikozitások és a terminálisok szintjén is.

A humán KP és NKB neuronokban kifejeződő – ugyanakkor a laboratóriumi állatok KP sejtjeiben nem detektálható – SP és CART jelenléte arra utal, hogy az emberi KP sejtek az ösztrogénhatás GnRH neuronok felé történő közvetítéséhez más neuropeptid jelátviteli rendszereket használnak, így emberben a GnRH pulzusgenerálás finomszabályozása a laboratóriumi állatokétól nagymértékben eltérhet. Ennek tükrében a humán mintákon végzett morfológiai vizsgálatok jelentősége megnő, az emberi KP neuronok neurokémiai tulajdonságainak megismerése pedig közelebb vihet a reprodukció szempontjából kulcsfontosságú szerepet játszó ösztrogénhatás közvetítésének, valamint az epizodikus GnRH/LH szekréció szabályozásának megértéséhez.

5.2. Az együtt kifejeződő neuropeptidek sejten belüli megoszlása: kolokalizációs arányok a perikarionok és az axonok szintjén

A korábbi kvantitatív kolokalizációs tanulmányok főként a ko-transzmitterek perikarionális szinten való kifejeződésére fókuszáltak, a – szekréció szempontjából valószínűleg nagyobb jelentőségű – axon varikozitásokban, illetve axonterminálisokban tapasztalható ko-expresszió mértékének megbecsülésére eddig kevesen vállalkoztak. Ezért egy új módszert dolgoztunk ki a varikozitásokban detektálható kolokalizációs jelenségek számszerűsítéséhez. A KP-IR és NKB-IR perikarionokban, illetve rostokban lévő CART-immunpozitivitás arányának meghatározására irányuló kvantitatív elemzés eredményei azt mutatják, hogy a CART jel – sejttestekben való előfordulásához képest – axon varikozitásokban kevésbé gyakori. Ez arra enged következtetni, hogy a CART peptidet szintetizáló KP és NKB neuronokból a CART egy része valószínűleg nem szállítódik ki axonokba; ez lehet az oka az AGRP-IR rostokban detektálható CART sejttestekben kimutatható CART-hoz képest (Menyhért és mtsai., 2007) alacsony kolokalizációs arányának is. Az, hogy az axonokban való CART ko-expresszió mértéke eltérő hormonális viszonyok között változik-e, és ha igen, miképp függ a reproduktív állapottól, további vizsgálati irányt jelenthet.

A KP-IR és NKB-IR axonokban tapasztalható, a sejttestekhez képest alacsony szintű CART expresszió nem egyedülálló jelenség. Az emberi hipotalamusz KP-IR és NKB-IR neuronjainak egy része SP-t is kifejez – a legnagyobb arányú ko-expressziós mintázat a posztmenopauzás női mintákban detektálható, ahol a KP-IR sejtek 31%-a, míg az NKB-IR neuronok 25%-a szintetizálja a SP-t (Hrabovszky és mtsai., 2013). A kolokalizáció az axonok szintjén is tetten érhető: mind az Inf, mind az InfS területén az egyszeresen immunpozitív varikozitások mellett egyértelműen megtalálhatóak a kettősen jelölődő, valamint a három neuropeptidet együttesen kifejező rostok is – azonban a sejttestekhez képest sokkal alacsonyabb arányban. Valószínűsíthető tehát, hogy posztmenopauzás nőkben a KP/NKB/SP neuronokból eredő rostok nagy része már csak egy vagy kettő neuropeptidet tartalmaz, felvetve annak a lehetőségét, hogy az együtt szintetizálódó neuropeptidek axonális transzportja és a neurotranszmisszóban való részvétele a neuronok funkcionális állapotától függhet. A jövő fontos feladata lesz meghatározni, hogy adott reproduktív állapothoz a – többek között a GnRH axonokkal valószínűleg autokrin vagy parakrin módon kommunikáló – rostokhoz milyen neuropeptid-ko-expressziós mintázat tartozik.

A KP és NKB közötti kolokalizáció mértéke is magasabb sejttestekben, mint axonokban. A rostokban detektált viszonylag alacsony KP/NKB ko-expresszió összhangban áll korábbi megfigyeléseinkkel, miszerint az Inf területén többnyire egyszeresen jelölődő KP-IR és NKB-IR axonok detektálhatók (Hrabovszky és mtsai., 2010; Hrabovszky és mtsai., 2011). Hasonló jelenséget tapasztaltak True és munkatársai is: egerekben az ARC régióban lévő KP és NKB perikarionok csaknem teljes átfedése mellett az EM területén található KP-IR rostok csupán 39%-a, míg az NKB-IR axonok csupán 43%-a fejezte ki egyidejűleg a másik neuropeptidet is (True és mtsai., 2011). Emberben a GnRH neuronokkal appozíciót képező KP és NKB rostok nagy része is csak az egyik neuropeptidet expresszálja; a GnRH sejtekkel kontaktust képező kolokalizáló KP/NKB varikozitások aránya azonban a két nemben eltér: míg posztmenopauzás nőkben a beidegző axonok 25-30%-a mindkét neuropeptidet kifejezi, addig idős férfiakban ez az arány csak 8-10% (Hrabovszky és mtsai., 2011).

Az axonokban tapasztalt, a sejttestekhez képest alacsony neuropeptid-ko-expressziónak (illetve sok egyszeresen jelölődő rost detektálásának) számos oka lehet. Egyrészt, az immunreaktív axonok egy része olyan hipotalamikus vagy extrahipotalamikus régiókból is vetülhet az Inf területére, ahol a neuropeptidek nem szintetizálódnak együtt. Másrészről, ha a neuropeptidek ugyan együtt is szintetizálódnak, azok axonok felé történő transzportjának, degradációjának vagy ürülésének paraméterei különbözhetnek, adott körülmények között változhatnak, és az aktuális állapotot jellemezhetik. A pillanatnyi hormonális állapotot tükröző kolokalizációs mintázat fontos információul szolgálhat a beidegzett sejtek működésének szabályozásához.

5.3. Az axo-axonális kapcsolatok jelentősége a GnRH neuronok működésének szabályozásában

Összehasonlító morfológiai vizsgálatok eredményeinek tanúsága szerint a hipofizeotróf GnRH axonok a különböző emlősfajokban kissé eltérő anatómiai vetületeket képezhetnek. Míg ezek a rostok patkányokban az EM külső zónájában végződnek, majomban és emberben a hipofízisnyélen keresztül a vetületek a neurohipofízist is elérik (King és Anthony, 1984); majmokban ráadásul a KP axonokkal kötegeket képezve együtt vetülnek a hátsó hipofízis területére (Ramaswamy és mtsai., 2009). Jelen tanulmányban bemutattuk, hogy posztmenopauzás nőkben a hipofizeotróf GnRH axonokkal kötegeket alkotva a KP-IR rostok mellett NKB-IR és SP-IR axonok is futnak, és számos esetben axo-axonális kontaktusokat képeznek a GnRH rostokkal a posztinfundibuláris eminentia, a nyél és a neurohipofízis területén is. A leszálló KP-IR, NKB-IR és SP-IR rostok egy része ráadásul azonos, mely egyértelműen utal Inf-beli eredetükre, ahol ezek a neuropeptidek részben kolokalizálnak (Hrabovszky és mtsai., 2013).

A szoros anatómiai kapcsolat lehetővé teszi a peptiderg axonok közötti, valószínűleg igen jelentős parakrin kommunikációt. Mivel ezek az egymással kommunikáló rostok kötegeket formálva egészen a neurohipofízis területéig futnak, lehetséges, hogy az axonokból ürülő neuropeptidek a rövid portális vénákon keresztül az adenohipofízisbe kerülve annak gonadotrop működésére vannak hatással. Ugyanakkor a szekretált peptidek a posztinfundibuláris eminentia portális kapillárisain, illetve az infundibuláris nyél tuberális vénáin keresztül a szisztémás keringésbe is bejuthatnak (Duvernoy és mtsai., 1971). Birkákban az EM külső zónájába vetülő (pl. galanin, NPY, SP) idegsejtek neuropeptid-tartalma nem ürül szükségszerűen a hipofízis portális ereibe (Clarke és mtsai., 1993), és ugyanez lehet a helyzet a főemlősök esetében is.

Az EM/posztinfundibuláris eminentia területén az axonok között zajló feltehetően parakrin kommunikáció igen fontos szerepet játszik a neuroendokrin szabályozásban (Fuxe és mtsai., 1986); funkcionális jelentősége azonban pusztán morfológiai vizsgálatokkal nehezen alátámasztható, ultrastrukturális szinten ugyanis jól karakterizált szinapszis axo-axonális kapcsolat esetében nem detektálható (Kawakami és mtsai., 1998b; Ciofi és mtsai., 2006; Matsuyama és mtsai., 2011). Bár a GnRH axonterminálisokon jelenlévő specifikus receptorok immunhisztokémiai módszerekkel

történő kimutatása nagyban hozzájárulna a parakrin kommunikáció meglétének igazolásához, a szabályozás sokszor indirekt volta miatt a bizonyítékot többnyire funkcionális vizsgálatok eredményei szolgáltatják. Patkányokban a mediobazális hipotalamusz területén nem találhatók meg a GnRH neuronok perikarionjai, viszont a hipofizeotróf GnRH axonok igen (Sétáló és mtsai., 1976); az e régióból származó *in vitro* explantátumok az axonális szintű GnRH szekréciót befolyásoló hatásokat vizsgáló farmakológiai tanulmányokhoz kiválóan alkalmazhatók. Például, az EM területén található GnRH terminálisok juxtapozíciót képeznek glutamáterg axonokkal (Kawakami és mtsai., 1998b; Lin és mtsai., 2003) és kifejezik a KA2, illetve az NR1 ionotrop glutamát receptor alegységeket (Kawakami és mtsai., 1998b); *in vitro* kísérletek eredményei pedig azt mutatják, hogy glutamáterg drogok serkentik a Ca^{2+}-függő GnRH-ürülést az EM-ból (Kawakami és mtsai., 1998a). Érdemes megjegyzni, hogy ebben a kapcsolatban a glutamát forrásául – legalábbis részben – maga a GnRH neuron szolgálhat, ugyanis felnőtt hím patkányoknál a GnRH sejtek glutamáterg fenotípust mutatnak és vGluT2-t fejeznek ki (Hrabovszky és mtsai., 2004). Az NPY – a patkányokban és emberben is kiválóan detektálható axo-szomatikus és axo-dendritikus kontaktusok mellett (Tsuruo és mtsai., 1990; Dudás és mtsai., 2000) – úgy tűnik, hogy szintén képes kifejteni hatását a GnRH axonteminálisok szintjén. Patkányokban az EM területén az NPY-IR és GnRH-IR idegsejtek között direkt kontaktusok figyelhetők meg (Li és mtsai., 1999), a GnRH axonterminálisok kifejezik az Y1 receptort (Li és mtsai., 1999) és NPY receptor agonista hatására GnRH ürül az EM fragmentumokból (Kalra és mtsai., 1992).

A KISS1R jelenlétét a GnRH axonterminálisokon immunhisztokémiai módszerekkel ugyan még nem sikerült kimutatni, viszont számos indirekt bizonyíték utal arra, hogy a KP a GnRH terminálisokon hatva befolyásolhatja a pulzatilis GnRH szekréciót. Egyrészről a KP-IR axonok szoros kapcsolatban állnak az EM területén lévő GnRH rostokkal kecskében (Matsuyama és mtsai., 2011), majomban (Ramaswamy és mtsai., 2008) és emberben (Hrabovszky és mtsai., 2010) egyaránt. Másrészről vad típusú egerekben a KP serkenti az EM fragmentumokból a GnRH ürülését, a Kiss1R-mutáns állatokban viszont a szekréció elmarad (d'Anglemont de Tassigny és mtsai., 2008). Ez az *in vitro* tapasztalt KP hatás független az akciós potenciál generálásától, éppen ezért tetrodotoxin jelenlétében is fenntartható (d'Anglemont de Tassigny és mtsai., 2008).

Számos kísérlet eredménye utal arra, hogy az axo-axonális kommunikáció lehet az elsődleges mechanizmus, melyen keresztül a KNDy neuronok a pulzatilis GnRH szekréciót befolyásolják. Egyrészről, majmoknál a KP EM-ba történő ürülése epizodikus, és az LH pulzatilis szekréciójával szinkronban következik be (Keen és mtsai., 2008). Másrészről, egerekben a KP perifériális beadása nem indukál c-Fos expressziót a GnRH neuronokban a preoptikus régióban (Mikkelsen és mtsai., 2009), viszont gyors LH szekréciót eredményez (Matsui és mtsai., 2004; Navarro és mtsai., 2005a; Shahab és mtsai., 2005; Mikkelsen és mtsai., 2009), mely azonban GnRH antagonista hatására felfüggeszthető (Mikkelsen és mtsai., 2009). Mindezeket figyelembe véve tehát feltételezhető, hogy a KP a vér-agy gáton kívül, valószínűleg az EM területén hatva befolyásolja a GnRH szekréciót. Meg kell azonban említeni, hogy a KP más, vér-agy gát mentes területeken (cirkumventrikuláris szervek) is kifejtheti hatását, pl. az OVLT régiójában, ahol egerekben dendritikus tulajdonsággal rendelkező GnRH nyúlványok kiterjedt hálózata figyelhető meg; a közvetlenül ezeket a nyúlványokat érő KP a GnRH neuronok elektromos aktiválódásához, valamint c-Fos expresszióhoz vezet (Herde és mtsai., 2011). Érdemes azonban megjegyezni, hogy a humán OVLT régió GnRH-IR idegrostok általi innervációja nem olyan kifejezett, mint rágcsálókban (King és Anthony, 1984), ezért emberben a KP szisztémás beadását követő LH szekréció (Dhillo és mtsai., 2005; Dhillo és mtsai., 2007) valószínűleg a KP hipofizeotróf GnRH axonokra gyakorolt serkentő hatása révén valósul meg.

A KP-IR axonokhoz hasonlóan az NKB-IR idegrostok is kontaktust képeznek a GnRH-IR axonokkal a posztinfundibuláris eminentia, a nyél és a neurohipofízis területén. Hasonló appozíciókat már leírtak patkányok esetében is az EM-ban (Krajewski és mtsai., 2005; Ciofi és mtsai., 2006), ahol a GnRH-IR axonok az NKB receptorát (NK3R) is kifejezték (Krajewski és mtsai., 2005). A GnRH pulzusgenerátor széles körben elfogadott modellje szerint a feltételezett pacemaker KNDy neuronok GnRH sejtek felé közvetített végső kimeneti jelét a KP szolgáltatja (Navarro és mtsai., 2009; Wakabayashi és mtsai., 2010), és az NKB GnRH neuronokra gyakorolt közvetlen hatása kérdéses. Mivel az NK3 receptort a KNDy idegsejtek kifejezik, egerekben NK3R agonista (senktide) hatására a KP neuronok aktiválódnak, hasonló aktiváció azonban GnRH sejtek esetében nem tapasztalható (Navarro és mtsai., 2011b). Mindezek alapján tehát valószínűsíthető, hogy az NKB/NK3R jelátviteli útvonal főleg a KNDy neuronok egymás közötti kommunikációjában játszik fontos szerepet, de lehetséges, hogy az NKB szabályozza az EM területén lévő NKB axonterminálisokat is. Egy egereken

végzett kísérlet viszont azt mutatta, hogy a senktide közvetlenül – tehát a KP szignalizáció nélkül – is képes kiváltani GnRH ürülését az EM-ból (Gaskins és mtsai., 2013). Érdemes azonban ebben az esetben is alapos figyelmet fordítani a fajok közötti különbségekre, rhesusmajmokban ugyanis az NKB hatására történő GnRH szekréció a KISS1R deszenzitizálásával erőteljesen gyengíthető (Ramaswamy és mtsai., 2011). A SP a feltételezett pulzusgenerátor működésére ható neuronális rendszerek egy valószínűsíthető tagja lehet; nem ismert azonban, hogy a pulzatilis GnRH szekrécióra gyakorolt hatása közvetlenül a GnRH terminálisokon érvényesül-e, vagy közvetett módon, autokrin/parakrin szabályozás révén, más neuropeptidek axonokból történő ürülését elősegítve valósul-e meg.

Az axo-axonális kommunikáció mechanizmusának jobb megértéséhez elengedhetetlen az említett neuropeptid (KP, NKB, SP)-receptorok (KISS1R, NK3R, NK1R) sejten belüli lokalizációjának megismerése.

6. Összefoglalás

A mediobazális hipotalamuszban elhelyezkedő, KP-t szintetizáló neuronok fontos szerepet játszanak a reprodukció központi szabályozásában. Laboratóriumunkban végzett immunhisztokémiai kísérletek eredményei szerint a humán KP neuronok ko-transzmitter-fenotípusa számos esetben eltér a laboratóriumi állatokban megfigyeltektől. Míg más fajokban az ARC KP neuronok legnagyobb része NKB-t és Dyn-t is kifejez („KNDy terminológia"), addig emberben a KP sejtek jelentős hányada NKB-t ugyan expresszál, de a Dyn-nal való kolokalizáció aránya csak igen kis mértékű. Ezzel szemben a humán KP és NKB sejtek nagy része SP-t is szintetizál, miközben hasonló ko-expressziós fenotípus laboratóriumi állatoknál nem figyelhető meg.

Tekintettel a fajok között fennálló eddig megismert különbségekre, átfogó immunfluoreszcens vizsgálatokat végeztünk a humán KP és NKB neuronok ko-transzmitter-fenotípusának meghatározására. Megfigyeléseink szerint, posztmenopauzás nőkben a KP és NKB sejtek gyakran CART-ot is kifejeznek: a KP-IR perikarionok ~48%-a, az NKB-IR sejttestek 30%-a tartalmaz CART jelet, az általunk detektált összes sejttest 24%-a pedig mindhárom neuropeptidet expresszálja. A kolokalizációt rostok szintjén is megfigyeltük: a KP-IR axonok 17%-a, az NKB-IR varikozitások ~6%-a expresszál CART-ot, CART/KP/NKB-immunpozitivitást pedig a rostok ~5%-a mutat. Bemutattuk, hogy a CART-tartalmú KP és NKB rostok i) egy része SP-t is kifejez; ii) kontaktust képeznek más, az Inf területén található peptiderg neuronokkal (beleértve a GnRH idegsejteket is); iii) különböznek a CART-tartalmú AGRP-IR rostoktól; iv) és az InfS felé vetülnek.

Idős férfiakban a KP és NKB neuronok egy kis hányada – az egér RP3V régiójában lévő KP sejtekhez hasonlóan – pENK-t is kifejez. A KP sejttestek ~2%-a, és az NKB sejttestek 12,5%-a, valamint a KP-IR axonok ~5%-a és az NKB-IR varikozitások ~6%-a tartalmaz pENK jelet.

Az emberi KP és NKB sejtek további karakterizálása során kiderült, hogy azok nem tartalmaznak SS-t és – a laboratóriumi állatokhoz hasonlóan – AGRP-t, α-MSH-t, CCK-t, NPY-t és NT-t; viszont – rágcsálókkal ellentétben – nem expresszálnak galanint és TH-t sem.

Kísérleteinkben a KP neuronok kapcsolatrendszerét is vizsgáltuk, kiemelt figyelmet fordítva a GnRH szekréció szabályozásában valószínűleg igen fontos szerepet

játszó axo-axonális – feltehetően parakrin – kommunikáció morfológiai bizonyítékaira. Megfigyeléseink szerint, a hipofizeotróf GnRH axonokat a posztinfundibuláris régióban és a neurohipofízis területén KP-, NKB-, illetve SP-IR – feltételezhetően részben azonos populációt alkotó – rostok veszik körül, melyek számos esetben axo-axonális kapcsolatot létesítenek a GnRH axonokkal.

7. Summary

Hypothalamic peptidergic neurons using KP for communication are critically involved in the regulation of mammalian reproduction. Recent immunohistochemical experiments from our laboratory established that the neurochemical properties of human KP neurons are often distinct from those of laboratory species. Large subsets of human KP neurons synthesize NKB, as also shown in laboratory animals but Dyn, described in KP neurons of rodents and sheep, is found rarely in KP cells of humans. In contrast, SP is expressed in varying subsets of KP neurons in humans, but not reported in homologous ARC KP cells of other species. Our new colocalization studies of histological specimens from postmenopausal women provided evidence that KP-IR and NKB-IR perikarya often exhibit CART immunoreactivity; ~48% of KP-IR and 30% of NKB-IR cell bodies were also CART-positive and 24% of labeled perikarya contained all three signals. The colocalization phenomena were also detected at the level of fiber varicosities; 17% of KP-IR and ~6% of NKB-IR fiber varicosities exhibited CART signal and ~5% of all encountered varicosities were triple-labeled. Moreover, some CART-containing KP and NKB fibers were also immunopositive for SP, indicating the overlap between the CART-IR and the SP-IR populations of KP and NKB neurons. CART-IR KP and NKB neurons established contacts with other peptidergic cells, including GnRH-IR neurons and also sent projections to the InfS.

Small subsets of KP-IR and NKB-IR neurons also co-expressed pENK immunoreactivity in histological samples of aged males; pENK signal was detected in 12.5% of NKB-IR and ~2% of KP-IR neurons. Co-expression was also studied in fibers; pENK signal was contained in ~6% of NKB-IR and ~5% of KP-IR axon varicosities.

We have pursued the immunofluorescent characterization of human KP and NKB neurons by addressing the putative co-expression of a series of further neuropeptides and transmitters. These colocalization studies failed to reveal galanin in human KP and NKB neurons. This observation reveals a species difference from mice whose KNDy neurons express galanin mRNA and immunoreactivity. In line with previous observations made in mice or sheep, AGRP, NPY, α-MSH, NT and CCK were not detectable in human KP and NKB neurons and these neurons were

also immunonegative for SS. Finally, human KP and NKB cells did not contain the dopaminergic marker TH which was colocalized earlier with KP in the RP3V in rodents.

Axo-axonal communication seems to be crucial in the regulation of GnRH secretion. To explore the structural basis of this putative axo-axonal communication in humans, we analyzed the anatomical relationship of KP-IR, NKB-IR and SP-IR axon plexuses with hypophysiotropic GnRH fiber projections. KP-IR, NKB-IR and SP-IR plexuses intermingled, and established occasional contacts, with hypophysiotropic GnRH fibers in the postinfundibular eminence and through their lengthy course while descending within the infundibular stalk. Triple-immunofluorescent studies also revealed considerable overlap between the KP, NKB and SP signals in individual fibers, providing evidence that these peptidergic projections arise from neurons of the mediobasal hypothalamus where these neuropeptides often colocalize. These neuroanatomical observations indicate that the hypophysiotropic projections of human GnRH neurons are exposed to neurotransmitters/neuropeptides released by dense KP-IR, NKB-IR and SP-IR fiber plexuses.

8. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Sass Miklós professzor úrnak a támogatásáért.

Hálával tartozom konzulensemnek, Dr. Hrabovszky Eriknek a lehetőségért, hogy munkámat az ő vezetésével végezhettem, valamint mindazért a tanításért, tanácsért és segítségért, amellyel szakmai fejlődésemet támogatta.

Köszönöm Liposits Zsolt professzor úrnak, az Endokrin Neurobiológia Kutatócsoport vezetőjének, hogy kutatócsoportjában dolgozhattam.

Köszönöm az Endokrin Neurobiológia Kutatócsoport valamennyi tagjának, köztük Bardóczi Zsuzsanna, Farkas Imre, Kalló Imre, Maurnyi Csilla, Molnár Csilla, Sárvári Miklós, Savanyú Zsófia és Vastagh Csaba kollégáimnak a hasznos szakmai tanácsokat, a pozitív légkört és a kiváló hangulatot. Külön köszönöm Bekó Hajninak a magas színvonalú technikai segítséget.

Köszönöm családomnak és kedvesemnek támogató szeretetüket.

9. Irodalomjegyzék

Abbott, C.R., Rossi, M., Wren, A.M., Murphy, K.G., Kennedy, A.R., Stanley, S.A., Zollner, A.N., Morgan, D.G., Morgan, I., Ghatei, M.A., Small, C.J., and Bloom, S.R. (2001). Evidence of an orexigenic role for cocaine- and amphetamine-regulated transcript after administration into discrete hypothalamic nuclei. *Endocrinology* 142**,** 3457-3463.

Abe, J., Okamura, H., Ibata, Y., Motoyama, A., Wakabayashi, I., Ling, N., and Paull, W.K. (1990). Immunocytochemical demonstration of GAP-like immunoreactive neuronal elements in the human hypothalamus and pituitary. *Histochemistry* 94**,** 127-133.

Adachi, S., Yamada, S., Takatsu, Y., Matsui, H., Kinoshita, M., Takase, K., Sugiura, H., Ohtaki, T., Matsumoto, H., Uenoyama, Y., Tsukamura, H., Inoue, K., and Maeda, K. (2007). Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats. *J Reprod Dev* 53**,** 367-378.

Adams, T.E., Norman, R.L., and Spies, H.G. (1981). Gonadotropin-releasing hormone receptor binding and pituitary responsiveness in estradiol-primed monkeys. *Science* 213**,** 1388-1390.

Aiyer, M.S., Fink, G., and Greig, F. (1974). Changes in the sensitivity of the pituitary gland to luteinizing hormone releasing factor during the oestrous cycle of the rat. *J Endocrinol* 60**,** 47-64.

Amstalden, M., Coolen, L.M., Hemmerle, A.M., Billings, H.J., Connors, J.M., Goodman, R.L., and Lehman, M.N. (2010). Neurokinin 3 receptor immunoreactivity in the septal region, preoptic area and hypothalamus of the female sheep: colocalisation in neurokinin B cells of the arcuate nucleus but not in gonadotrophin-releasing hormone neurones. *J Neuroendocrinol* 22**,** 1-12.

Anthony, E.L., King, J.C., and Stopa, E.G. (1984). Immunocytochemical localization of LHRH in the median eminence, infundibular stalk, and neurohypophysis. Evidence for multiple sites of releasing hormone secretion in humans and other mammals. *Cell Tissue Res* 236**,** 5-14.

Barraclough, C.A. (1961). Production of anovulatory, sterile rats by single injections of testosterone propionate. *Endocrinology* 68**,** 62-67.

Barraclough, C.A., and Gorski, R.A. (1961). Evidence that the hypothalamus is responsible for androgen-induced sterility in the female rat. *Endocrinology* 68**,** 68-79.

Barry, J. (1976). Characterization and topography of LH-RH neurons in the human brain. *Neurosci Lett* 3**,** 287-291.

Barry, J. (1977). Immunofluorescence study of LRF neurons in man. *Cell Tissue Res* 181**,** 1-14.

Bartzen-Sprauer, J., Klosen, P., Ciofi, P., Mikkelsen, J.D., and Simonneaux, V. (2014). Photoperiodic co-regulation of kisseptin, neurokinin B and dynorphin in the hypothalamus of a seasonal rodent. *J Neuroendocrinol* 26**,** 510-520.

Bauer-Dantoin, A.C., Urban, J.H., and Levine, J.E. (1992). Neuropeptide Y gene expression in the arcuate nucleus is increased during preovulatory luteinizing hormone surges. *Endocrinology* 131**,** 2953-2958.

Bloch, B., Gaillard, R.C., Culler, M.D., and Negro-Vilar, A. (1992). Immunohistochemical detection of proluteinizing hormone-releasing hormone peptides in neurons in the human hypothalamus. *J Clin Endocrinol Metab* 74**,** 135-138.

Burger, L.L., Dalkin, A.C., Aylor, K.W., Haisenleder, D.J., and Marshall, J.C. (2002). GnRH pulse frequency modulation of gonadotropin subunit gene transcription in normal gonadotropes-assessment by primary transcript assay provides evidence for roles of GnRH and follistatin. *Endocrinology* 143**,** 3243-3249.

Burke, M.C., Letts, P.A., Krajewski, S.J., and Rance, N.E. (2006). Coexpression of dynorphin and neurokinin B immunoreactivity in the rat hypothalamus: Morphologic evidence of interrelated function within the arcuate nucleus. *J Comp Neurol* 498**,** 712-726.

Campbell, R.E., Ffrench-Mullen, J.M., Cowley, M.A., Smith, M.S., and Grove, K.L. (2001). Hypothalamic circuitry of neuropeptide Y regulation of neuroendocrine function and food intake via the Y5 receptor subtype. *Neuroendocrinology* 74**,** 106-119.

Campos, P., and Herbison, A.E. (2014). Optogenetic activation of GnRH neurons reveals minimal requirements for pulsatile luteinizing hormone secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111**,** 18387-18392.

Carmel, P.W., Araki, S., and Ferin, M. (1976). Pituitary stalk portal blood collection in rhesus monkeys: evidence for pulsatile release of gonadotropin-releasing hormone (GnRH). *Endocrinology* 99**,** 243-248.

Cheng, G., Coolen, L.M., Padmanabhan, V., Goodman, R.L., and Lehman, M.N. (2010). The kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cell population of the arcuate nucleus: sex differences and effects of prenatal testosterone in sheep. *Endocrinology* 151**,** 301-311.

Cheong, R.Y., Porteous, R., Chambon, P., Abraham, I., and Herbison, A.E. (2014). Effects of neuron-specific estrogen receptor (ER) alpha and ERbeta deletion on the acute estrogen negative feedback mechanism in adult female mice. *Endocrinology* 155**,** 1418-1427.

Christian, C.A., Mobley, J.L., and Moenter, S.M. (2005). Diurnal and estradiol-dependent changes in gonadotropin-releasing hormone neuron firing activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102**,** 15682-15687.

Christian, C.A., Pielecka-Fortuna, J., and Moenter, S.M. (2009). Estradiol suppresses glutamatergic transmission to gonadotropin-releasing hormone neurons in a model of negative feedback in mice. *Biol Reprod* 80**,** 1128-1135.

Ciofi, P., Leroy, D., and Tramu, G. (2006). Sexual dimorphism in the organization of the rat hypothalamic infundibular area. *Neuroscience* 141**,** 1731-1745.

Ciofi, P., and Tramu, G. (1990). Distribution of cholecystokinin-like-immunoreactive neurons in the guinea pig forebrain. *J Comp Neurol* 300**,** 82-112.

Clarke, I., Jessop, D., Millar, R., Morris, M., Bloom, S., Lightman, S., Coen, C.W., Lew, R., and Smith, I. (1993). Many peptides that are present in the external zone of the median eminence are not secreted into the hypophysial portal blood of sheep. *Neuroendocrinology* 57**,** 765-775.

Clarke, I.J., and Cummins, J.T. (1982). The temporal relationship between gonadotropin releasing hormone (GnRH) and luteinizing hormone (LH) secretion in ovariectomized ewes. *Endocrinology* 111**,** 1737-1739.

Clarkson, J., D'anglemont De Tassigny, X., Moreno, A.S., Colledge, W.H., and Herbison, A.E. (2008). Kisspeptin-GPR54 signaling is essential for preovulatory gonadotropin-releasing hormone neuron activation and the luteinizing hormone surge. *J Neurosci* 28**,** 8691-8697.

Clarkson, J., and Herbison, A.E. (2006). Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 147**,** 5817-5825.

Clarkson, J., and Herbison, A.E. (2011). Dual phenotype kisspeptin-dopamine neurones of the rostral periventricular area of the third ventricle project to gonadotrophin-releasing hormone neurones. *J Neuroendocrinol* 23**,** 293-301.

Conti, F., De Biasi, S., Fabri, M., Abdullah, L., Manzoni, T., and Petrusz, P. (1992). Substance P-containing pyramidal neurons in the cat somatic sensory cortex. *J Comp Neurol* 322**,** 136-148.

Counis, R., Laverriere, J.N., Garrel, G., Bleux, C., Cohen-Tannoudji, J., Lerrant, Y., Kottler, M.L., and Magre, S. (2005). Gonadotropin-releasing hormone and the control of gonadotrope function. *Reprod Nutr Dev* 45**,** 243-254.

Covenas, R., Martin, F., Salinas, P., Rivada, E., Smith, V., Aguilar, L.A., Diaz-Cabiale, Z., Narvaez, J.A., and Tramu, G. (2004). An immunocytochemical mapping of methionine-enkephalin-Arg(6)-Gly(7)-Leu(8) in the human brainstem. *Neuroscience* 128**,** 843-859.

Cravo, R.M., Margatho, L.O., Osborne-Lawrence, S., Donato, J., Jr., Atkin, S., Bookout, A.L., Rovinsky, S., Frazao, R., Lee, C.E., Gautron, L., Zigman, J.M., and Elias, C.F. (2011). Characterization of Kiss1 neurons using transgenic mouse models. *Neuroscience* 173**,** 37-56.

D'anglemont De Tassigny, X., Fagg, L.A., Carlton, M.B., and Colledge, W.H. (2008). Kisspeptin can stimulate gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release by a direct action at GnRH nerve terminals. *Endocrinology* 149**,** 3926-3932.

D'anglemont De Tassigny, X., Fagg, L.A., Dixon, J.P., Day, K., Leitch, H.G., Hendrick, A.G., Zahn, D., Franceschini, I., Caraty, A., Carlton, M.B., Aparicio, S.A., and Colledge, W.H. (2007). Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104**,** 10714-10719.

Dalkin, A.C., Haisenleder, D.J., Ortolano, G.A., Ellis, T.R., and Marshall, J.C. (1989). The frequency of gonadotropin-releasing-hormone stimulation differentially regulates gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology* 125**,** 917-924.

De Croft, S., Boehm, U., and Herbison, A.E. (2013). Neurokinin B activates arcuate kisspeptin neurons through multiple tachykinin receptors in the male mouse. *Endocrinology* 154**,** 2750-2760.

De Roux, N., Genin, E., Carel, J.C., Matsuda, F., Chaussain, J.L., and Milgrom, E. (2003). Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100**,** 10972-10976.

Dhillo, W.S., Chaudhri, O.B., Patterson, M., Thompson, E.L., Murphy, K.G., Badman, M.K., Mcgowan, B.M., Amber, V., Patel, S., Ghatei, M.A., and Bloom, S.R. (2005). Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. *J Clin Endocrinol Metab* 90**,** 6609-6615.

Dhillo, W.S., Chaudhri, O.B., Thompson, E.L., Murphy, K.G., Patterson, M., Ramachandran, R., Nijher, G.K., Amber, V., Kokkinos, A., Donaldson, M., Ghatei, M.A., and Bloom, S.R. (2007). Kisspeptin-54 stimulates gonadotropin release most potently during the preovulatory phase of the menstrual cycle in women. *J Clin Endocrinol Metab* 92**,** 3958-3966.

Dudás, B., and Merchenthaler, I. (2006). Three-dimensional representation of the neurotransmitter systems of the human hypothalamus: inputs of the gonadotrophin hormone-releasing hormone neuronal system. *J Neuroendocrinol* 18**,** 79-95.

Dudás, B., Mihály, A., and Merchenthaler, I. (2000). Topography and associations of luteinizing hormone-releasing hormone and neuropeptide Y-immunoreactive neuronal systems in the human diencephalon. *J Comp Neurol* 427**,** 593-603.

Dumalska, I., Wu, M., Morozova, E., Liu, R., Van Den Pol, A., and Alreja, M. (2008). Excitatory effects of the puberty-initiating peptide kisspeptin and group I metabotropic glutamate receptor agonists differentiate two distinct

subpopulations of gonadotropin-releasing hormone neurons. *J Neurosci* 28**,** 8003-8013.

Duvernoy, H., Koritke, J.G., and Monnier, G. (1971). [Vascularization of the posterior tuber in man and its relation to the tuber-hypophyseal vasculature]. *Journal of neuro-visceral relations* 32**,** 112-142.

Elias, C.F., Lee, C., Kelly, J., Aschkenasi, C., Ahima, R.S., Couceyro, P.R., Kuhar, M.J., Saper, C.B., and Elmquist, J.K. (1998a). Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron* 21**,** 1375-1385.

Elias, C.F., Lee, C.E., Kelly, J.F., Ahima, R.S., Kuhar, M., Saper, C.B., and Elmquist, J.K. (2001). Characterization of CART neurons in the rat and human hypothalamus. *J Comp Neurol* 432**,** 1-19.

Elias, C.F., Saper, C.B., Maratos-Flier, E., Tritos, N.A., Lee, C., Kelly, J., Tatro, J.B., Hoffman, G.E., Ollmann, M.M., Barsh, G.S., Sakurai, T., Yanagisawa, M., and Elmquist, J.K. (1998b). Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *J Comp Neurol* 402**,** 442-459.

Fekete, C.S., Strutton, P.H., Cagampang, F.R., Hrabovszky, E., Kalló, I., Shughrue, P.J., Dobó, E., Mihály, E., Baranyi, L., Okada, H., Panula, P., Merchenthaler, I., Coen, C.W., and Liposits, Z.S. (1999). Estrogen receptor immunoreactivity is present in the majority of central histaminergic neurons: evidence for a new neuroendocrine pathway associated with luteinizing hormone-releasing hormone-synthesizing neurons in rats and humans. *Endocrinology* 140**,** 4335-4341.

Foradori, C.D., Amstalden, M., Goodman, R.L., and Lehman, M.N. (2006). Colocalisation of dynorphin a and neurokinin B immunoreactivity in the arcuate nucleus and median eminence of the sheep. *J Neuroendocrinol* 18**,** 534-541.

Franceschini, I., Lomet, D., Cateau, M., Delsol, G., Tillet, Y., and Caraty, A. (2006). Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express estrogen receptor alpha. *Neurosci Lett* 401**,** 225-230.

Funes, S., Hedrick, J.A., Vassileva, G., Markowitz, L., Abbondanzo, S., Golovko, A., Yang, S., Monsma, F.J., and Gustafson, E.L. (2003). The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochem Biophys Res Commun* 312**,** 1357-1363.

Fuxe, K., Andersson, K., Harfstrand, A., Agnati, L.F., Eneroth, P., Janson, A.M., Vale, W., Thorner, M., and Goldstein, M. (1986). Medianosomes as integrative units in the external layer of the median eminence. Studies on grf/catecholamine and somatostatin/catecholamine interactions in the hypothalamus of the male rat. *Neurochem Int* 9**,** 155-170.

Gaskins, G.T., Glanowska, K.M., and Moenter, S.M. (2013). Activation of neurokinin 3 receptors stimulates GnRH release in a location-dependent but kisspeptin-independent manner in adult mice. *Endocrinology* 154**,** 3984-3989.

Genazzani, A.R., Bernardi, F., Pluchino, N., Begliuomini, S., Lenzi, E., Casarosa, E., and Luisi, M. (2005). Endocrinology of menopausal transition and its brain implications. *CNS Spectr* 10**,** 449-457.

Gianetti, E., Tusset, C., Noel, S.D., Au, M.G., Dwyer, A.A., Hughes, V.A., Abreu, A.P., Carroll, J., Trarbach, E., Silveira, L.F., Costa, E.M., De Mendonca, B.B., De Castro, M., Lofrano, A., Hall, J.E., Bolu, E., Ozata, M., Quinton, R., Amory, J.K., Stewart, S.E., Arlt, W., Cole, T.R., Crowley, W.F., Kaiser, U.B., Latronico, A.C., and Seminara, S.B. (2010). TAC3/TACR3 mutations reveal preferential activation of gonadotropin-releasing hormone release by neurokinin B in neonatal life followed by reversal in adulthood. *J Clin Endocrinol Metab* 95**,** 2857-2867.

Gogan, F., Beattie, I.A., Hery, M., Laplante, E., and Kordon, D. (1980). Effect of neonatal administration of steroids or gonadectomy upon oestradiol-induced luteinizing hormone release in rats of both sexes. *J Endocrinol* 85**,** 69-74.

Goodman, R.L., Lehman, M.N., Smith, J.T., Coolen, L.M., De Oliveira, C.V., Jafarzadehshirazi, M.R., Pereira, A., Iqbal, J., Caraty, A., Ciofi, P., and Clarke, I.J. (2007). Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. *Endocrinology* 148**,** 5752-5760.

Gottsch, M.L., Cunningham, M.J., Smith, J.T., Popa, S.M., Acohido, B.V., Crowley, W.F., Seminara, S., Clifton, D.K., and Steiner, R.A. (2004). A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology* 145**,** 4073-4077.

Grayson, B.E., Allen, S.E., Billes, S.K., Williams, S.M., Smith, M.S., and Grove, K.L. (2006). Prenatal development of hypothalamic neuropeptide systems in the nonhuman primate. *Neuroscience* 143**,** 975-986.

Guran, T., Tolhurst, G., Bereket, A., Rocha, N., Porter, K., Turan, S., Gribble, F.M., Kotan, L.D., Akcay, T., Atay, Z., Canan, H., Serin, A., O'rahilly, S., Reimann, F., Semple, R.K., and Topaloglu, A.K. (2009). Hypogonadotropic hypogonadism due to a novel missense mutation in the first extracellular loop of the neurokinin B receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 94**,** 3633-3639.

Han, S.K., Gottsch, M.L., Lee, K.J., Popa, S.M., Smith, J.T., Jakawich, S.K., Clifton, D.K., Steiner, R.A., and Herbison, A.E. (2005). Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J Neurosci* 25**,** 11349-11356.

Herbison, A.E. (1998). Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocr Rev* 19**,** 302-330.

Herbison, A.E. (2008). Estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons in the rodent: the case for the rostral periventricular area of the third ventricle (RP3V). *Brain Res Rev* 57**,** 277-287.

Herbison, A.E., and Theodosis, D.T. (1992). Localization of oestrogen receptors in preoptic neurons containing neurotensin but not tyrosine hydroxylase, cholecystokinin or luteinizing hormone-releasing hormone in the male and female rat. *Neuroscience* 50**,** 283-298.

Herde, M.K., Geist, K., Campbell, R.E., and Herbison, A.E. (2011). Gonadotropin-releasing hormone neurons extend complex highly branched dendritic trees outside the blood-brain barrier. *Endocrinology* 152**,** 3832-3841.

Hoffman, G.E., Le, W.W., Franceschini, I., Caraty, A., and Advis, J.P. (2011). Expression of fos and in vivo median eminence release of LHRH identifies an active role for preoptic area kisspeptin neurons in synchronized surges of LH and LHRH in the ewe. *Endocrinology* 152**,** 214-222.

Hrabovszky, E. (2013). Neuroanatomy of the Human Hypothalamic Kisspeptin System. *Neuroendocrinology*.

Hrabovszky, E., Borsay, B.A., Rácz, K., Herczeg, L., Ciofi, P., Bloom, S.R., Ghatei, M.A., Dhillo, W.S., and Liposits, Z. (2013). Substance P immunoreactivity exhibits frequent colocalization with kisspeptin and neurokinin B in the human infundibular region. *PLoS One***,** in press.

Hrabovszky, E., Ciofi, P., Vida, B., Horváth, M.C., Keller, E., Caraty, A., Bloom, S.R., Ghatei, M.A., Dhillo, W.S., Liposits, Z., and Kalló, I. (2010). The kisspeptin system of the human hypothalamus: sexual dimorphism and relationship with gonadotropin-releasing hormone and neurokinin B neurons. *Eur J Neurosci* 31**,** 1984-1998.

Hrabovszky, E., Kalló, I., Szlávik, N., Keller, E., Merchenthaler, I., and Liposits, Z. (2007). Gonadotropin-releasing hormone neurons express estrogen receptor-beta. *J Clin Endocrinol Metab* 92**,** 2827-2830.

Hrabovszky, E., and Liposits, Z. (2013). Afferent Neuronal Control of Type-I Gonadotropin Releasing Hormone Neurons in the Human. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4**,** 130.

Hrabovszky, E., Molnár, C.S., Sipos, M.T., Vida, B., Ciofi, P., Borsay, B.A., Sarkadi, L., Herczeg, L., Bloom, S.R., Ghatei, M.A., Dhillo, W.S., Kalló, I., and Liposits, Z. (2011). Sexual dimorphism of kisspeptin and neurokinin B immunoreactive neurons in the infundibular nucleus of aged men and women. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2**,** 80.

Hrabovszky, E., Shughrue, P.J., Merchenthaler, I., Hajszán, T., Carpenter, C.D., Liposits, Z., and Petersen, S.L. (2000). Detection of estrogen receptor-beta messenger ribonucleic acid and 125I-estrogen binding sites in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. *Endocrinology* 141**,** 3506-3509.

Hrabovszky, E., Sipos, M.T., Molnár, C.S., Ciofi, P., Borsay, B.A., Gergely, P., Herczeg, L., Bloom, S.R., Ghatei, M.A., Dhillo, W.S., and Liposits, Z. (2012).

Low Degree of Overlap Between Kisspeptin, Neurokinin B, and Dynorphin Immunoreactivities in the Infundibular Nucleus of Young Male Human Subjects Challenges the KNDy Neuron Concept. *Endocrinology* 153**,** 4978-4989.

Hrabovszky, E., Steinhauser, A., Barabás, K., Shughrue, P.J., Petersen, S.L., Merchenthaler, I., and Liposits, Z. (2001). Estrogen receptor-beta immunoreactivity in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. *Endocrinology* 142**,** 3261-3264.

Hrabovszky, E., Turi, G.F., Kalló, I., and Liposits, Z. (2004). Expression of vesicular glutamate transporter-2 in gonadotropin-releasing hormone neurons of the adult male rat. *Endocrinology* 145**,** 4018-4021.

Irwig, M.S., Fraley, G.S., Smith, J.T., Acohido, B.V., Popa, S.M., Cunningham, M.J., Gottsch, M.L., Clifton, D.K., and Steiner, R.A. (2004). Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology* 80**,** 264-272.

Kalló, I., Butler, J.A., Barkovics-Kalló, M., Goubillon, M.L., and Coen, C.W. (2001). Oestrogen receptor beta-immunoreactivity in gonadotropin releasing hormone-expressing neurones: regulation by oestrogen. *J Neuroendocrinol* 13**,** 741-748.

Kalló, I., Vida, B., Deli, L., Molnár, C.S., Hrabovszky, E., Caraty, A., Ciofi, P., Coen, C.W., and Liposits, Z. (2012). Co-localisation of kisspeptin with galanin or neurokinin B in afferents to mouse GnRH neurones. *J Neuroendocrinol* 24**,** 464-476.

Kalra, S.P., and Crowley, W.R. (1992). Neuropeptide Y: a novel neuroendocrine peptide in the control of pituitary hormone secretion, and its relation to luteinizing hormone. *Front Neuroendocrinol* 13**,** 1-46.

Kalra, S.P., Fuentes, M., Fournier, A., Parker, S.L., and Crowley, W.R. (1992). Involvement of the Y-1 receptor subtype in the regulation of luteinizing hormone secretion by neuropeptide Y in rats. *Endocrinology* 130**,** 3323-3330.

Karsch, F.J., and Foster, D.L. (1975). Sexual differentiation of the mechanism controlling the preovulatory discharge of luteinizing hormone in sheep. *Endocrinology* 97**,** 373-379.

Kauffman, A.S., Gottsch, M.L., Roa, J., Byquist, A.C., Crown, A., Clifton, D.K., Hoffman, G.E., Steiner, R.A., and Tena-Sempere, M. (2007). Sexual differentiation of Kiss1 gene expression in the brain of the rat. *Endocrinology* 148**,** 1774-1783.

Kawakami, S., Ichikawa, M., Murahashi, K., Hirunagi, K., Tsukamura, H., and Maeda, K. (1998a). Excitatory amino acids act on the median eminence nerve terminals to induce gonadotropin-releasing hormone release in female rats. *Gen Comp Endocrinol* 112**,** 372-382.

Kawakami, S.I., Hirunagi, K., Ichikawa, M., Tsukamura, H., and Maeda, K.I. (1998b). Evidence for terminal regulation of GnRH release by excitatory amino acids in the median eminence in female rats: a dual immunoelectron microscopic study. *Endocrinology* 139**,** 1458-1461.

Keen, K.L., Wegner, F.H., Bloom, S.R., Ghatei, M.A., and Terasawa, E. (2008). An increase in kisspeptin-54 release occurs with the pubertal increase in luteinizing hormone-releasing hormone-1 release in the stalk-median eminence of female rhesus monkeys in vivo. *Endocrinology* 149**,** 4151-4157.

King, J.C., and Anthony, E.L. (1984). LHRH neurons and their projections in humans and other mammals: species comparisons. *Peptides* 5 Suppl 1**,** 195-207.

King, J.C., Anthony, E.L., Fitzgerald, D.M., and Stopa, E.G. (1985). Luteinizing hormone-releasing hormone neurons in human preoptic/hypothalamus: differential intraneuronal localization of immunoreactive forms. *J Clin Endocrinol Metab* 60**,** 88-97.

Kinoshita, M., Tsukamura, H., Adachi, S., Matsui, H., Uenoyama, Y., Iwata, K., Yamada, S., Inoue, K., Ohtaki, T., Matsumoto, H., and Maeda, K. (2005). Involvement of central metastin in the regulation of preovulatory luteinizing hormone surge and estrous cyclicity in female rats. *Endocrinology* 146**,** 4431-4436.

Kirilov, M., Clarkson, J., Liu, X., Roa, J., Campos, P., Porteous, R., Schutz, G., and Herbison, A.E. (2013). Dependence of fertility on kisspeptin-Gpr54 signaling at the GnRH neuron. *Nat Commun* 4**,** 2492.

Knobil, E. (1980). The neuroendocrine control of the menstrual cycle. *Recent Prog Horm Res* 36**,** 53-88.

Knobil, E. (1990). The GnRH pulse generator. *Am J Obstet Gynecol* 163**,** 1721-1727.

Kong, W., Stanley, S., Gardiner, J., Abbott, C., Murphy, K., Seth, A., Connoley, I., Ghatei, M., Stephens, D., and Bloom, S. (2003). A role for arcuate cocaine and amphetamine-regulated transcript in hyperphagia, thermogenesis, and cold adaptation. *FASEB J* 17**,** 1688-1690.

Korach, K.S., Couse, J.F., Curtis, S.W., Washburn, T.F., Lindzey, J., Kimbro, K.S., Eddy, E.M., Migliaccio, S., Snedeker, S.M., Lubahn, D.B., Schomberg, D.W., and Smith, E.P. (1996). Estrogen receptor gene disruption: molecular characterization and experimental and clinical phenotypes. *Recent Prog Horm Res* 51**,** 159-186; discussion 186-158.

Kotani, M., Detheux, M., Vandenbogaerde, A., Communi, D., Vanderwinden, J.M., Le Poul, E., Brezillon, S., Tyldesley, R., Suarez-Huerta, N., Vandeput, F., Blanpain, C., Schiffmann, S.N., Vassart, G., and Parmentier, M. (2001). The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem* 276**,** 34631-34636.

Koylu, E.O., Couceyro, P.R., Lambert, P.D., Ling, N.C., Desouza, E.B., and Kuhar, M.J. (1997). Immunohistochemical localization of novel CART peptides in rat hypothalamus, pituitary and adrenal gland. *J Neuroendocrinol* 9**,** 823-833.

Krajewski, S.J., Anderson, M.J., Iles-Shih, L., Chen, K.J., Urbanski, H.F., and Rance, N.E. (2005). Morphologic evidence that neurokinin B modulates gonadotropin-releasing hormone secretion via neurokinin 3 receptors in the rat median eminence. *J Comp Neurol* 489**,** 372-386.

Krey, L.C., Butler, W.R., and Knobil, E. (1975). Surgical disconnection of the medial basal hypothalamus and pituitary function in the rhesus monkey. I. Gonadotropin secretion. *Endocrinology* 96**,** 1073-1087.

Kristensen, P., Judge, M.E., Thim, L., Ribel, U., Christjansen, K.N., Wulff, B.S., Clausen, J.T., Jensen, P.B., Madsen, O.D., Vrang, N., Larsen, P.J., and Hastrup, S. (1998). Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 393**,** 72-76.

Krsmanovic, L.Z., Hu, L., Leung, P.K., Feng, H., and Catt, K.J. (2010). Pulsatile GnRH secretion: roles of G protein-coupled receptors, second messengers and ion channels. *Mol Cell Endocrinol* 314**,** 158-163.

Krsmanovic, L.Z., Stojilkovic, S.S., and Catt, K.J. (1996). Pulsatile gonadotropin-releasing hormone release and its regulation. *Trends Endocrinol Metab* 7**,** 56-59.

Krsmanovic, L.Z., Stojilkovic, S.S., Merelli, F., Dufour, S.M., Virmani, M.A., and Catt, K.J. (1992). Calcium signaling and episodic secretion of gonadotropin-releasing hormone in hypothalamic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89**,** 8462-8466.

Kuiper, G.G., Enmark, E., Pelto-Huikko, M., Nilsson, S., and Gustafsson, J.A. (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93**,** 5925-5930.

Lambert, P.D., Couceyro, P.R., Mcgirr, K.M., Dall Vechia, S.E., Smith, Y., and Kuhar, M.J. (1998). CART peptides in the central control of feeding and interactions with neuropeptide Y. *Synapse* 29**,** 293-298.

Lapatto, R., Pallais, J.C., Zhang, D., Chan, Y.M., Mahan, A., Cerrato, F., Le, W.W., Hoffman, G.E., and Seminara, S.B. (2007). Kiss1-/- mice exhibit more variable hypogonadism than Gpr54-/- mice. *Endocrinology* 148**,** 4927-4936.

Larco, D.O., Williams, M., Schmidt, L., Sabel, N., Lange, J., Woller, M.J., and Wu, T.J. (2014). Autoshortloop feedback regulation of pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion by its metabolite, GnRH-(1-5). *Endocrine*.

Lasaga, M., and Debeljuk, L. (2011). Tachykinins and the hypothalamo-pituitary-gonadal axis: An update. *Peptides* 32**,** 1972-1978.

Lehman, M.N., Coolen, L.M., and Goodman, R.L. (2010a). Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a

central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 151**,** 3479-3489.

Lehman, M.N., and Karsch, F.J. (1993). Do gonadotropin-releasing hormone, tyrosine hydroxylase-, and beta-endorphin-immunoreactive neurons contain estrogen receptors? A double-label immunocytochemical study in the Suffolk ewe. *Endocrinology* 133**,** 887-895.

Lehman, M.N., Merkley, C.M., Coolen, L.M., and Goodman, R.L. (2010b). Anatomy of the kisspeptin neural network in mammals. *Brain Res* 1364**,** 90-102.

Lehman, M.N., Robinson, J.E., Karsch, F.J., and Silverman, A.J. (1986). Immunocytochemical localization of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) pathways in the sheep brain during anestrus and the mid-luteal phase of the estrous cycle. *J Comp Neurol* 244**,** 19-35.

Lehman, M.N., and Silverman, A.J. (1988). Ultrastructure of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons and their projections in the golden hamster. *Brain Res Bull* 20**,** 211-221.

Leslie, R.A., Sanders, S.J., Anderson, S.I., Schuhler, S., Horan, T.L., and Ebling, F.J. (2001). Appositions between cocaine and amphetamine-related transcript- and gonadotropin releasing hormone-immunoreactive neurons in the hypothalamus of the Siberian hamster. *Neurosci Lett* 314**,** 111-114.

Li, C., Chen, P., and Smith, M.S. (1999). Morphological evidence for direct interaction between arcuate nucleus neuropeptide Y (NPY) neurons and gonadotropin-releasing hormone neurons and the possible involvement of NPY Y1 receptors. *Endocrinology* 140**,** 5382-5390.

Lin, W., Mckinney, K., Liu, L., Lakhlani, S., and Jennes, L. (2003). Distribution of vesicular glutamate transporter-2 messenger ribonucleic Acid and protein in the septum-hypothalamus of the rat. *Endocrinology* 144**,** 662-670.

Ludwig, D.S., Mountjoy, K.G., Tatro, J.B., Gillette, J.A., Frederich, R.C., Flier, J.S., and Maratos-Flier, E. (1998). Melanin-concentrating hormone: a functional melanocortin antagonist in the hypothalamus. *Am J Physiol* 274**,** E627-633.

Magoul, R., Dubourg, P., Benjelloun, W., and Tramu, G. (1993). Direct and indirect enkephalinergic synaptic inputs to the rat arcuate nucleus studied by combination of retrograde tracing and immunocytochemistry. *Neuroscience* 55**,** 1055-1066.

Marks, D.L., Smith, M.S., Clifton, D.K., and Steiner, R.A. (1993). Regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and galanin gene expression in GnRH neurons during lactation in the rat. *Endocrinology* 133**,** 1450-1458.

Marshall, J.C., and Griffin, M.L. (1993). The role of changing pulse frequency in the regulation of ovulation. *Hum Reprod* 8 Suppl 2**,** 57-61.

Matsuda, F., Nakatsukasa, K., Suetomi, Y., Naniwa, Y., Ito, D., Inoue, N., Wakabayashi, Y., Okamura, H., Maeda, K.I., Uenoyama, Y., Tsukamura, H., and Ohkura, S. (2014). The LH Surge-Generating System is Functional in Male Goats as in Females: Involvement of Kisspeptin Neurones in the Medial Preoptic Area. *J Neuroendocrinol*.

Matsui, H., Takatsu, Y., Kumano, S., Matsumoto, H., and Ohtaki, T. (2004). Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 320**,** 383-388.

Matsuyama, S., Ohkura, S., Mogi, K., Wakabayashi, Y., Mori, Y., Tsukamura, H., Maeda, K., Ichikawa, M., and Okamura, H. (2011). Morphological evidence for direct interaction between kisspeptin and gonadotropin-releasing hormone neurons at the median eminence of the male goat: an immunoelectron microscopic study. *Neuroendocrinology* 94**,** 323-332.

Menyhért, J., Wittmann, G., Lechan, R.M., Keller, E., Liposits, Z., and Fekete, C. (2007). Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) is colocalized with the orexigenic neuropeptide Y and agouti-related protein and absent from the anorexigenic alpha-melanocyte-stimulating hormone neurons in the infundibular nucleus of the human hypothalamus. *Endocrinology* 148**,** 4276-4281.

Merchenthaler, I., Kovács, G., Lavász, G., and Sétáló, G. (1980). The preoptico-infundibular LH-RH tract of the rat. *Brain Res* 198**,** 63-74.

Merkley, C.M., Porter, K.L., Coolen, L.M., Hileman, S.M., Billings, H.J., Drews, S., Goodman, R.L., and Lehman, M.N. (2012). KNDy (kisspeptin/neurokinin B/dynorphin) neurons are activated during both pulsatile and surge secretion of LH in the ewe. *Endocrinology* 153**,** 5406-5414.

Messager, S., Chatzidaki, E.E., Ma, D., Hendrick, A.G., Zahn, D., Dixon, J., Thresher, R.R., Malinge, I., Lomet, D., Carlton, M.B., Colledge, W.H., Caraty, A., and Aparicio, S.A. (2005). Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102**,** 1761-1766.

Mikkelsen, J.D., Bentsen, A.H., Ansel, L., Simonneaux, V., and Juul, A. (2009). Comparison of the effects of peripherally administered kisspeptins. *Regul Pept* 152**,** 95-100.

Mittelman-Smith, M.A., Williams, H., Krajewski-Hall, S.J., Lai, J., Ciofi, P., Mcmullen, N.T., and Rance, N.E. (2012). Arcuate kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) neurons mediate the estrogen suppression of gonadotropin secretion and body weight. *Endocrinology* 153**,** 2800-2812.

Moenter, S.M., Caraty, A., and Karsch, F.J. (1990). The estradiol-induced surge of gonadotropin-releasing hormone in the ewe. *Endocrinology* 127**,** 1375-1384.

Moenter, S.M., Defazio, A.R., Pitts, G.R., and Nunemaker, C.S. (2003). Mechanisms underlying episodic gonadotropin-releasing hormone secretion. *Front Neuroendocrinol* 24**,** 79-93.

Molnár, C.S., Vida, B., Sipos, M.T., Ciofi, P., Borsay, B.A., Rácz, K., Herczeg, L., Bloom, S.R., Ghatei, M.A., Dhillo, W.S., Liposits, Z., and Hrabovszky, E. (2012). Morphological evidence for enhanced kisspeptin and neurokinin B signaling in the infundibular nucleus of the aging man. *Endocrinology* 153**,** 5428-5439.

Morrison, J.H., Brinton, R.D., Schmidt, P.J., and Gore, A.C. (2006). Estrogen, menopause, and the aging brain: how basic neuroscience can inform hormone therapy in women. *J Neurosci* 26**,** 10332-10348.

Muir, A.I., Chamberlain, L., Elshourbagy, N.A., Michalovich, D., Moore, D.J., Calamari, A., Szekeres, P.G., Sarau, H.M., Chambers, J.K., Murdock, P., Steplewski, K., Shabon, U., Miller, J.E., Middleton, S.E., Darker, J.G., Larminie, C.G., Wilson, S., Bergsma, D.J., Emson, P., Faull, R., Philpott, K.L., and Harrison, D.C. (2001). AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J Biol Chem* 276**,** 28969-28975.

Najimi, M., Chigr, F., Jordan, D., Leduque, P., Bloch, B., Tommasi, M., Rebaud, P., and Kopp, N. (1990). Anatomical distribution of LHRH-immunoreactive neurons in the human infant hypothalamus and extrahypothalamic regions. *Brain Res* 516**,** 280-291.

Navarro, V., Bosch, M., Leon, S., Simavli, S., True, C., Pinilla, L., Carroll, R., Seminara, S., Tena-Sempere, M., Ronnekleiv, O., and Kaiser, U. (2014). The Integrated Hypothalamic Tachykinin-Kisspeptin System as a Central Coordinator for Reproduction. *Endocrinology***,** en20141651.

Navarro, V.M., Castellano, J.M., Fernandez-Fernandez, R., Tovar, S., Roa, J., Mayen, A., Barreiro, M.L., Casanueva, F.F., Aguilar, E., Dieguez, C., Pinilla, L., and Tena-Sempere, M. (2005a). Effects of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle-stimulating hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 146**,** 1689-1697.

Navarro, V.M., Castellano, J.M., Fernandez-Fernandez, R., Tovar, S., Roa, J., Mayen, A., Nogueiras, R., Vazquez, M.J., Barreiro, M.L., Magni, P., Aguilar, E., Dieguez, C., Pinilla, L., and Tena-Sempere, M. (2005b). Characterization of the potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54. *Endocrinology* 146**,** 156-163.

Navarro, V.M., Castellano, J.M., Mcconkey, S.M., Pineda, R., Ruiz-Pino, F., Pinilla, L., Clifton, D.K., Tena-Sempere, M., and Steiner, R.A. (2011a). Interactions between kisspeptin and neurokinin B in the control of GnRH secretion in the female rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 300**,** E202-210.

Navarro, V.M., Gottsch, M.L., Chavkin, C., Okamura, H., Clifton, D.K., and Steiner, R.A. (2009). Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by

kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse. *J Neurosci* 29**,** 11859-11866.

Navarro, V.M., Gottsch, M.L., Wu, M., Garcia-Galiano, D., Hobbs, S.J., Bosch, M.A., Pinilla, L., Clifton, D.K., Dearth, A., Ronnekleiv, O.K., Braun, R.E., Palmiter, R.D., Tena-Sempere, M., Alreja, M., and Steiner, R.A. (2011b). Regulation of NKB pathways and their roles in the control of Kiss1 neurons in the arcuate nucleus of the male mouse. *Endocrinology* 152**,** 4265-4275.

Noris, G., Hol, D., Clapp, C., and Martinez De La Escalera, G. (1995). Histamine directly stimulates gonadotropin-releasing hormone secretion from GT1-1 cells via H1 receptors coupled to phosphoinositide hydrolysis. *Endocrinology* 136**,** 2967-2974.

Novaira, H.J., Sonko, M.L., Hoffman, G., Koo, Y., Ko, C., Wolfe, A., and Radovick, S. (2014). Disrupted kisspeptin signaling in GnRH neurons leads to hypogonadotrophic hypogonadism. *Mol Endocrinol* 28**,** 225-238.

Oakley, A.E., Clifton, D.K., and Steiner, R.A. (2009). Kisspeptin signaling in the brain. *Endocr Rev* 30**,** 713-743.

Ohkura, S., Takase, K., Matsuyama, S., Mogi, K., Ichimaru, T., Wakabayashi, Y., Uenoyama, Y., Mori, Y., Steiner, R.A., Tsukamura, H., Maeda, K.I., and Okamura, H. (2009). Gonadotrophin-releasing hormone pulse generator activity in the hypothalamus of the goat. *J Neuroendocrinol* 21**,** 813-821.

Ohtaki, T., Shintani, Y., Honda, S., Matsumoto, H., Hori, A., Kanehashi, K., Terao, Y., Kumano, S., Takatsu, Y., Masuda, Y., Ishibashi, Y., Watanabe, T., Asada, M., Yamada, T., Suenaga, M., Kitada, C., Usuki, S., Kurokawa, T., Onda, H., Nishimura, O., and Fujino, M. (2001). Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 411**,** 613-617.

Overgaard, A., Ruiz-Pino, F., Castellano, J.M., Tena-Sempere, M., and Mikkelsen, J.D. (2014). Disparate changes in kisspeptin and neurokinin B expression in the arcuate nucleus after sex steroid manipulation reveal differential regulation of the two KNDy peptides in rats. *Endocrinology* 155**,** 3945-3955.

Pak, T.R., Chung, W.C., Roberts, J.L., and Handa, R.J. (2006). Ligand-independent effects of estrogen receptor beta on mouse gonadotropin-releasing hormone promoter activity. *Endocrinology* 147**,** 1924-1931.

Pau, K.Y., Berria, M., Hess, D.L., and Spies, H.G. (1993). Preovulatory gonadotropin-releasing hormone surge in ovarian-intact rhesus macaques. *Endocrinology* 133**,** 1650-1656.

Paulin, C., Dubois, M.P., Barry, J., and Dubois, P.M. (1977). Immunofluorescence study of LH-RH producing cells in the human fetal hypothalamus. *Cell Tissue Res* 182**,** 341-345.

Petersen, S.L., Mccrone, S., Keller, M., and Shores, S. (1995). Effects of estrogen and progesterone on luteinizing hormone-releasing hormone messenger ribonucleic acid levels: consideration of temporal and neuroanatomical variables. *Endocrinology* 136**,** 3604-3610.

Petersen, S.L., Ottem, E.N., and Carpenter, C.D. (2003). Direct and indirect regulation of gonadotropin-releasing hormone neurons by estradiol. *Biol Reprod* 69**,** 1771-1778.

Pielecka-Fortuna, J., Chu, Z., and Moenter, S.M. (2008). Kisspeptin acts directly and indirectly to increase gonadotropin-releasing hormone neuron activity and its effects are modulated by estradiol. *Endocrinology* 149**,** 1979-1986.

Plant, T.M., Moossy, J., Hess, D.L., Nakai, Y., Mccormack, J.T., and Knobil, E. (1979). Further studies on the effects of lesions in the rostral hypothalamus on gonadotropin secretion in the female rhesus monkey (Macaca mulatta). *Endocrinology* 105**,** 465-473.

Porteous, R., Petersen, S.L., Yeo, S.H., Bhattarai, J.P., Ciofi, P., De Tassigny, X.D., Colledge, W.H., Caraty, A., and Herbison, A.E. (2011). Kisspeptin neurons co-express met-enkephalin and galanin in the rostral periventricular region of the female mouse hypothalamus. *J Comp Neurol* 519**,** 3456-3469.

Ramaswamy, S., Gibbs, R.B., and Plant, T.M. (2009). Studies of the localisation of kisspeptin within the pituitary of the rhesus monkey (Macaca mulatta) and the effect of kisspeptin on the release of non-gonadotropic pituitary hormones. *J Neuroendocrinol* 21**,** 795-804.

Ramaswamy, S., Guerriero, K.A., Gibbs, R.B., and Plant, T.M. (2008). Structural interactions between kisspeptin and GnRH neurons in the mediobasal hypothalamus of the male rhesus monkey (Macaca mulatta) as revealed by double immunofluorescence and confocal microscopy. *Endocrinology* 149**,** 4387-4395.

Ramaswamy, S., Seminara, S.B., Ali, B., Ciofi, P., Amin, N.A., and Plant, T.M. (2010). Neurokinin B stimulates GnRH release in the male monkey (Macaca mulatta) and is colocalized with kisspeptin in the arcuate nucleus. *Endocrinology* 151**,** 4494-4503.

Ramaswamy, S., Seminara, S.B., and Plant, T.M. (2011). Evidence from the agonadal juvenile male rhesus monkey (Macaca mulatta) for the view that the action of neurokinin B to trigger gonadotropin-releasing hormone release is upstream from the kisspeptin receptor. *Neuroendocrinology* 94**,** 237-245.

Rance, N.E., and Young, W.S., 3rd (1991). Hypertrophy and increased gene expression of neurons containing neurokinin-B and substance-P messenger ribonucleic acids in the hypothalami of postmenopausal women. *Endocrinology* 128**,** 2239-2247.

Rance, N.E., Young, W.S., 3rd, and Mcmullen, N.T. (1994). Topography of neurons expressing luteinizing hormone-releasing hormone gene transcripts in the human hypothalamus and basal forebrain. *J Comp Neurol* 339**,** 573-586.

Revel, F.G., Masson-Pevet, M., Pevet, P., Mikkelsen, J.D., and Simonneaux, V. (2009). Melatonin controls seasonal breeding by a network of hypothalamic targets. *Neuroendocrinology* 90**,** 1-14.

Roa, J., and Herbison, A.E. (2012). Direct regulation of GnRH neuron excitability by arcuate nucleus POMC and NPY neuron neuropeptides in female mice. *Endocrinology* 153**,** 5587-5599.

Robertson, J.L., Clifton, D.K., De La Iglesia, H.O., Steiner, R.A., and Kauffman, A.S. (2009). Circadian regulation of Kiss1 neurons: implications for timing the preovulatory gonadotropin-releasing hormone/luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 150**,** 3664-3671.

Rogge, G., Jones, D., Hubert, G.W., Lin, Y., and Kuhar, M.J. (2008). CART peptides: regulators of body weight, reward and other functions. *Nat Rev Neurosci* 9**,** 747-758.

Rometo, A.M., Krajewski, S.J., Voytko, M.L., and Rance, N.E. (2007). Hypertrophy and increased kisspeptin gene expression in the hypothalamic infundibular nucleus of postmenopausal women and ovariectomized monkeys. *J Clin Endocrinol Metab* 92**,** 2744-2750.

Rometo, A.M., and Rance, N.E. (2008). Changes in prodynorphin gene expression and neuronal morphology in the hypothalamus of postmenopausal women. *J Neuroendocrinol* 20**,** 1376-1381.

Rondini, T.A., Baddini, S.P., Sousa, L.F., Bittencourt, J.C., and Elias, C.F. (2004). Hypothalamic cocaine- and amphetamine-regulated transcript neurons project to areas expressing gonadotropin releasing hormone immunoreactivity and to the anteroventral periventricular nucleus in male and female rats. *Neuroscience* 125**,** 735-748.

Rossmanith, W.G., Clifton, D.K., and Steiner, R.A. (1996). Galanin gene expression in hypothalamic GnRH-containing neurons of the rat: a model for autocrine regulation. *Horm Metab Res* 28**,** 257-266.

Ruka, K.A., Burger, L.L., and Moenter, S.M. (2013). Regulation of arcuate neurons coexpressing kisspeptin, neurokinin B, and dynorphin by modulators of neurokinin 3 and kappa-opioid receptors in adult male mice. *Endocrinology* 154**,** 2761-2771.

Sarkar, D.K., Chiappa, S.A., Fink, G., and Sherwood, N.M. (1976). Gonadotropin-releasing hormone surge in pro-oestrous rats. *Nature* 264**,** 461-463.

Sawyer, C.H. (1955). Rhinencephalic involvement in pituitary activation by intraventricular histamine in the rabbit under nembutal anesthesia. *Am J Physiol* 180**,** 37-46.

Schwanzel-Fukuda, M., Bick, D., and Pfaff, D.W. (1989). Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-expressing cells do not migrate normally in an inherited hypogonadal (Kallmann) syndrome. *Brain Res Mol Brain Res* 6**,** 311-326.

Schwanzel-Fukuda, M., and Pfaff, D.W. (1989). Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Nature* 338**,** 161-164.

Seminara, S.B., Messager, S., Chatzidaki, E.E., Thresher, R.R., Acierno, J.S., Jr., Shagoury, J.K., Bo-Abbas, Y., Kuohung, W., Schwinof, K.M., Hendrick, A.G., Zahn, D., Dixon, J., Kaiser, U.B., Slaugenhaupt, S.A., Gusella, J.F., O'rahilly, S., Carlton, M.B., Crowley, W.F., Jr., Aparicio, S.A., and Colledge, W.H. (2003). The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med* 349**,** 1614-1627.

Sétáló, G., Vigh, S., Schally, A.V., Arimura, A., and Flerkó, B. (1976). Immunohistological study of the origin of LH-RH-containing nerve fibers of the rat hypothalamus. *Brain Res* 103**,** 597-602.

Shahab, M., Mastronardi, C., Seminara, S.B., Crowley, W.F., Ojeda, S.R., and Plant, T.M. (2005). Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102**,** 2129-2134.

Shivers, B.D., Harlan, R.E., Morrell, J.I., and Pfaff, D.W. (1983). Absence of oestradiol concentration in cell nuclei of LHRH-immunoreactive neurones. *Nature* 304**,** 345-347.

Silveira, L.G., Noel, S.D., Silveira-Neto, A.P., Abreu, A.P., Brito, V.N., Santos, M.G., Bianco, S.D., Kuohung, W., Xu, S., Gryngarten, M., Escobar, M.E., Arnhold, I.J., Mendonca, B.B., Kaiser, U.B., and Latronico, A.C. (2010). Mutations of the KISS1 gene in disorders of puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 95**,** 2276-2280.

Silverman, A.J., Krey, L.C., and Zimmerman, E.A. (1979). A comparative study of the luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) neuronal networks in mammals. *Biol Reprod* 20**,** 98-110.

Skinner, D.C., and Dufourny, L. (2005). Oestrogen receptor beta-immunoreactive neurones in the ovine hypothalamus: distribution and colocalisation with gonadotropin-releasing hormone. *J Neuroendocrinol* 17**,** 29-39.

Smith, J.T., Coolen, L.M., Kriegsfeld, L.J., Sari, I.P., Jaafarzadehshirazi, M.R., Maltby, M., Bateman, K., Goodman, R.L., Tilbrook, A.J., Ubuka, T., Bentley, G.E., Clarke, I.J., and Lehman, M.N. (2008). Variation in kisspeptin and RFamide-related peptide (RFRP) expression and terminal connections to gonadotropin-releasing hormone neurons in the brain: a novel medium for seasonal breeding in the sheep. *Endocrinology* 149**,** 5770-5782.

Smith, J.T., Li, Q., Pereira, A., and Clarke, I.J. (2009). Kisspeptin neurons in the ovine arcuate nucleus and preoptic area are involved in the preovulatory luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 150**,** 5530-5538.

Smith, Y., Koylu, E.O., Couceyro, P., and Kuhar, M.J. (1997). Ultrastructural localization of CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptides in the nucleus accumbens of monkeys. *Synapse* 27**,** 90-94.

Song, T., Nikolics, K., Seeburg, P.H., and Goldsmith, P.C. (1987). GnRH-prohormone-containing neurons in the primate brain: immunostaining for the GnRH-associated peptide. *Peptides* 8**,** 335-346.

Stopa, E.G., Koh, E.T., Svendsen, C.N., Rogers, W.T., Schwaber, J.S., and King, J.C. (1991). Computer-assisted mapping of immunoreactive mammalian gonadotropin-releasing hormone in adult human basal forebrain and amygdala. *Endocrinology* 128**,** 3199-3207.

Sullivan, S.D., Defazio, R.A., and Moenter, S.M. (2003). Metabolic regulation of fertility through presynaptic and postsynaptic signaling to gonadotropin-releasing hormone neurons. *J Neurosci* 23**,** 8578-8585.

Teles, M.G., Bianco, S.D., Brito, V.N., Trarbach, E.B., Kuohung, W., Xu, S., Seminara, S.B., Mendonca, B.B., Kaiser, U.B., and Latronico, A.C. (2008). A GPR54-activating mutation in a patient with central precocious puberty. *N Engl J Med* 358**,** 709-715.

Terasawa, E. (1998). Cellular mechanism of pulsatile LHRH release. *Gen Comp Endocrinol* 112**,** 283-295.

Topaloglu, A.K., Reimann, F., Guclu, M., Yalin, A.S., Kotan, L.D., Porter, K.M., Serin, A., Mungan, N.O., Cook, J.R., Ozbek, M.N., Imamoglu, S., Akalin, N.S., Yuksel, B., O'rahilly, S., and Semple, R.K. (2009). TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction. *Nat Genet* 41**,** 354-358.

Topaloglu, A.K., Tello, J.A., Kotan, L.D., Ozbek, M.N., Yilmaz, M.B., Erdogan, S., Gurbuz, F., Temiz, F., Millar, R.P., and Yuksel, B. (2012). Inactivating KISS1 mutation and hypogonadotropic hypogonadism. *N Engl J Med* 366**,** 629-635.

True, C., Kirigiti, M., Ciofi, P., Grove, K.L., and Smith, M.S. (2011). Characterisation of arcuate nucleus kisspeptin/neurokinin B neuronal projections and regulation during lactation in the rat. *J Neuroendocrinol* 23**,** 52-64.

True, C., Verma, S., Grove, K.L., and Smith, M.S. (2013). Cocaine- and amphetamine-regulated transcript is a potent stimulator of GnRH and kisspeptin cells and may contribute to negative energy balance-induced reproductive inhibition in females. *Endocrinology* 154**,** 2821-2832.

Tsuruo, Y., Kawano, H., Kagotani, Y., Hisano, S., Daikoku, S., Chihara, K., Zhang, T., and Yanaihara, N. (1990). Morphological evidence for neuronal regulation of luteinizing hormone-releasing hormone-containing neurons by neuropeptide Y in the rat septo-preoptic area. *Neurosci Lett* 110**,** 261-266.

Varjú, P., Chang, K.C., Hrabovszky, E., Merchenthaler, I., and Liposits, Z. (2009). Temporal profile of estrogen-dependent gene expression in LHRH-producing GT1-7 cells. *Neurochem Int* 54**,** 119-134.

Vazquez-Martinez, R., Shorte, S.L., Boockfor, F.R., and Frawley, L.S. (2001). Synchronized exocytotic bursts from gonadotropin-releasing hormone-expressing cells: dual control by intrinsic cellular pulsatility and gap junctional communication. *Endocrinology* 142**,** 2095-2101.

Vella, S., Gussick, J., Woller, M., and Waechter-Brulla, D. (2001). Modification of cell perifusion for extended study of hormone release in the rat pituitary. *Methods Cell Sci* 23**,** 197-204.

Vrang, N., Larsen, P.J., Clausen, J.T., and Kristensen, P. (1999). Neurochemical characterization of hypothalamic cocaine- amphetamine-regulated transcript neurons. *J Neurosci* 19**,** RC5.

Wakabayashi, Y., Nakada, T., Murata, K., Ohkura, S., Mogi, K., Navarro, V.M., Clifton, D.K., Mori, Y., Tsukamura, H., Maeda, K., Steiner, R.A., and Okamura, H. (2010). Neurokinin B and dynorphin A in kisspeptin neurons of the arcuate nucleus participate in generation of periodic oscillation of neural activity driving pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in the goat. *J Neurosci* 30**,** 3124-3132.

Watson, R.E., Jr., Langub, M.C., Jr., and Landis, J.W. (1992). Further Evidence that Most Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Neurons are not Directly Estrogen-Responsive: Simultaneous Localization of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone and Estrogen Receptor Immunoreactivity in the Guinea-Pig Brain. *J Neuroendocrinol* 4**,** 311-317.

Wetsel, W.C., Valenca, M.M., Merchenthaler, I., Liposits, Z., Lopez, F.J., Weiner, R.I., Mellon, P.L., and Negro-Vilar, A. (1992). Intrinsic pulsatile secretory activity of immortalized luteinizing hormone-releasing hormone-secreting neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89**,** 4149-4153.

Wildt, L., Hausler, A., Marshall, G., Hutchison, J.S., Plant, T.M., Belchetz, P.E., and Knobil, E. (1981). Frequency and amplitude of gonadotropin-releasing hormone stimulation and gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Endocrinology* 109**,** 376-385.

Wintermantel, T.M., Campbell, R.E., Porteous, R., Bock, D., Grone, H.J., Todman, M.G., Korach, K.S., Greiner, E., Perez, C.A., Schutz, G., and Herbison, A.E. (2006). Definition of estrogen receptor pathway critical for estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone neurons and fertility. *Neuron* 52**,** 271-280.

Witkin, J.W., and Silverman, A.J. (1985). Synaptology of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in rat preoptic area. *Peptides* 6**,** 263-271.

Wittmann, G., Liposits, Z., Lechan, R.M., and Fekete, C. (2002). Medullary adrenergic neurons contribute to the neuropeptide Y-ergic innervation of hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the rat. *Neurosci Lett* 324**,** 69-73.

Wray, S. (2001). Development of luteinizing hormone releasing hormone neurones. *J Neuroendocrinol* 13**,** 3-11.

Wu, T.J., Mani, S.K., Glucksman, M.J., and Roberts, J.L. (2005). Stimulation of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) gene expression in GT1-7 cells by its metabolite, LHRH-(1-5). *Endocrinology* 146**,** 280-286.

Yamamura, T., Wakabayashi, Y., Ohkura, S., Navarro, V.M., and Okamura, H. (2014). Effects of intravenous administration of neurokinin receptor subtype-selective agonists on gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity and luteinizing hormone secretion in goats. *J Reprod Dev*.