

A 17β -ösztradiol és a glukagon-szerű peptid-1 hatásának vizsgálata gonadotropin-releasing hormone neuronokon

Bálint Flóra

Doktori értekezés tézisei



Témavezetők:

Farkas Imre PhD, Liposits Zsolt DSc

Pázmány Péter Katolikus Egyetem

Információs Technológiai és Bionikai Kar

Roska Tamás Műszaki és Természettudományi Doktori Iskola

Budapest, 2018

BEVEZETÉS

A szaporodást és az ivarszervek működését emlősökben a hipotalamusz-hipofízis-gonád tengely (HPG tengely) egységeinek összehangolt működése szabályozza. A HPG tengely egységei között hormonok által közvetített összetett és pontos kommunikáció zajlik. A reproduktív tengely kulcsszereppel bíró egységei a hipotalamusz gonadotropin-releasing hormont (GnRH) termelő idegsejtjei [1]. A GnRH neuronok elengedhetetlenek az ivarsejtek képződésének és az ivarmirigyek hormon termelésének szabályozásában mindkét nemben. A reproduktív tengely rendellenességei meddőséghez vezethetnek, ami különböző okok miatt következhet be, beleértve a GnRH neuronok hibás működését. A GnRH idegsejtek működését számos tényező befolyásolja, beleértve a nemi hormonokat, a cirkadián ritmust, a stresszt és az energiaháztartást. Ezért fontos, hogy a GnRH neuronok működését és ezen idegsejteket befolyásoló rendszereket tanulmányozzuk. Így a doktori értekezésemben azt a célt tűztem ki, hogy pontosabb képet adjak egy nemi hormon, a 17β ösztadiol (E2) és egy metabolikus hormon, a glukagonszerű peptid-1 (GLP-1) szerepéről a GnRH neuronok működésének szabályozásában.

A nemi hormonok a hipotalamikus GnRH neuronokra hatva befolyásolják a reproduktív tengely működését. Az egyik elsődleges ilyen hormon az E2, amely pozitív és negatív visszacsatolási mechanizmusokon keresztül modulálja a GnRH rendszert [2]. Ezen visszacsatolási mechanizmusok segítségével képesek a GnRH neuronok az ingadozó nemi hormonok szintjének szabályozására. Az E2 hatásának közvetítéséért főként a klasszikus ösztrogén receptorok (ER) felelnek, melyek közül a GnRH neuronokon kizárólag a béta típusú receptor található meg (ER β) [3-5]. Az E2 klasszikus genomiális [2, 6] hatása mellett létezik egy nem-genomiális, különböző jelátviteli útvonalakat aktiváló, gyors ösztrogénhatás is, mely többek között a GnRH neuronok elektromos aktivitását befolyásolja [2, 7-10].

Kimutatták, hogy az E2 alacsony koncentrációban (10 pM) csökkenti GnRH neuronok tüzelési sebességét, amikor a GnRH neuronokra ható gyors neurotranszmissziót nem gátolták [11]. A GnRH neuronokat szabályozó egyik legfontosabb neurotranszmitter a GABA, amely szintén fontos szerepet játszik a GnRH neuronokra ható szteroid visszacsatolásban [12, 13]. A központi idegrendszerben jellemzően gátló neurotranszmitterként működő GABA a GnRH neuronokat serkenti, melynek oka ezen neuronok magas sejten belüli kloridion koncentrációja [14, 15]. Így a GABA egy lehetséges résztvevő az E2 hatására történő GnRH neuronok tüzelésének

csökkentésében [11]. Továbbá ismert, hogy retrográd endokannabinoid jelátviteli mechanizmusok képesek a GnRH neuronokra érkező GABAerg innervációkat modulálni, így szabályozva a GABA felszabadulását [16].

Így azt feltételeztük, hogy az E2 alacsony koncentrációban gyakorolt gátló hatása a GnRH neuronokon ER β és retrográd endokannabinoid jelátviteli mechanizmusok aktiválódása révén jön létre, ami a GABAerg neurotranszmisszió csökkenését eredményezi a GnRH neuronokban.

A GnRH neuronokra ható negatív E2 visszacsatolás vizsgálata mellett tanulmányoztam egy metabolikus szignál, a glukagon-szerű peptid-1 (GLP-1) GnRH neuronokra gyakorolt hatását. A GLP-1 csökkenti a táplálékfelvételt, gátolja a gyomorürülést és növeli a glükóz által stimulált inzulinszekréciót [17, 18].

Az energiaháztartásban betöltött szerepe mellett a GLP-1 a reprodukció szabályozásában is szerepet játszik. GLP-1 receptor hiányos nőstény egerek a pubertás később következett be, míg a hím állatoknál kisebb ivarszerveket lehetett megfigyelni [19]. A GLP-1 képes módosítani az ösztradiol- és progeszteronszintet [20]. Mivel a GnRH neuronok a HPG tengely irányításában kulcsszerepet játszanak, a GnRH neuronok bármilyen GLP-1 által indukált modulációja befolyásolja a reprodukív rendszer működését. Bár ismert, hogy a GLP-1 hatással van a reprodukcióra, a GnRH neuronokra gyakorolt közvetlen hatásáról keveset tudunk. Ezért a célom az volt, hogy megvizsgáljam a GLP-1 feltételezett közvetlen hatásait a GnRH neuronok elektromos aktivitására.

CÉLKITŰZÉSEK

Doktori értekezésem célja a GnRH neuronok működésének pontosabb megismerése volt elektrofiziológiai módszerekkel. Munkám első részében részletesen vizsgáltam a GnRH neuronokra ható negatív E2 visszacsatolás mechanizmusát. Ennek érdekében az alábbi kérdéseket vizsgáltuk meg:

1. Milyen hatással van az ösztradiol a GnRH neuronok működésére a negatív ösztrogén visszacsatolás alatt?
2. Melyik ösztrogén receptor játszik szerepet az E2 közvetlen hatásában a GnRH neuronokon?

3. Szerepet játszik-e a retrográd endokannabinoid rendszer az E2 gyors hatásában a GnRH neuronokon? Ha igen, milyen molekuláris és jelátviteli útvonalak érintettek a rendszerben?

A disszertáció második részében bemutatom a glukagonszerű peptid-1 (GLP-1) szabályozó szerepét a GnRH neuronok működésében. Korábbi tanulmányok leírták ennek a hormonnak a szaporodásra gyakorolt hatását, bár az érintett molekuláris mechanizmusokat nem tárták fel. Ezért a következő kérdésekre kerestem a választ:

1. Közvetlenül befolyásolja-e a GLP-1 a GnRH neuronok működését?
2. Milyen molekuláris útvonalakat aktivál a GLP-1 receptor a GnRH neuronokban?
3. Milyen retrográd rendszerek lehetnek érintve ebben a szabályozásban? Mely jelátviteli kaszkádok játszanak szerepet a retrográd mechanizmusokban?

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Állatok

A kísérleteimben felnőtt (50-100 napos) ivarérett, C57Bl/6J genetikai háttérrel rendelkező GnRH-GFP transzgenikus hím vagy nőstény egereket használtam.

Whole-cell patch clamp kísérletek

Az elektrofiziológiai kísérletekhez 250 µm vastag koronális, túlélő szeleteket készítettem, amelyek tartalmazták a mediális szeptumot / preoptikus területet. A whole-cell patch clamp kísérletek során spontán és miniatűr posztzinaptikus áramokat mértem. A posztzinaptikus áramok mérését egy kontroll szakasz felvételével kezdetem (5 perc), majd különböző agonistákat (1. Táblázat) alkalmaztam, melyeket az agyszeleteket tartalmazó mesterséges agy-gerincvelői folyadékba (aCSF) adagoltam. Ezután további 10 percig folytattam a sejt aktivitásának felvételét. Az antagonisták (1. Táblázat) hatásának vizsgálata során az anyagokat 10 perccel a kísérlet kezdete előtt adtam az aCSF-hez és a mérés folyamán folyamatosan jelen voltak az oldatban. Az intracellulárisan alkalmazott farmakonokat az elvezető elektróda tartalmazta.

Loose-patch clamp kísérletek

Ezen kísérletek is egy 5 perces kontroll szakasz felvételével kezdődtek, melyet a farmakonok szeletekre adása és további 10 perc mérés követett. A farmakonok a mérés során folyamatosan jelen voltak az oldatban (1. Táblázat).

1. Táblázat A kísérletek során használt farmakonok

<i>Név</i>	<i>Hatás</i>	<i>Koncentráció</i>
17β-ösztradiol (E2)	ösztrogén receptor agonista	10 pM
AM251	1-es típusú kannabinoid receptor inverz agonista	1 μ M
AMG9810	1-es típusú vanilloid receptor antagonistá	10 μ M
CPTIO	nitrogén-monoxid kötő	1 mM
DPN	β -típusú ösztrogén receptor agonista	10 pM
Exendin-3(9-39)	GLP-1 receptor antagonistá	1 μ M
Exendin-4	GLP-1 receptor agonista	100 nM – 5 μ M
Faslodex (ICI 182,780)	ösztrogén receptor antagonistá	1 μ M
G1	GPR30 receptor agonista	10 pM
GDP-β-S	G-fehérje blokkoló	2 mM
L-arginine	nitrogén-monoxid donor	1 mM
L-NAME	nitrogén-monoxid szintézis gátló	100 μ M
NPLA	neuronális nitrogén-monoxid szintézis gátló	1 μ M
PF3845	zsírsav-amid-hidroláz gátló	5 μ M
PHTPP	β -típusú ösztrogén receptor antagonistá	1 μ M
PPT	α -típusú ösztrogén receptor agonista	10 pM
THL (tetrahydro-lipstatin/orlistat)	diacilglicerol lipáz gátló	10 μ M
TTX (tetrodotoxin)	feszültségvezérlet nátriumcsatorna blokkoló	660 nM

A Glp1r és a Nos1 kimutatása GnRH neuronokban Real-time PCR módszerrel

A hím egerek egyedi GnRH neuronjainak mRNS-tartalmát patch clamp pipettával gyűjtöttem össze. A sikeres Glp1r kimutatáshoz összevont citoplazma mintákat használtam. Minden összevont minta 10 GnRH neuront tartalmazott, összesen 3 állatból. A Nos1kimutatáshoz egyedi GnRH neuronok citoplazmáját használtam, összesen 30 sejtet, amelyeket 5 állatból gyűjtöttem.

EREDMÉNYEK

I. Tézis: Az ösztadiol direkt módon gátolja a GnRH neuronok aktivitását a negatív ösztrogén visszacsatolási fázis során

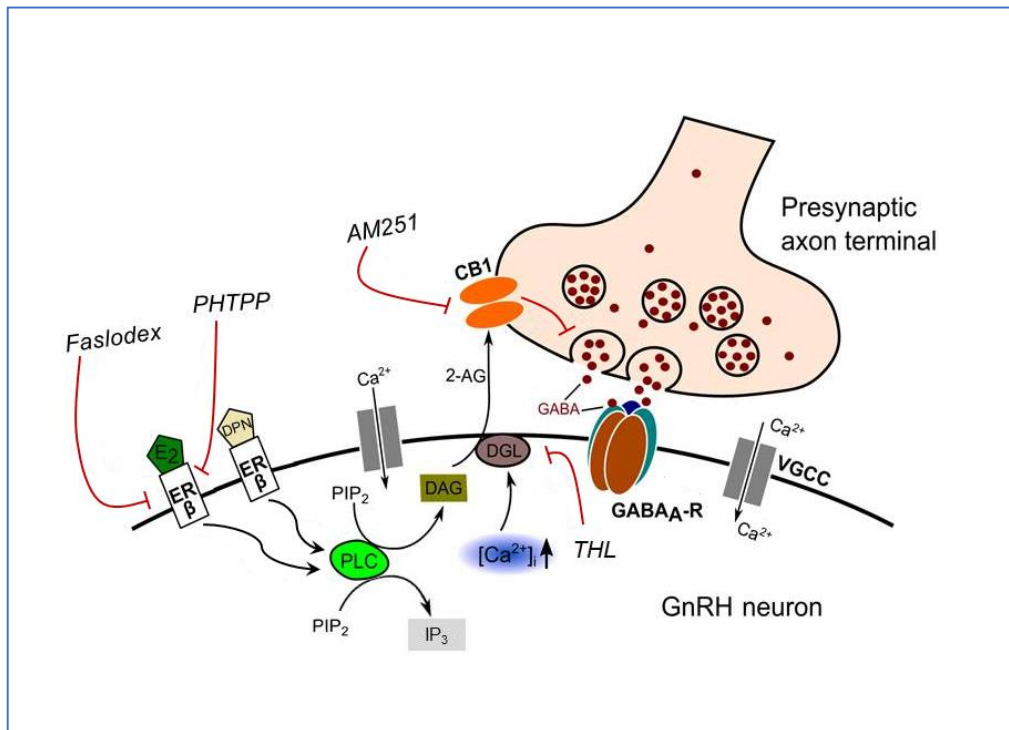
Az ösztadiol alacsony fiziológiás koncentrációban jelentősen csökkenti a GnRH neuronok spontán és miniatűr posztszinaptikus áramainak frekvenciáját a metösztroz fázisban lévő egereknél. A frekvencia csökkenése percekben belül bekövetkezik, ami az ösztadiol nem genomiális, gyors hatására utal ezen sejteken.

II. Tézis: Az ösztadiol direkt, gyors hatása béta típusú ösztrogén receptoron keresztül történik a GnRH neuronokban a negatív visszacsatolás során

Elektrofiziológiai kísérleteim igazolták, hogy az ER β szükséges az ösztadiol gyors hatásának létrejöttéhez GnRH neuronokban, mivel specifikus ER β agonista jelentősen csökkentette a miniatűr posztszinaptikus áramok átlagos frekvenciáját. Ezenkívül az ösztadiol hatása szignifikánsan csökkent a specifikus ER β antagonisták jelenlétében. Továbbá a membránkött ösztrogén receptor (ER α , GPR30) agonisták nem játszottak szerepet az ösztadiol gyors hatásának közvetítésében a negatív visszacsatolás során.

III. Tézis: A retrográd endokannabinoid rendszer szerepet játszik a GnRH neuronokon megfigyelt, ösztadiol által kiváltott aktivitás csökkenésében a negatív visszacsatolás során

Bizonyítottam az interakciót az ösztadiol és az endokannabinoid jelátvitel között a GnRH neuronokban. A retrográd endokannabinoid jelátvitelt az 1-es típusú kannabinoid receptor inverz agonista blokkolta és a 2-arachidonoilglicerol szintézisének blokkolása révén csökkentette az ösztadiol által kiváltott változásokat a GnRH neuronokon. Az ösztadiol és az endokannabinoid rendszerek közötti összefüggést megerősítette, hogy az ER β nem volt hatással az 1-es típusú kannabinoid receptor blokkolása során. Ezek az eredmények alátámasztják azt a nézetet, hogy a 2-arachidonoilglicerol a GnRH neuronokban szintetizálódik és részt vesz az ösztadiol gátló hatásának modulálásában.



1. Ábra. Az ösztradiol és a 2-AG endokannabinoid jelátvitel kapcsolatának vázlatos ábrázolása GnRH neuronokban. Az ER β ösztradiol általi aktivációja a 2-AG endokannabinoid szintézisét és felszabadulását eredményezi a GnRH neuronból. Ezután a felszabadult 2-AG a GABAerg afferensek preszinaptikus terminálisán elhelyezkedő CB1-hez kötődik. Ez gátolja a GABA felszabadulását a szinaptikus résbe, ami a GnRH neuronok aktivitásának csökkenését eredményezi. A nem specifikus ER antagonistá (Faslodex) vagy a specifikus ER β antagonistá (PHTPP) képes gátolni az E2 hatását. A mechanizmust szintén gátolni lehet CB1 inverz agonista (AM251) vagy a DAG lipáz inhibitor (THL) használatával. A piros vonalak a gátló hatást jelölik. Rövidítések: 17 β -ösztradiol (E2); β -típusú ösztrogén receptor (ER β); specifikus ER β agonista (DPN); diacilglicerol (DAG); DAG-lipáz (DGL); 1-es típusú kannabinoid receptor (CB1); CB1 antagonistá (AM251); nem specifikus ER antagonistá (Faslodex); specifikus ER β antagonistá (PHTPP); 2-arachidonoilglicerol (2-AG); tetrahidrolipsztatin (THL, DAG-lipáz inhibitor); foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát (PIP₂); inozitol1,4,5-triszfoszfát (IP₃); foszfolipáz-C (PLC); GABA_A receptor (GABA_A-R); intracelluláris kalciumion ([Ca²⁺]_i); feszültségvezérelt kalcium csatorna (VGCC).

IV. Tézis: A GLP-1 serkenti a GnRH neuronokat GLP-1 receptoron keresztül

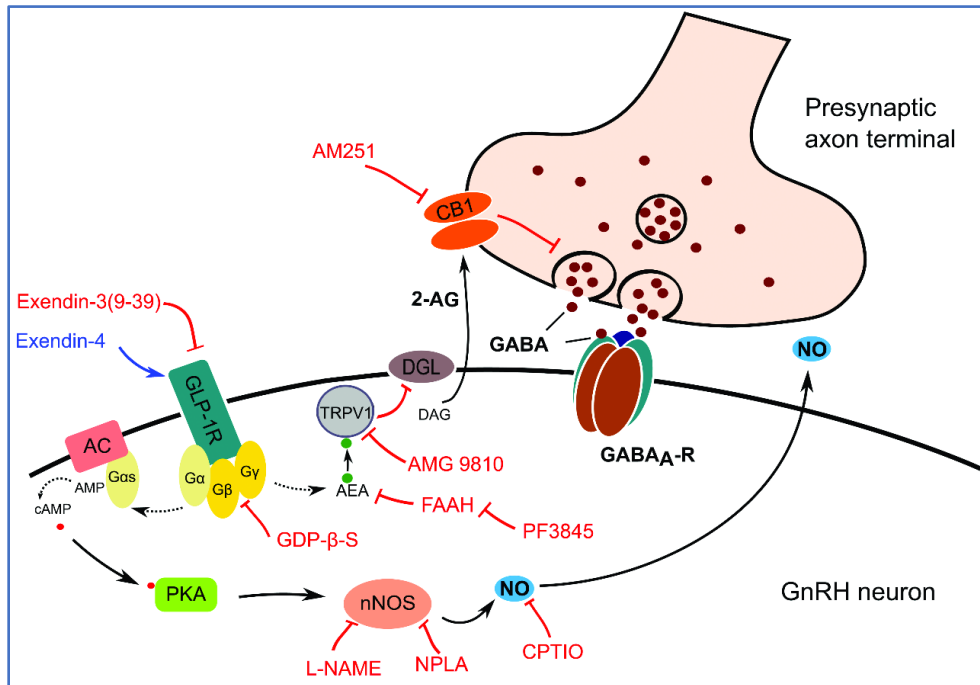
A GLP-1 receptor agonista szignifikánsan növelte a GnRH neuronok tüzelési aktivitását és a posztszinaptikus áramok frekvenciáját. A GLP-1 receptor blokkolása megszünteti ezeket a változásokat. Sikeresen detektáltuk a GLP-1 receptor mRNS-ét a GnRH neuronokban. Eredményeim igazolják a GLP-1 serkentő hatását és a GLP-1 receptorok létezését a GnRH neuronokban.

V. Tézis: A nitrogén-monoxid és a 2-arachidonoil-glicerol jelátviteli mechanizmusok szerepet játszanak a GLP-1 hatásában a GnRH neuronokon

Eredményeim azt mutatták, hogy a GLP-1 serkentő hatásában a NO retrográd jelátvitel szerepet játszik. A NO szintézis gátlása vagy a NO intracelluláris megkötése csak részben csökkentette a GLP-1 serkentő hatását. Kimutattuk a neuronális NO-szintáz mRNS expresszióját a GnRH neuronokban. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a NO-t a GnRH neuronok szintetizálják. Emellett a NO-donor alkalmazása növelte a posztszinaptikus áramok frekvenciáját, igazolva a NO rendszer szerepét a GnRH neuronok modulálásában. A 2-arachidonoilglicerol jelátviteli mechanizmus is szerepet játszik a GLP-1 hatásában, mivel az 1-es típusú kannabinoid receptor blokkolása részben megszünteti a GLP-1 hatását. Továbbá, a GLP-1 serkentő hatását teljes mértékben megszüntette a két útvonal egyidejű blokkolása, igazolva ezzel a NO és endokannabinoid retrográd jelátviteli mechanizmusok egyidejű részvételét a GLP-1 jelátvitelben.

VI. Tézis: A retrográd 2-AG útvonalat az anandamid-TRPV1 jelátvitel szabályozza a GnRH neuronokban

A GLP-1R stimulálása a 2-AG endokannabinoid útvonal gátlását eredményezi. A GLP-1 nem volt képes a 2-AG függő stimuláló hatását kifejteni, amikor a TRPV1 és a NO szintézist gátoltuk. Az anandamid szerepét a TRPV1 aktivációjában szintén igazoltuk kísérleteinkben. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a 2-AG endokannabinoid jelátvitelét az anandamid-TRPV1 útvonal szabályozza.



2. Ábra. A GLP-1 receptor jelátvitel hatásának vázlatos ábrázolása a GnRH neuronokban GLP-1R agonista (Exendin-4) hatását G-fehérje komplex közvetíti, amely két retrográd jelátviteli rendszert aktivál. Az egyik rendszer a nNOS aktiválódását jelenti, ami fokozott NO termeléshez vezet. Ezt követően a NO a GnRH neuronokból a posztzinaptikus részbe diffundál. A NO a preszinaptikus terminálison hatva fokozza a GABA felszabadulás valószínűségét. A NO jelátvitelt gátolja a NO-szintáz blokkoló L-NAME, nNOS gátló NPLA vagy NO megkötő CPTIO. A második jelátviteli rendszer a TRPV1 anandamid általi aktiválása. Ez elnyomja a 2-AG szintézisét és felszabadulását a posztzinaptikus sejtben. Így gátlódik a preszinaptikus GABA felszabadulás. A jelátvitelt blokkolni lehetett FAAH gátló PF3845, TRPV1 antagonistá AM9810 vagy a CB1 inverz agonista AM251 használatával. Az Exendin-4 hatását blokkolta a GLP-1R antagonistá Exendin-3 (9-39) vagy a G-protein gátló GDP-β-S. A piros vonalak a gátló hatást jelölik, a kék vonalak a serkentést ábrázolják, míg a pontozott vonalak a feltételezett útvonalakat jelölik. Rövidítések: glukagonszerű peptid 1 receptor (GLP-1R); adenilát-cikláz (AC); G-fehérje alegységek (Gα, Gβ, Gγ); diacilglicerol (DAG); DAG lipáz (DGL); 1-es típusú kannabinoid receptor (CB1); CB1 antagonistá (AM251); 2-arachidonilglicerol (2-AG); GABA_A receptor (GABA_A-R); protein kináz A (PKA); neuronális nitrogén-monoxid-szintáz (nNOS); L-NAME, NOS inhibitor; NPLA, nNOS inhibitor; GDP-β-S trilitiumsó (GDP-β-S, G-protein inhibitor); CPTIO káliumsó (CPTIO, NO-tisztító); 1-es típusú vanilloid receptor (TRPV1); anandamid (AEA); TRPV1 antagonistá (AM9810); zsírsav-amid-hidroláz (FAAH); FAAH-inhibitor (PF3845).

AZ EREDMÉNYEK LEHETSÉGES HASZNOSÍTÁSA

Napjaink egyik legsúlyosabb problémája a terméketlenség, amely a gyermeket tervező párok minegy 20%-át érinti. Ezért kiemelt fontosságú a reprodukció központi szabályozásának pontos ismerete, amely lehetőségeket teremthet a meddőség kezelésében. Mivel a GnRH neuronok kulcsszereppel bírnak a HPG tengely irányításában, ezen sejtek és a működésüket befolyásoló hormonok tanulmányozása, megismerése újabb terápiás lehetőségeket és célpontokat biztosítanak a menstruációs zavarok és a meddőség kezelésére.

A GnRH neuronok működését mind szteroid, mind nem szteroid jellegű anyagok befolyásolják. Eredményeim azt mutatják, hogy az ösztadiol gátló hatással bír a GABAerg neurotransmisszióra a GnRH neuronokon. Ez a hatás az ER β és a 2-AG jelátviteli útvonalak aktiválásával jön létre a negatív ösztrogén visszacsatolása során. Ezek az eredmények hozzájárulnak ahhoz, hogy jobban megismerjük a nemi ciklust, amely a megfelelő női nemi működés alapja. Az ER β -2-AG jelátviteli mechanizmus feltételezhetően ember GnRH idegsejtjeiben is jelen van, így ennek felderítése további lehetőséget kínál az ehhez kapcsolódó rendellenességek kimutatására. Ezek az eredményeknek továbbá új gyógyítási stratégiák kidolgozását segítheti elő a nőgyógyászat területén.

További eredményeim a GLP-1 metabolikus molekula direkt szabályozó hatását és ehhez a szabályozáshoz tartozó jelátviteli utakat mutatták be a GnRH neuronokon. Az energiaháztartás és a reprodukív rendszerek közötti kölcsönhatás jelentős patofiziológiai jelentőséggel bír. A reprodukciós érés és a termékenység zavarai mind energiahányos állapotban, mind energiafelesleg, például a morbid elhízás során jelentkeznek. A GLP-1 reprodukcióban kifejtett hatásának tisztázásával hozzájárultam a tápláltsági állapot és a gonadális funkciók közötti kapcsolat jobb megértéséhez, amely később a táplálkozás miatt kialakuló rendellenességek (késői pubertás) kezelésére vagy a meddőségre kezelésére alkalmazott terápiák fejlesztésének részét képezheti.

PUBLIKÁCIÓK

A tézis alapját képező publikációk

1. Bálint, F., Liposits, Z., Farkas, I. 'Estrogen receptor beta and 2-arachidonoylglycerol mediate the suppressive effects of estradiol on frequency of postsynaptic currents in gonadotropin-releasing hormone neurons of metestrous mice: an acute slice electrophysiological study'. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, vol. 10, March 2016, doi: 10.3389/fncel.2016.00214. Impact Factor: 4.555
2. Farkas I., Vastagh C., Farkas E., Bálint F., Skrapits K., Hrabovszky E., Fekete C., Liposits Z. 'Glucagon-Like Peptide-1 Excites Firing and Increases GABAergic Miniature Postsynaptic Currents (mPSCs) in Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Neurons of the Male Mice via Activation of Nitric Oxide (NO) and Suppression of Endocannabinoid Signaling Pathways' *Frontiers in Cellular Neuroscience*, vol. 10, September 2016, doi: 10.3389/fncel.2016.00214. Impact Factor: 4.555

Egyéb a témához kapcsolódó publikációk

1. Farkas I., Bálint F., Farkas E., Vastagh C., Fekete C., Liposits Z. 'Estradiol increases glutamate and GABA neurotransmission into GnRH neurons via retrograde NO-signaling in proestrous mice' *eNeuro*, 17 July 2018, ENEURO.0057-18.2018; doi: 10.1523/ENEURO.0057-18.2018

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, *Dr. Farkas Imrének*, aki az egyetemi éveimtől kezdve tanított a tudományos kutatómunka lépéseinek elsajátítására és tette ezt töretlen lelkesedéssel és türelemmel.

Hálámat szeretném kifejezni *Prof. Liposits Zsoltnak* értékes tanácsaiért és a lehetőségért, hogy a kutatócsoportjában dolgozhattam.

Köszönöm korábbi és jelenlegi munkatársaimnak a támogatást, a segítőkészséget és a nagyszerű társaságot: *Bardóczy Zsuzsanna, Beliczai Zsuzsanna, Csillag Veronika, Dr. Fekete Csaba, Göcz Balázs, Dr. Hakkel Erzsébet, Dr. Hrabovszky Erik, Dr. Kalló Imre, Kovács Balázs, László Barna, Dr. Molnár Csilla, Dr. Péterfi Zoltán, Dr. Sárvári Miklós, Dr. Skrapits Katalin, Dr. Takács Szabolcs, Turek Márta, Váczi Viktória, Dr. Vastagh Csaba, Dr. Varga Edina és Wilhelm Tamás.*

Köszönettel tartozom a Doktori Iskolának, különösképpen *Prof. Szolgay Péternek* a lehetőségért, hogy részt vehettem a doktori programban, és *Vida Tivadarnénak* a segítőkészségét.

Köszönöm *Dr. Péterfi Zoltánnak* és *Dr. Lőrincz Péternek* a dolgozat alapos átolvasását.

Végül szeretnék köszönetet mondani *családomnak*, akik mellettem álltak és támogattak minden lehetséges módon. Különösen hálás vagyok *Dr. Lőrincz Péternek*, aki hitt bennem, támogatott, bátorított még a legnehezebb pillanatokban is.

REFERENCIÁK

- [1] Knobil E., "The neuroendocrine control of ovulation," *Hum Reprod*, 1988 vol. 3, no. 4, pp. 469-72.
- [2] Radovick S., Levine J.E., and Wolfe A., "Estrogenic regulation of the GnRH neuron," *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2012 vol. 3, p. 52.
- [3] Hrabovszky E. *et al.*, "Estrogen receptor-beta immunoreactivity in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain," *Endocrinology*, 2001 vol. 142, no. 7, pp. 3261-4.
- [4] Hrabovszky E., Kallo I., Szlavik N., Keller E., Merchenthaler I., and Liposits Z., "Gonadotropin-releasing hormone neurons express estrogen receptor-beta," *J Clin Endocrinol Metab*, 2007 vol. 92, no. 7, pp. 2827-30.
- [5] Kallo I., Butler J.A., Barkovics-Kallo M., Goubillon M.L., and Coen C.W., "Oestrogen receptor beta-immunoreactivity in gonadotropin releasing hormone-expressing neurones: regulation by oestrogen," *J Neuroendocrinol*, 2001 vol. 13, no. 9, pp. 741-8.
- [6] Marino M., Galluzzo P., and Ascenzi P., "Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription," *Curr Genomics*, 2006 vol. 7, no. 8, pp. 497-508.
- [7] Abe H., Keen K.L., and Terasawa E., "Rapid action of estrogens on intracellular calcium oscillations in primate luteinizing hormone-releasing hormone-1 neurons," *Endocrinology*, 2008 vol. 149, no. 3, pp. 1155-62.
- [8] Kelly M.J. and Ronnekleiv O.K., "Membrane-initiated actions of estradiol that regulate reproduction, energy balance and body temperature," *Front Neuroendocrinol*, 2012 vol. 33, no. 4, pp. 376-87.
- [9] Kwakowsky A., Cheong R.Y., Herbison A.E., and Abraham I.M., "Non-classical effects of estradiol on cAMP responsive element binding protein phosphorylation in gonadotropin-releasing hormone neurons: mechanisms and role," *Front Neuroendocrinol*, 2014 vol. 35, no. 1, pp. 31-41.
- [10] Abraham I.M., Han S.K., Todman M.G., Korach K.S., and Herbison A.E., "Estrogen receptor beta mediates rapid estrogen actions on gonadotropin-releasing hormone neurons in vivo," *J Neurosci*, 2003 vol. 23, no. 13, pp. 5771-7.
- [11] Chu Z., Andrade J., Shupnik M.A., and Moenter S.M., "Differential regulation of gonadotropin-releasing hormone neuron activity and membrane properties by acutely applied estradiol: dependence on dose and estrogen receptor subtype," *J Neurosci*, 2009 vol. 29, no. 17, pp. 5616-27.
- [12] Moenter S.M. and DeFazio R.A., "Endogenous gamma-aminobutyric acid can excite gonadotropin-releasing hormone neurons," *Endocrinology*, 2005 vol. 146, no. 12, pp. 5374-9.
- [13] Watanabe M., Sakuma Y., and Kato M., "GABAA receptors mediate excitation in adult rat GnRH neurons," *Biol Reprod*, 2009 vol. 81, no. 2, pp. 327-32.
- [14] DeFazio R.A., Heger S., Ojeda S.R., and Moenter S.M., "Activation of A-type gamma-aminobutyric acid receptors excites gonadotropin-releasing hormone neurons," *Mol Endocrinol*, 2002 vol. 16, no. 12, pp. 2872-91.
- [15] Herbison A.E. and Moenter S.M., "Depolarising and hyperpolarising actions of GABA(A) receptor activation on gonadotrophin-releasing hormone neurones: towards an emerging consensus," *J Neuroendocrinol*, 2011 vol. 23, no. 7, pp. 557-69.
- [16] Farkas I. *et al.*, "Retrograde endocannabinoid signaling reduces GABAergic synaptic transmission to gonadotropin-releasing hormone neurons," *Endocrinology*, 2010 vol. 151, no. 12, pp. 5818-29.
- [17] Chelikani P.K., Haver A.C., and Reidelberger R.D., "Intravenous infusion of glucagon-like peptide-1 potently inhibits food intake, sham feeding, and gastric emptying in rats," *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2005 vol. 288, no. 6, pp. R1695-706.
- [18] Drucker D.J., "The biology of incretin hormones," *Cell Metab*, 2006 vol. 3, no. 3, pp. 153-65.
- [19] MacLusky N.J. *et al.*, "Neuroendocrine function and response to stress in mice with complete disruption of glucagon-like peptide-1 receptor signaling," *Endocrinology*, 2000 vol. 141, no. 2, pp. 752-62.
- [20] Outeirino-Iglesias V., Romani-Perez M., Gonzalez-Matias L.C., Vigo E., and Mallo F., "GLP-1 Increases Preovulatory LH Source and the Number of Mature Follicles, As Well As Synchronizing the Onset of Puberty in Female Rats," *Endocrinology*, 2015 vol. 156, no. 11, pp. 4226-37.

