

A lokális eredetű serkentő beidegzés funkcionális szerveződésének vizsgálata a bazális amigdala gátlósejtjein

Doktori tézisek

Andrási Tibor

Semmelweis Egyetem

Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető:

Hájos Norbert, Ph.D., D.Sc.

Hivatalos bírálók:

Zelles Tibor, Ph.D.

Molnár Gábor, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke:

Kamondi Anita, Ph.D., DS.c.

Szigorlati bizottság tagjai:

Wittner Lucia, Ph.D.

Alpár Alán, Ph.D., D.Sc.

Budapest

2018

BEVEZETÉS

Az idegrendszer működése a benne található serkentő- (principális neuron, PN) és gátlósejtek (interneuron, IN) közötti kapcsolatrendszeren alapul. A neurotranszmitterként gamma-amino vajsavat (GABA) használó kosár- és axo-axonikus sejtek a PN-k periszomatikus régióját idegzik be, ami az egyik leghatékonyabb módja a PN-k aktivitásának a befolyásolására. Ennek köszönhetően a periszomatikus régiót célzó IN-k (PTI-k) alapvető szerepet játszanak az agy működésében és olyan kognitív folyamatokban, mint pl. a tanulás, emlékezet, érzékelés, valamint a motoros funkciók. Ezen IN-k egészséges működése létfontosságú, mivel rendellenes működésük tetten érhető számos neurológiai és pszichiátriai betegségben, pl. epilepsziában, skizofréniában vagy az autizmusban. A kérgi hálózatokban két különböző kosársejt típus fordul elő, a parvalbaumint (PV), valamint a kolecisztokinint (CCK) tartalmazó IN-k, melyek a PN-k szómájára és proximális dendritjére érkező gátló beidegzés túlnyomó részét adják, míg a PN-k axon iniciális szegmentumát a PV tartalmú axo-axonikus sejtek idegzik be. A mai tudásunk szerint a két kosársejt típus számos

fiziológiás tulajdonságában eltér egymástól, mely azt sugallja, hogy eltérő funkciót töltenek be az idegi hálózatok működésében, és amelyet tovább erősít az a tény, hogy eltérő kapcsolatrendszerrel rendelkeznek. Azonban a periszomatikus gátlás alapvető szerveződési elvei máig nem teljesen tisztázottak.

Az amigdala bazális magja (BA) egy olyan kérgi eredetű struktúra az agyban, melynek fontos szerepet tulajdonítunk a félelmi tanulásban. Az itt található PN-k távolra vetítő axonjaikkal, valamint lokális kollaterálisai révén glutamát segítségével serkentik a posztszinaptikus partnereiket. Ezzel szemben a BA neuronpopulációjának csupán a 20 %-át adó IN-k axon felhője többnyire lokálisan található. A korábban, más kérgi hálózatokban már leírt három különböző típusú PTI szintén megtalálható az amigdalában. Ahhoz, hogy megértsük a BA neuronhálózatának a működését elengedhetetlenül szükséges ezen sejtek szinaptikus kapcsolatainak a pontos megismerése.

CÉLKITÚZÉS

A doktori munkám során arra próbáltam választ találni, hogy az egyes PTI-kat hogyan aktiválják a lokális PN-k az idegi működés során. Ennek érdekében kísérletet tettem a PTI-k és a lokális PN-k szinaptikus kapcsolatrendszerének a feltérképezésére és jellemzésére. Három fő kérdésre kerestem a választ, melyek a következők:

I. A BA-ban található PTI-k be- és kimeneti tulajdonságainak a jellemzése.

II. A lokális PN-októl érkező visszacsatoló serkentés vizsgálata a különböző PTI típusokon.

III. A PN-k és PTI-k közötti kapcsolatrendszer szerveződési elvének a feltérképezése a BA-ban.

MÓDSZEREK

Minden vizsgálat megfelelt a magyar Állatvédelmi Törvényben leírtaknak, valamint az Európai Unió állatkísérletekre vonatkozó irányelveinek és az intézeti Állatetikai Tanács engedélyével rendelkezett.

Kísérleteink során hím és nőstény felnőtt transzgén, illetve kettős transzgén egereket használtunk, melyekben a Pvalb (BAC-PV-eGFP) promóternek köszönhetően zöld fluoreszcens fehérje (eGFP) fejeződött ki a parvalbumint expresszáló sejtekben, illetve a Cck promóternek köszönhetően piros fluoreszcens fehérje (DsRed) fejeződött ki a CCK-t expresszáló sejtekben, illetve értelemszerűen mindkettő a kettős transzgén állatban. Az elektrofiziológiai elvezetésekhez horizontális, 200 μm vastag túlélő agyszeletet készítettünk, mely tartalmazta a BA-t. A sejtek tüzelési sajátosságainak meghatározásához whole-cell (WC) elvezetés közben a sejtekbe 800 ms hosszú hiperpolarizáló, illetve depolarizáló áramlépcsőket adtunk. A WC páros elvezetések során (IN \rightarrow PN, IN \rightarrow IN, PN \rightarrow IN) a preszinaptikus sejtben 3-10 akciós potenciált váltottunk ki, miközben a gátló, ill. serkentő válaszokat a posztszinaptikus sejtben regisztráltuk. Ezután offline kiértékeljük a válaszokat, és meghatároztuk a szinaptikus jelátvitel alapvető tulajdonságait. Az PTI-k aktivációs küszöbének meghatározásához, valamint a kapcsolati térkép elkészítéséhez adeno-asszociált vírus vektor segítségével channelrhodopsin 2-t (ChR2) fejeztettünk ki a lokális PN-okban. A kísérlet során elvezettük valamelyik PTI típust WC

módban, mialatt a környező PN-k sejttestjét egyenként megvilágítottuk kék fénnel (447 nm) és ezzel egy időben loose-patch módban ellenőriztük a PN-k sikeres aktiválását. Az aktiválási küszöb meghatározásához minden esetben loose-patch módban, egyszerre vezettük el a két kosársejt típust, miközben fokozatosan növelt intenzitású megvilágítással (447 nm) szukcesszív módon aktiváltuk a környező ChR2-t tartalmazó PN populációt. A kvantális események méréséhez a PTI-k WC elvezetése során 0.5 μ M tetrodotoxint (TTX) alkalmaztunk.

Az elvezetett és biocytinnel megtöltött sejtek morfológiai elemzéséhez Cy3-, Alexa488- vagy Alexa647-konjugált sztreptavidinnel tettük láthatóvá a sejteket. A konfokális mikroszkóppal készült felvételek alapján elkészítettük a sejt párok 3D rekonstrukcióját és megjelöltük a feltételezhetően a preszinaptikus PN-től érkező szinaptikus kapcsolatokat. Néhány esetben a szinaptikus kapcsolat létét elektronmikroszkópos vizsgálattal erősítettük meg. Az egyes PTI típusok beazonosítását a neurokémiai profiljuk alapján végeztük. A kosársejtekre érkező serkentő terminálisok számának meghatározásakor a terminálisokat VGlut1 immunjelöléssel tettük láthatóvá és egy a szinapszisoknál található preszinaptikus fehérje (bassoon) segítségével

döntöttük el, hogy az adott terminális szinapszist képez-e a IN dendritjével, avagy sem. A különböző PTI-k dendritjein 3D STORM szuper rezolúciós képalkotási eljárást használtunk. A vizsgálat során összegyűjtöttük a lokalizációs pontokat és meghatároztuk a lokalizációs pontok klasztereinek a 2D méretét, valamint a lokalizációs pontok eloszlását. Az IN-k közötti szinaptikus kapcsolatok immunhisztokémiai vizsgálatához CCK-DsRed és vad típusú egereket használtunk, melyekben a gátlószinapszisokra jellemző, GABA_A receptor horgonyzó fehérje, a gephyrin segítségével határoztuk meg, hogy van-e szinaptikus kapcsolat a preszinaptikus IN terminálisa és a posztzinaptikus IN membránja között.

EREDMÉNYEK

I. A BA-ban található PTI-k be- és kimeneti tulajdonságainak a jellemzése.

Első lépésben WC patch clamp módszerrel meghatároztuk a különböző PTI típusok aktív és passzív membrán tulajdonságait. Ennek eredményeként azt találtuk, hogy a PV tartalmú PTI-k membrán tulajdonságai

lényegesen különböznek a CCK-s kosáresejtektől. A PV-s kosár- és axo-axonikus sejtek akciós potenciálja keskeny, valamint nem akkomodáló, gyorstüzelő fenotípust mutatnak a CCK-s kosáresejtekhöz képest. További részletes vizsgálatok során current clamp módban fokozatosan növekvő depolarizáló és hiperpolarizáló áramlépcsőket adtunk a sejtekbe, hogy meghatározzuk a be- és kimeneti tulajdonságaikat, majd a tüzelés mértékét. A kezdeti kisebb depolarizáló áramlépcsőkre mindhárom sejtípus hasonlóan válaszolt, azonban a nagyobb áramok esetében már az axo-axonikus sejtek mutatták a leggyorsabb tüzelést, a CCK-s kosáresejtek viszont legalacsonyabbat. Ezen eredmények alapján jelentős különbségeket figyelhetünk meg a PV-t tartalmazó és CCK-t tartalmazó PTI-k aktív és passzív membrán tulajdonságai között.

Az egyes sejtípusok be- és kimeneti tulajdonságai mellett a következő lépésben megvizsgáltuk a PN-okra adott gátló szinapszisaiknak a tulajdonságait. Ehhez WC páros elvezetést végeztünk az egyes PTI-k és a PN-k között a BA-ban. Az eredmények elemzése során nem találtunk lényeges különbséget az egyes típusok között az amplitúdó és a válasz lecsengésének a kinetikája között, azonban a CCK-s kosáresejtektől érkező válaszok felfutása és késése

szignifikánsan eltért a PV-s sejtektől. További vizsgálatok során megállapítottuk, hogy a szinaptikus transzmisszió mindhárom PTI típusnál depresszálo rövidtávú dinamikát mutat, ami a tüzelési frekvencia növekedésével erősödik. A következőkben megvizsgáltuk vajon az egyes PTI típusok képesek-e aszinkron vezikula ürítésre. Az eredményeink azt mutatták, hogy akciós potenciál sorozattal a CCK-s kosársejtekben ki lehet váltani aszinkron vezikula ürítést, azonban a PV-t tartalmazó sejtekben nem. Az eredmények alapján a CCK-s kosársejtek, szemben a PV-t tartalmazó PTI-okkal, képesek elnyújtott gátló hatást kifejteni a hálózat magas aktivitási szintje mellett.

Az eddigi eredmények alapján, a szinaptikus átvitelben talált hasonlóságok arra engedtek következtetni, hogy a három különböző PTI gátló hatékonysága hasonló mértékű lehet. Ahhoz, hogy ezt a feltevést ellenőrizzük, a következő kísérletben páros elvezetés során a posztzinaptikus PN-ban egy szinusz hullám alakú áraminjekcióval akciós potenciált váltottunk ki, miközben a preszinaptikus IN-t szintén aktiváltuk (3 AP, 30 Hz). Az IN aktiválását a PN-ba adott szinuszhullám csúcsához igazítottuk, ugyanis a posztzinaptikus sejt kisülési valószínűsége itt a legnagyobb. Az előzetes eredményeknek

megfelelően azt találtuk, hogy mindhárom PTI nagyjából ugyanolyan hatékonysággal képes gátolni a PN-k aktivitását.

II. A lokális PN-októl érkező visszacsatoló serkentés vizsgálata a különböző PTI típusokon.

A következő lépésben azt vizsgáltuk, hogy a hasonló gátló hatékonysággal rendelkező PTI típusokat vajon milyen módon aktiválják a lokális PN-k. Ahhoz, hogy ezt kideríthessük, loose-patch módszerrel, egy időben megmértük a PV-s és CCK-s kosársejtek aktiválódási küszöbét, miközben fokozatosan növekvő intenzitású fény segítségével, szukcesszív módon egyre nagyobb mennyiségű ChR2-t tartalmazó PN-t aktiváltunk. A mérések során azt figyeltük meg, hogy a PV-s kosársejtek aktiválásához alacsonyabb fényerő, tehát kevesebb PN együttes aktivitása is elég volt, szemben a CCK-s kosársejtekkel. Ebből az következik, hogy a két kosársejttípus eltérő szintű hálózati aktivitás hatására aktiválódik.

A következő lépésben megvizsgáltuk a helyi PN-okról érkező szinapszisokat, hogy kiderítsük az okát az eltérő serkenthetőségnek. Elsőként immunhisztokémiai módszerekkel meghatároztuk az egyes kosársejttípusokra érkező serkentő szinapszisok mennyiségét. Azt találtuk,

hogy a VGlut1 jelöléssel láthatóvá tett serkentő terminálisok szignifikánsan nagyobb számban borították a PV-s kosáresejtek dendritjeit, mint a CCK-s kosáresejtekét. Ezek az eredmények részben alátámasztják a PV-s kosáresejtek alacsonyabb aktiválódási küszöbét, azonban funkcionális szempontból is megvizsgáltuk a rájuk érkező serkentő szinapszisokat. Páros elvezetéssel megmértük és összehasonlítottuk a két különböző kosáresejtre érkező serkentő áramok tulajdonságait és azt láttuk, hogy a PV-s kosáresejtekre szignifikánsan nagyobb mértékű és gyorsabb dinamikájú serkentés érkezik. Ezután kísérletet tettünk arra, hogy feltérképezzük milyen valószínűséggel idegzik be a lokális PN-k a különböző kosáresejteket. Ehhez WC patch clamp módszerrel elvezettünk egy kosáresejtet, miközben egyenként egy fénypont segítségével megvilágítottuk és aktiváltuk a környező Chr2-t tartalmazó PN-okat és teszteltük, hogy van-e serkentő szinaptikus kapcsolat közöttük. Meglepődve tapasztaltuk, hogy a PV-s kosáresejteket nagy valószínűséggel ugyan, de távolság függő módon idegzik be a helyi PN-k (<200-250 μm), szemben a CCK-s kosáresejtekkel, melyeknél nagyon alacsony számú szinaptikus kapcsolatot találtunk, ami függetlennek bizonyult a vizsgált sejtek távolságától. Annak érdekében,

hogy az elvezetett sejt párokat *post hoc* azonosítani tudjuk és további morfológiai vizsgálatoknak vethessük alá, az elvezetés során különböző színű festékekkel töltöttük meg a szinaptikusan kapcsolt sejteket. Ez a módszer nagyban megkönnyítette a sejtek teljes 3D morfológiai rekonstrukcióját, valamint segített azonosítani a preszinaptikus PN-től érkező terminálisokat. Azt találtuk, hogy a PV-s kosársejtek nagyjából 2-szer annyi szinapszist kapnak az egyes PN-októl, mint a CCK-s kosársejtek.

Ezek után elektrofiziológiai, valamint anatómiai módszerek segítségével még részletesebben megvizsgáltuk az egyes serkentő szinapszisok tulajdonságait. Elsőként kosársejteket vezettünk el 0.5 μM TTX jelenlétében, hogy az így izolált kvantális eseményeket regisztráljuk. Ennek eredményeként megállapítottuk, hogy a CCK-s kosársejtekre viszonylag kis amplitúdójú és méretükben meglepően kis változatosságot mutató serkentő események érkeznek. Ezzel szemben a PV-s kosársejteken sokkal nagyobb méretű serkentő eseményeket regisztráltunk, melyek ráadásul nagy változatosságot mutattak, ami arra utal, hogy az egyes szinapszisok között nagy minőségbeli különbségek adódhatnak. Továbbá, a PV-s kosársejteken a serkentő kvantális események lényegesen nagyobb gyakorisággal

fordultak elő, mint a CCK-s kosáresejteken. A korábbi eredményekkel összevetve ezeket az adatokat azt a konklúziót vontuk le, hogy a CCK-s kosáresejteket a lokális PN-k csupán egy-két szinapszison keresztül serkentik, amely szinapszisok alapvető tulajdonságai ráadásul nagyon hasonlóak. Ahhoz, hogy a kvantális események méretében tapasztalt változatosságnak az okát kiderítsük, szuper rezolúciós (3D STORM) mikroszkópiás vizsgálattal megkíséreltük megbecsülni az egyes szinapszisokban található AMPA receptorok mennyiségét. Ennek során immunfestéssel megjelöltük az AMPA receptorokat és egy szinaptikus marker fehérje (bassoon) segítségével beazonosítottuk a szinaptikus kapcsolatokat a kosáresejtek dendritjén. A vizsgálat során összegyűjtöttük az AMPA receptorokat jelölő pontokat (localization point, LP) és ezek segítségével megbecsültük az AMPA receptorok számát, valamint a LP által alkotott klaszterek 2D méretét. Az eredmények alátámasztották a korábbi megfigyeléseinket, hogy a PV-s kosáresejtek dendritjén nemcsak a szinapszisok száma, de a szinapszisokban található AMPA receptorok száma is több és nagyobb variabilitást mutat, mint a CCK-s kosáresejteken. Ezek az adatok együttesen azt sugallják, hogy

a lokális PN-k preferenciálisan a PV-s kosáresejteket idegzik be és serkentik a CCK-s kosáresejtekkel szemben.

III. A PN-ok és PTI-k közötti kapcsolatrendszer szerveződési elvének a feltérképezése a BA-ban.

Ahhoz, hogy megértsük a PN-k és a különböző PTI-k közötti kapcsolatrendszer hálózatban betöltött szerepét, szükség van az egyes PTI típusok közötti viszonyok tisztázására is. Ezért az utolsó kísérlet sorozatban megvizsgáltuk a PTI-k közötti kapcsolatrendszert. Immuncitokémiai eljárással (1-es típusú kannabinoid receptor, CB1 festés) láthatóvá tettük a CCK-s kosáresejtek terminálisait, továbbá egy gátló szinapszis marker (gephyrin) segítségével megállapítottuk, hogy a CCK-s kosáresejtek számos szinapszist adnak más CCK-s kosáresejtekre, valamint az axo-axonikus sejtekre, viszont egyáltalán nem szinaptizálnak PV-s kosáresejtekkel. Hasonló eredményt kaptunk, amikor a PV-s kosáresejtek terminálisait vizsgáltuk, ugyanis ők szintén beidegeznek más PV-s kosáresejteket és az axo-axonikus sejteket, de elkerülik a CCK-s kosáresejteket. A párelvezetéssel kapott eredmények teljes mértékben megerősítik az anatómiai módszerekkel kapott eredményeket, ugyanis a két kosáresejt típus között nem

találtunk mérhető szinaptikus kapcsolatot, viszont az anatómiai eredményeknek megfelelően a kosársejtek csak a saját típusukba tartozó kosársejtekben és az axo-axonikus sejtekben mutattak szinaptikus választ. Összegezve az eredményeket elmondhatjuk, hogy a két kosársejt típus két egymással párhuzamosan működő periszomatikus gátlókört valósít meg azzal, hogy elkerülik egymás beidegzését.

KÖVETKEZTETÉSEK

Összefoglalva doktori munkám során kapott eredményeket a következőket állapítottuk meg:

- A különböző típusú PTI-k membrán tulajdonságai eltérőek.
- A PN-ra adott gátlás tulajdonságaiban szintén találtunk eltéréseket a PTI típusok között, de az általuk generált posztszinaptikus válaszok mérete hasonló.
- A rövidtávú dinamika és az aszinkron vezikula ürítés mértéke típus specifikus jellegzetességeket mutattak.
- A PTI típusok közel ugyanolyan hatékonyan képesek szabályozni a PN-k aktivitását.

- A PN-k alacsonyabb aktivitási szintje szükséges a PV-s kosársejtek aktiválásához, szemben CCK-s kosársejtekkel.
- A VGlut1 tartalmú terminálisok száma és a serkentő kvantális események gyakorisága lényegesen nagyobb a PV-s kosársejtekben, szemben a CCK-s kosársejtekkel.
- A serkentő áramok nagyobbak és gyorsabbak a PV-s kosár- és axo-axonikus sejtekben, mint a CCK-s kosársejtekben.
- A PV-s kosársejteket előszeretettel a szomszédos PN-k idegzik be, ellenben a CCK-s kosársejtek gyenge és távolságfüggetlen serkentő beidegzést kapnak.
- A CCK-s kosársejtekben meglepően kis variabilitást mutatnak a kvantális serkentő események és a serkentő szinapszisok AMPA receptor mennyisége, szemben a PV-s kosársejteket jellemző változatossággal.
- A két kosársejttípus nagy valószínűséggel idegzi be az azonos típusú kosársejteket és az axo-axonikus sejteket, viszont elkerülik egymást.

- Az eredményeink azt sugallják, hogy a két különböző kosársejt típus egymással párhuzamos periszomatikus gátlóköroket képez a BA-ban.

Összefoglalva, mivel ugyanezek a PTI típusok megtalálhatók a kérgi eredetű struktúrákban, ezért az elv, amelyek mentén a PN-k és a PTI-k funkcionális hálózattá szerveződnek a BA-ban, talán általánosan érvényes a kérgi hálózatokban, és végeredményben segíthet könnyebben megérteni a PTI-k szerepét az agyban.

PUBLIKÁCIÓS LISTA

A disszertáció alapjául szolgáló közlemények:

Andrási, T., Veres, J.M., Rovira-Esteban, L., Kozma, R., Vikór, A., Gregori, E., and Hájos, N. (2017). Differential Excitatory Control of Two Parallel Basket Cell Networks in Amygdala Microcircuits. *PLoS Biol* *15*, e2001421.

Barsy, B., Szabo, G.G., **Andrasi, T.**, Vikor, A., and Hajos, N. (2017). Different output properties of perisomatic region-targeting interneurons in the basal amygdala. *Eur J Neurosci* *45*, 548-558.

Veres, J.M., Nagy, G.A., Vereczki, V.K., **Andrasi, T.**, and Hajos, N. (2014). Strategically positioned inhibitory synapses of axo-axonic cells potently control principal neuron spiking in the basolateral amygdala. *J Neurosci* *34*, 16194-16206.

Egyéb közlemények:

Kohidi, T., Jady, A.G., Marko, K., Papp, N., **Andrasi, T.**, Kornyei, Z., and Madarasz, E. (2017). Differentiation-Dependent Motility-Responses of Developing Neural Progenitors to Optogenetic Stimulation. *Front Cell Neurosci* *11*, 401.

Brunner, J., Neubrandt, M., Van-Weert, S., **Andrasi, T.**, Kleine Borgmann, F.B., Jessberger, S., and Szabadics, J. (2014). Adult-born granule cells mature through two functionally distinct states. *Elife* *3*, e03104.

Szabo, G.G., Lenkey, N., Holderith, N., **Andrasi, T.**, Nusser, Z., and Hajos, N. (2014). Presynaptic calcium channel inhibition underlies CB(1) cannabinoid receptor-mediated suppression of GABA release. *J Neurosci* *34*, 7958-7963.

Brunner, J., Ster, J., Van-Weert, S., **Andrasi, T.**, Neubrandt, M., Corti, C., Corsi, M., Ferraguti, F., Gerber, U., and Szabadics, J. (2013). Selective silencing of individual dendritic branches by an mGlu2-activated potassium conductance in dentate gyrus granule cells. *J Neurosci* *33*, 7285-7298.