

A periszomatikus gátlás szerveződése és hatása a fősejtek
aktivitására a bazolaterális amygdalában

Doktori tézisek

Veres Judit

Semmelweis Egyetem

Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Hájos Norbert, PhD, DSc.

Hivatalos bírálók:

Puskár Zita, PhD

Kisvárday Zoltán, PhD, DSc

Szigorlati bizottság tagjai:

Kamondi Anita, PhD, DSc

Wittner Lucia, PhD

Zelles Tibor, PhD

Budapest

2016

I. Bevezetés

Az agykérgi információfeldolgozás során idegsejtek milliói működnek térben és időben precízen összehangolva, melyet számos sejt- és hálózat szintű szabályozási folyamat biztosít. Hálózati szinten a sejtek kapcsolódásának mintázata, valamint a serkentő és gátló hatások finom szabályozása elengedhetetlen az agykéreg fiziológias működéséhez, és már csekély változás a kapcsolatokban is igen komoly patológias állapotokhoz vezethet, mint például az epilepsziás rohamok vagy a skizofrénia tünetegyüttes. A hálózati kapcsolatok logikájának felderítése, valamint az egyes idegsejtek egymásra való hatásának a megismerése fontos az agykéreg működésének megértéséhez. A bazolaterális amygdala strukturálisan és fejlődéstanilag is az agykéreghez tartozó terület, mely bizonyítottan kritikus szerepet játszik a félelmi memórianyomok kialakításában, illetve azok kioltásában. Az itt található neuronhálózatok felépítésének és működésének a megismerése tehát hozzájárulhat ahhoz, hogy megértsük az általános agykérgi információfeldolgozás és tanulás folyamatának mechanizmusait, valamint ezek változásait patológias állapotokban.

A kérgi struktúrák két fő sejtípusból állnak: 80-90%-a a sejteknek serkentő fősejt, míg 10-20%-a gátló interneuron. Bizonyított, hogy a lokális gátlósejtek megfelelő működése kiemelkedően fontos szerepet játszik a félelmi memórianyomok kialakításában, illetve azok kioltásában. A különböző gátlósejtípusok közül az utóbbi években különös figyelmet kaptak azok, melyek a fősejtek periszomatikus régióját idegzik be. Ez a membránfelület - mely magában foglalja az axon kezdeti szakaszát, a sejttestet és a dendritek proximális részét - fontos szerepet játszik a sejtek működésében, mivel a dendritekre beérkező jelek itt integrálódnak, valamint itt alakul ki az akciós potenciál. A periszomatikus régióra érkező gátló bemenetek tehát elhelyezkedésük által kulcspozícióban vannak a fősejtek aktivitásának szabályozásához és a sejtek működésének szinkronizálásához. A periszomatikus gátlósejtek három fő csoportba oszthatóak: axo-axonikus sejtekre és két típusú kosáresejtre. Az axo-axonikus sejtek a fősejtek axon kezdeti szakaszát innerválják, míg a két kosáresejtípus túlnyomóan a fősejtek sejttestjén és proximális dendritjén képeznek szinapszisokat, illetve némely esetben más interneuronokon is végződnek. A két kosáresejtípust neurokémiai marker tartalmuk alapján tudjuk elkülöníteni: az egyik típus parvalbumin kalcium

kötő fehérjét tartalmaz (PVBC- parvalbumin containing basket cell), míg a másik kolecisztokinint és 1-es típusú endokannabinoid receptort (CB₁) fejez ki (CCK/CB₁BC-cholecystokinin and CB₁ containing basket cell). Egyre több bizonyíték utal arra, hogy ez a két sejttípus merőben más szerepet tölt be a kortikális hálózati működések során: a PVBC-k képesek lehetnek a fősejtek aktivitásának szinkronizálására, ezáltal ritmikus hálózati aktivitások létrehozására, míg a CCK/CB₁BC-k a hálózat finomszabályozásában vehetnek inkább részt. A bazolaterális amygdalában eddig sajnos csak kevés adat áll rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy a különböző típusú gátlósejtek hogyan járulnak hozzá a hálózat működéséhez. Az azonban már bizonyított, hogy a parvalbumint tartalmazó gátlósejtek megfelelő aktivitása elengedhetetlen a félelmi memórianyomok kialakításához. Noha már régóta ismert a periszomatikus gátlósejtek fontos szerepe a hálózati működésekben, még mindig nagyon keveset tudunk arról, hogy az egyes gátlósejtek milyen hatékonyan képesek befolyásolni a fősejtek aktivitását, és hogy hány gátlósejt szinkronizált működése szükséges a fősejtek teljes gátlásához. Hiányosak az ismereteink még a gátló kapcsolatok alapvető anatómiai tulajdonságairól, illetve arról, hogy ezek a sejtek hogyan vannak integrálva

bazolaterális amygdala idegsejt-hálózatába. Az itt található gátlósejtek elektrofiziológiai és anatómiai vizsgálata segítségünkre lehet a kérgi idegsejt-hálózatok működésének megértésben, valamint a sejt- és hálózatszintű kérgi tanulási folyamatok mechanizmusának a feltárásában.

II. Célkitűzések

Vizsgálataink során a fősejtekre érkező periszomatikus gátló bemenetek szerveződését és ezek gátló hatékonyságát vizsgáltuk a bazolaterális amygdalában, az alábbi három fő témakörre összpontosítva:

I. A periszomatikus régióra érkező gátló bemenetek sűrűségének meghatározása, illetve a különböző sejtektől érkező bemenetek arányának vizsgálata.

II. Az axo-axonikus sejtek által biztosított gátlás elektrofiziológiai és morfológiai tulajdonságainak vizsgálata, és a fősejtek aktivitására kifejtett hatásuk meghatározása.

III. A PVBC és CCK/CB₁BC kosársejtek által biztosított gátlás elektrofiziológiai és morfológiai tulajdonságainak összehasonlítása, valamint a fősejtek aktivitására kifejtett hatásuk meghatározása.

III. Módszerek

In vitro elektrofiziológia módszerek

Minden vizsgálat megfelelt a magyar Állatvédelmi Törvényben leírtaknak (243/1998 (XII.31.) kormányrendelet, megújítva a 40/2013 kormányrendeletben), és az intézeti Állatetikai Tanács engedélyével rendelkezett. A kísérletek során 18-24 napos transzgenikus egereket használtunk két törzsből. Az axo-axonikus és PVBC-k vizsgálatára a parvalbumin promoter aktivitásának hatására zöld fluoreszcens fehérjét (eGFP) kifejező egereket használtunk (Meyer et al., 2002), míg a CCK/CB₁BC-k vizsgálatára a kolecisztokinin promoter hatására piros fluoreszcens fehérjét (DsRed) kifejező egértörzset használtunk (Máté et al., 2013). Az egereket izofluránnal mélyen elaltattuk, agyukat eltávolítottuk, és 200 µm vastag horizontális szeleteket készítettünk, melyek legalább 1 óráig inkubálódtak mesterséges cerebrospinalis folyadékban

szobahőmérsékleten *interface* típusú kamrában az elvezetések előtt, melyeket *submerged* típusú kamrában végeztünk 32°C hőmérsékleten. A *whole cell* páros elvezetésekhez K-glukonát alapú, 4 mM Cl⁻-t tartalmazó oldatot használtunk, mely biocitint (interneuron elvezetések) vagy Alexa488 festéket (fősejt elvezetések) tartalmazott a neuronok megjelölésére. A preszinaptikus interneuronok *current clamp* módban -65 mV-on voltak elvezetve, és az akciós potenciálok kiváltásához rövid négyszög impulzusokat használtunk (2 ms, 1.5–2 nA). A posztszinaptikus válaszok a fősejtekben *voltage clamp* módban -45 mV-on, *current clamp* módban -55 mV-on voltak monitorozva. A perforated patch elvezetésekhez 100 mg/ml gramicidin tartalmú oldatot használtunk. Az elvezetések után a szeletek 4%-os paraformaldehid (PFA) oldatban lettek fixálva, és a jelölt sejtek biocitin- illetve Alexa488 tartalmát fluoreszcens immunhisztokémiai módszerekkel tettük láthatóvá. A sejtek és a köztük lévő kapcsolatok morfológiai tulajdonságait konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. A szinaptikus kapcsolatok vizsgálatához a sejt párokat néhány esetben elektronmikroszkóp segítségével is megvizsgáltuk.

Anatómiai módszerek

A gátló bemenetek vizsgálatára C57Bl/6J törzsből származó egerek agyát transzkardiális perfúzióval fixáltuk 0.2 M Na-acetát pufferben oldott 2% PFA (pH 6.0), vagy 0.1 M foszfát pufferben oldott 2.5% acrolein és 4% PFA (pH 6.8) oldat használatával. A gátló terminálisokat fluoreszcens immunfestés segítségével tettük láthatóvá tengerimalacban vezikuláris γ -amino vajsav transzporter (VGAT) ellen termeltetett IgG (Frontier Institute Co. Ltd 1:1000) és kecskében glutamát dekarboxiláz (panGAD) ellen termeltetett IgG (Frontier Institute Co. Ltd 1:500) elsődleges antitest használatával, melyeket Cy3 másodleges antitesttel jelöltünk (Cy3 kapcsolt tengerimalac IgG ellen termeltetett szamar IgG és kecske IgG ellen termeltetett szamar IgG, 1:200). A fősejtek periszomatikus régiójának jelölésére egérben termeltetett Kv2.1 (1: 1000, 75-014, Neuromab) elleni elsődleges antitestet, és egér IgG ellen termeltetett Alexa488 kapcsolt szamar másodlagos antitestet használtunk (1:200). Az axon kezdeti szakasz jelölésére egérben termeltetett Ankyrin G elleni (Santa Cruz 1:200) vagy nyúlban termeltetett Nav 1.6 elleni (1:500, Alomone Labs) elsődleges antitestet használtunk. A gátló bemenetek eredetének vizsgálatához az alábbi elsődleges antitesteket használtuk: nyúlban termeltetett CB₁ elleni

(1:1000, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI), tengerimalacban termeltetett VGAT elleni (1:1000, Frontier Institute Co. Ltd.), kecskében termeltetett PV elleni (1:5000, Swant) IgG. A fluoreszcens jelölések vizsgálatához Nikon A1R konfokális mikroszkópot használtunk (60x apokromatikus objektív, N.A.: 1.4, z lépés méret: 0.13 μm , xy mintavétel: 0.06 $\mu\text{m}/\text{pixel}$). A kolokalizációk analizését, illetve a sejtek és bemenetek rekonstrukcióját a Nikon Imaging System és a Neurolucida 10.53 szoftver segítségével végeztük.

IV. Eredmények

I. A periszomatikus gátló bemenetek szerveződése

A fősejtek periszomatikus régiójához tartozik a sejttest, az axon kezdeti szakasza, valamint a dendritek proximális része. A dendriteken azonban még nincs pontosan meghatározva a periszomatikus régió kiterjedése. Mivel tudott, hogy a sejttestre szinte kizárólag gátló bemenet érkezik, míg a serkentő bemenetek a dendrittüskékre érkeznek, ezért jó megközelítés lehet a funkcionálisan a periszomatikus régióhoz tartozó dendritszakaszok definiálására a serkentő és gátló bemenetek arányának meghatározása a dendrit mentén. Ehhez rekonstruáltuk a fősejtek dendittüskéit, valamint a gátló

bemeneteket fluoreszcens immunjelölés segítségével. Eredményeink azt mutatták, hogy a funkcionálisan a periszomatikus régióhoz tartozó dendritszakaszok hossza nagy variabilitást mutat az egyes dendriteken (5-50 μm), és pozitív összefüggésben van az adott dendrit kezdeti átmérőjével. Bizonyítottuk továbbá, hogy a 2.1-es típusú feszültségfüggő kálium csatorna (Kv2.1) immunfluoreszcens jelölése alkalmas eszköz a periszomatikus régió megjelenítésére a bazolaterális amigdalában.

Az immunjelölt gátló terminálisok kvantifikálása azt mutatta, hogy a fősejtek átlagosan ~ 53 gátló bemenetet kapnak az axon kezdeti szakaszra, ~ 160 -at a sejttestre, és ~ 70 -et a periszomatikus régióhoz tartozó dendritszakaszokra. Eredményeink bizonyították, hogy az axon első $\sim 10 \mu\text{m}$ -én a gátló bemeneteket a PVBC-k biztosítják, míg összességében az AAC-k adják az axon kezdeti szakaszra érkező gátlás döntő többségét (93-94%). A sejttestre és a proximális dendritekre érkező gátló bemenetek 40%-a a PVBC-ktől, míg 27%-a a CCK/CB₁BC-ktől ered. A gátlósejtek targeteloszlásának vizsgálata kimutatta, hogy mindkét kosársejttípus azonos arányban innerválja a periszomatikus régiót és a disztálisabb dendriteket ($\sim 50\%$), de a PVBC-k átlagosan több terminálissal képeznek szinapszist egy-egy fősejten, mint a CCK/CB₁BC-k

(5.8 vs. 3.9). Eredményeink alapján megállapítható, hogy hasonló számú PVBC (15-16) és CCK/CB₁BC (16-17) konvergál egy piramis-sejt periszomatikus régióján.

II. Az axo-axonikus sejtek kimenetének elektrofiziológiai és morfológiai jellemzése, és hatása a fősejtek működésére

Az AAC-k kimenetének vizsgálatához először páros elvezetéssel kombinált *perforated patch* méréseket végeztünk, hogy ne változtassuk meg a posztszinaptikus fősejtben lévő ionok természetes összetételét, mivel ez hatással van a mért válaszokra. A preszinaptikus AAC-ben kiváltott akciós potenciál okozta posztszinaptikus válaszok reverz potenciáljának és a fősejt nyugalmi membránpotenciáljának összehasonlításával bizonyítottuk, hogy ez az interneuron típus gátolja a fősejteket. További kísérleteink eredményei azt mutatták, hogy az AAC-k igen hatékonyan képesek meggátolni az akciós potenciál generálást a fősejtekben (80%-al csökkentették a kisülési valószínűséget), illetve képesek időben eltolni, akár 30 ms-al, a tüzelést.

A gátló kapcsolat háttérében álló morfológiai tulajdonságok felderítéséhez az elektrofiziológiai mérések során megjelölt párok közötti feltételezett szinaptikus kapcsolatok számát és térbeli elhelyezkedését vizsgáltuk

konfokális mikroszkóp segítségével. A feltételezett kapcsolatok egy részéről elektronmikroszkópos vizsgálatokkal bizonyítottuk, hogy szinaptikus kontaktust képeznek. Eredményeink azt mutatták, hogy az AAC-k átlagosan ~8.4 kontaktust képeznek a fősejteken, és azok a sejtek, melyek több kapcsolatot képeztek, nagyobb hatékonysággal voltak képesek legátolni a fősejt tüzelését. Két-három AAC együttes aktivitása szükséges ahhoz, hogy teljes bizonyossággal meggátolják a piramisajt kisülését. A terminálisok eloszlásának elemzése kimutatta, hogy az AAC-k elsősorban a 20 és 40 μm közötti szakaszt innerválják az axon kezdeti szakasznak, függetlenül attól, hogy hány kontaktust képeznek az adott sejten. Szimultán sejttest és axon elvezetésekkel bizonyítottuk, hogy ez az a régió, ahol az akciós potenciál keletkezik. Ezen eredmények arra utalnak, hogy az AAC-k által képzett gátló kapcsolatok elhelyezkedése a legmegfelelőbb arra, hogy az akciós potenciálok kialakulását hatékonyan szabályozzák.

III. A kosársejtek kimenetének elektrofiziológiai és morfológiai összehasonlítása, és hatásuk a fősejtek működésére

A kosársejtek kimenetének elektrofiziológiai vizsgálatához szinaptikusan kapcsolt gátlósejt- fősejt

párelvezetéseket végeztünk. Kimutattuk, hogy a PVBC-k és a CCK/CB₁BC-k által képzett gátló kapcsolatok alapvető kinetikai tulajdonságai nem különböznek. Mindkét sejtípus ugyanolyan nagy hatékonysággal képes megakadályozni a fősejtek tüzelését (75%-os csökkenés a tüzelési valószínűségben), vagy időben eltolni az akciós potenciált akár 38 ms-al.

Az elektrofiziológiai mérések során megjelölt párok közötti kapcsolatokat immunfluoreszcens jelölés segítségével tudtuk vizsgálni. Eredményeink azt mutatták, hogy mindkét kosársejtípus számos kapcsolatot képez a posztszinaptikus fősejteken (1-25 kontaktus) mind a sejttesten, mind pedig proximális és disztális dendritikus régiókon is. A kapcsolatok száma, átlagos távolsága a sejttestől, illetve a periszomatikus régió képzett kapcsolatok száma sem volt különböző. Az elektrofiziológiai és morfológiai adatok összevetése megmutatta, hogy a tüzelést gátló hatásuk hatékonysága leginkább a periszomatikus régió található kontaktusok számától függött. Eredményeink tehát azt mutatták, hogy mindkét kosársejtípus képes hatékonyan szabályozni a fősejtek működését, melynek háttérében a kapcsolatok hasonló elektrofiziológiai és morfológiai tulajdonságai állnak.

Mindkét kosárasejtípusban megfigyelhetőek voltak olyan gátlósejtek, melyek inkább a megjelölt posztszinaptikus sejt dendritikus régióját innerválták, míg más gátlósejtek többnyire a periszomatikus régiót célozták. Felmerül a kérdés tehát, hogy ezek a sejtek a többi szomszédos fősejtet is ugyanilyen mintázattal innerválják-e, azaz csoportosíthatóak-e az interneuronok dendritikus, illetve periszomatikus régiót innerváló gátlósejtekként. Ennek eldöntéséhez kétféle módszert alkalmaztunk. Először 3 posztszinaptikus sejtet is megjelöltünk a szeletben, és analizáltuk az egyetlen megjelölt gátlósejt célelemeloszlását mindegyik sejtben. A másik módszer során egy jelölt interneuron célelemeloszlását vizsgáltuk a szomszédos, 10-20 db Kv2.1 által kijelölt fősejt periszomatikus régióján. Mindkét módszerrel bizonyítottuk, hogy egy gátlósejt nagyon változatos számú és eloszlású kontaktust képez a fősejtek teljes szomatodendritikus felületén, tehát nem lehet a sejteket kategóriákba sorolni a targeteloszlásuk alapján. Mint populáció azonban mind a PVBC-k, mind pedig a CCK/CB₁BC-k főképp a fősejtek periszomatikus régióját célozzák, jogosan nevezhetőek tehát kosárasejteknek.

V. Következtetések

A tanulmány fő eredményei a következők:

- A fősejtek sejttestje és proximális dendritjeire érkező gátlás döntő többségében két kosársejt típustól ered, melyek különböznek neurokémiai és elektrofiziológiai tulajdonságaikban.
- Hasonló számú PVBC és CCK/CB₁BC konvergál egy fősejtre (15-17)
- Mindkét kosársejttípus egyaránt képez szinapszisokat a sejttesten, a proximális és disztális dendriteken.
- Mindkét kosársejttípus hasonló nagy hatékonysággal képes megakadályozni vagy időben eltolni a fősejtek tüzelését.
- Az axon kezdeti szakasz első 10 µm-ét a PVBC-k innerválják, míg a teljes hosszában legnagyobb arányban az AAC-k képeznek gátló szinapszisokat.
- Az AAC-k hatása hiperpolarizáló nyugalmi membránpotenciálon.
- Az AAC-k hatékonyan képesek gátolni az akciós potenciál generálást, illetve képesek időben eltolni azt. 2-3 sejt együttes aktivitása szükséges a tüzelés teljes gátlásához.

- Az AAC-k szinapszisaikat az akciós potenciál generálódásának helyén képzik, mely lehetővé teszi, hogy a legnagyobb hatékonysággal legyenek képesek befolyásolni a fősejtek tüzelését.

Eredményeink azt mutatják, hogy a három fő periszomatikus régiót innerváló sejtípus az amygdalában igen hatékonyan képes befolyásolni a fősejtek aktivitását. A fősejtek térben és időben precízen szabályozott gátlásával ezen sejtípusok fontos szerepet játszhatnak a bazolaterális amygdala működésében a különböző viselkedési folyamatok során.

VI. Saját közlemények jegyzéke

A disszertáció témájához kapcsolódó közlemények:

Vereczki VK¹, Veres JM¹, Müller K, Nagy GA, Rácz B, Barsy B, Hájos N

Synaptic organization of perisomatic GABAergic inputs onto the principal cells of the mouse basolateral amygdala. *Frontiers in Neuroanatomy*, 2016, Volume 10 Article 20

¹megosztott elsőszerezőség

Veres JM, Nagy GA, Vereczki VK, Andrási T, Hájos N
Strategically positioned inhibitory synapses of axo-axonic cells potently control principal neuron spiking in the basolateral amygdala. *Journal of Neuroscience*, 2014 Dec 3;34(49):16194-206.

Egyéb közlemények:

Zemankovics R, **Veres JM**, Oren I, Hájos N

Feedforward inhibition underlies the propagation of cholinergically induced gamma oscillations from hippocampal CA3 to CA1. *Journal of Neuroscience*, 2013 Jul 24;33(30):12337-51.

Holderith N, Németh B, Papp OI, **Veres JM**, Nagy GA,
Hájos N

Cannabinoids attenuate hippocampal gamma oscillations by suppressing excitatory synaptic input onto CA3 pyramidal neurons and fast spiking basket cells. *Journal of Physiology*, 2011 Oct 15;589(Pt 20):4921-34.

Cserép C, Szonyi A, **Veres JM**, Németh B, Szabadits E, de Vente J, Hájos N, Freund TF, Nyiri G

Nitric oxide signaling modulates synaptic transmission during early postnatal development. *Cerebral Cortex*, 2011 Sep;21(9):2065-74.