

A P2X7 receptor részvétele a központi idegrendszer fiziológiás és kóros működésében: a migrén patofiziológiájában és a hippokampusz szerotonerg transzmissziójának szabályozásában

Doktori tézisek

Göloncsér Flóra

Semmelweis Egyetem

Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Sperlágħ Beáta, az MTA doktora, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Lévay György, Ph.D., egyetemi tanár

Dr. Bárdos György, az MTA doktora, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Szökő Éva, az MTA doktora, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagok: Dr. Mike Árpád, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Dr. Tábi Tamás, Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest

2018

1 Bevezetés

Az idegrendszer működésében fontos kommunikációs forma az idegsejtekből felszabaduló neurotranszmitterek és neuromodulátorok útján megvalósuló kémiai kommunikáció. A klasszikus transzmitterek (acetilkolin, noradrenalin, dopamin, szerotonin, glutamát, GABA) mellett ma már az általánosan elfogadott jelátvivő anyagok közé tartozik az adenzin 5-trifoszfát (ATP) és az adenzin, amelyek a jelátvitel nem hagyományos típusát valósítják meg az idegrendszerben és egyéb szervekben. Az ATP biológiai hatásait a P2 receptorok (P2X és P2Y) családján keresztül fejtik ki, amelyek közül a P2X7 receptorra fókuszált doktori munkám.

A disszertációmban összefoglalt kutatás során a purinerg jelátvitel központi idegrendszerben való vizsgálatát tűztem ki célul, a bemutatott kísérletes munka fő célja, hogy megértsük a neuronális és gliális P2X7 receptorok szerepét különböző patofiziológiás állapotokban. A dolgozat alapját két első szerzős cikkem képezi, amelyek – bár mindkettőben a P2X7 receptorok szerepét vizsgáltuk – két különböző témával kapcsolatban elért eredményeimet mutatják be:

(1) A purinerg jelátvitel részvétele a fájdalominger feldolgozásban a központi idegrendszerben széles körben kifejeződő P1 és P2 receptorok aktivitásával valósul meg: neuronokon, és glia sejteken, valamint az érrendszerben lévő simaizmokon és endothelen keresztül. Számos P2 receptor antagonistával végeztek sikeres kísérleteket különböző fájdalom modellekben, így nem meglepő, hogy szerepük migrén patomechanizmusával kapcsolatban is felmerül, és lehetséges célpontot jelenthetnek új migrén terápiákban. Feltételeztük és igazolni szerettük volna, hogy a P2X7 receptor szerepet játszik a fejfájások kialakulásában és a migrénben. Így munkám első részében a P2X7 receptor szerepét vizsgáltuk meg a migrén patomechanizmusában, P2X7 receptor génkiütött egerek és P2X7 receptor antagonistá kezelések, valamint nitroglicerinnel (NTG) indukált migrén egér modell segítségével.

(2) Munkám következő részében ugyancsak a P2X7 receptor szerepét vizsgáltam, de egy másik agyi folyamatban, mégpedig a szerotonin felszabadulás modulációjában. Számos közlemény számolt be a purin receptorok moduláló szerepéről a neurotranszmisszióban: a központi idegrendszerben az ATP legalábbis mikromoláris koncentrációban felszabadul idegi aktivitás során az extracelluláris térbe, amely a hipokampális purin receptorok

aktiválásával képes a szerotonerg transzmisszió modulálására a hippokampuszban⁵. A P2X7 receptor szerepe ismert számos neurotranszmitter felszabadulásának modulációjában, ugyanakkor a szerotoninnal kapcsolatban ez a fajta moduláció még nem tisztázott. Az agytörzsi median rapheból induló szerotonerg/glutamáterg raphe-hippokampális pálya hatékonyan képes befolyásolni a hippokampuszban végbemenő kódolási folyamatokat, továbbá, a median rapheban lévő glutamáterg neuronoknak moduláló szerepük lehet a felszálló szerotonerg neuronok működésében, azonban ezzel kapcsolatban kevés funkcionális adat áll rendelkezésünkre. Ezért, hogy jobban megértsük a szerotonerg transzmisszió jellegzetességeit a median rapheban és hippokampuszban, illetve azt befolyásoló glutamát és ATP szerepét, valamint azon keresztül a purin receptorok aktiválódását, vizsgálatunkban specifikus optogenetikai ingerlést használtunk. Vad és P2X7 receptor génkiütött egerekkel és P2X7 receptor antagonistákkal kezelésekkel vizsgáltuk meg a szerotonerg transzmisszió változásait a raphe magvak hippokampális afferenseit *in vivo* és *in vitro* optogenetikai stimulációval ingerelve.

2 Célkitűzések

Vizsgálataink a következő főbb területeket érintették:

I. Dolgozatom első részében a purinerg jelátvitel és a migrén kapcsolatának továbbra is kérdéses pontjaival foglalkozom. Irodalmi adatok alapján valószínű, hogy az endogén purinok potenciális triggerei vagy mediátorai a migrénnek, továbbá már vizsgálták a P2 receptor altípusok bonyolult szabályozó folyamatokban való részvételét migrénben. Ezen irodalmi eredmények alapján feltételezzük, hogy a P2 receptorok kulcsszerepet játszanak a migrénes fájdalom kialakulásában.

Ennek a disszertációnak az egyik célja, hogy megvizsgáljuk a P2X7 genetikai delécija és farmakológiai gátlása milyen hatással van az NTG-indukált termális hiperszenzitizációra és c-Fos indukcióra migrénnel kapcsolatos KIR területeken egerekben.

1. A termális hiperszenzitivitás kialakulásának vizsgálata NTG kezelt egerekben.

- Vizsgálatainkban arra kerestük a választ, hogy a NTG indukálta migrén egér modellben találunk-e különbséget a P2X7 WT és P2X7 KO egerek fájdalomküszöbében?

2. A P2X7 receptor aktivációjának és inhibíciójának vizsgálata kísérleti modellben.

- Ezekben a vizsgálatokban az volt a célunk, hogy megvizsgáljuk a P2X7 receptor mediált hatást akut és szubakut antagonistá BBG kezeléssel P2X7 WT és P2X7 KO egerekben.

3. A c-Fos expresszió változásának vizsgálata a migrénhez köthető egér felsőnyaki gerincvelőben és TNC-ben.

- Következő vizsgálatainkban a két genotípus c-Fos expresszió változásait hasonlítottuk össze, továbbá a P2X7 receptor inhibíció hatásait az IHC technikával.

II. Dolgozatom második részében a P2 receptorok tisztázatlan szerepével foglalkozom a szerotonerg transzmisszió szabályozásában. Irodalmi adatok alapján valószínű, hogy az endogén ATP modulálja a szerotonin termelődését és a P2 receptorok aktivációja gátolja a szerotonin felszabadulását. Ugyanakkor a szerotonin modulálja az ATP szinteket is az agyban, és ez a moduláló hatás fordítva is igaz. Ezen irodalmi eredmények alapján, célszerűnek tűnt megvizsgálni, hogy a P2X7 receptor milyen szerepet játszik a szerotonerg transzmisszióban.

Tehát a disszertáció másik célja, a median raphe régió és a hippokampusz szerotonerg rendszer természetének és a purinerg rendszerrel való kapcsolatának vizsgálata. Ehhez optogenetikai technikát alkalmaztunk, az afferenseket – amelyek az MRR-ből származnak és egyik célterületük a hippokampusz – szelektíven aktiváltuk és vizsgáltuk az MR régióból származó neuron szubpopuláció 5-HT felszabadulásának karakterisztikáját *in vivo* és *in vitro*. Valamint, hogy megvizsgáljuk az elektromos és optikai stimuláció által kiváltott 5-HT felszabadulásra milyen hatással van a P2X7 genetikai deléciója és farmakológiai blokkolása.

1. A median raphe régióból optikai stimulációra felszabaduló szerotonin karakterisztikájának vizsgálata.

- Miután vad típusú egerek MR régiójából sikerült szerotonin felszabadulást előidézni elektromos és kémiai stimulusra, megvizsgáltuk és összehasonlítottuk, hogyan hat az optikai stimuláció a szerotonin felszabadulásra?

2. A MRR optikai stimulációjának vizsgálata a szerotonerg rendszerhez köthető viselkedésre egerekben.

- Vizsgálatainkban arra kerestük a választ, hogyan hat az MRR optikai stimulációja a ChR2-t expresszálló egerek viselkedésére?

3. *In vivo* optikai stimuláció hatására felszabaduló monoaminok szintjének vizsgálata az MRR-ben.

- Ezekben a vizsgálatokban az volt a célunk, hogy megnézzük, hogyan változnak a szerotonin mellett a glutamát és GABA szintek a MR régióban különböző paraméterű optikai ingerlés hatására?

4. A hippocampális optikai stimuláció indukálta szerotonin felszabadulás feltérképezése.

- Miután vad típusú egerek HP-ból sikerült szerotonin felszabadulást előidézni elektromos és kémiai stimulusra, megvizsgáltuk és összehasonlítottuk, hogyan hat az optikai stimuláció a szerotonin felszabadulásra?
- Továbbá megvizsgáltuk, hogyan befolyásolják az 5-HT₁ agonisták a felszabaduló szerotonin mennyiségét?

5. A P2X7 receptor szerepének vizsgálata az elektromos és optikai stimuláció indukálta hippocampális szerotonin felszabadulásban.

- Vizsgálatainkban arra a kérdésre kerestük a választ, hogy az ionotróp P2X7 receptorok részt vesznek-e a szerotonin felszabadulás szabályozásában az agyi szerotonerg pályák hippocampális végződéseiből? Ennek kiderítésére a stimulációk előtt farmakológiai gátlással blokkoltuk a P2X7 receptorok működését.

3 Módszerek

3.1 Kísérleti állatok

Mindkét témában, kísérleteinkhez 2-4 hónapos hím C57Bl/6J alapú P2X7 receptor nullmutáns (knockout; KO) transzgén egereket és vad típusú (wild type; WT) alomtársaikat használtuk fel. Az eredeti P2X7 receptor génkiütött tenyészpárok Christopher Gabel (Pfizer Inc., Groton, CT, USA) felajánlásával kerültek az MTA KOKI Orvosi Géntechnológiai Részlegébe, ahol az egérvonalat SPF körülmények között tenyésztik.

3.2 Nitroglicerín (NTG) indukált migrén modell

3.2.1 Emelkedő hőmérsékletű hot plate teszt

Az egerek nociceptív stimulációra való reagálását egy növekvő hőmérsékletű hot plate rendszerrel (IITC Life Science, Woodland Hills, CA, USA) határoztuk meg. Az állatokat egy elektromosan fűtött fém plate-re helyeztük, melyet állandó 30°C-on tartottunk (kiindulási hőmérséklet). A plate hőmérsékletét állandó 6°C/perc sebességgel növelni kezdtük, amíg az egerek nocifenzív viselkedést mutattak (a hátsó mancs rázása, nyalogatása, vagy a forró plate-ről való elugrás). A hőmérsékletet, amelynél az egerek a nocifenzív viselkedést mutatták, mint végtagelrántási küszöbérték fejeztük ki (paw withdrawal threshold; PWT), és °C-ban adtuk meg. Körülbelül 1 órával később a mérést megismételtük, és a két érték átlagából a kiindulási termális nociceptív küszöbértéket vettük. A második mérés után az állatokat kezeltük a lent leírt drogokkal és módon, majd egy és két órával később mértük a poszt-drog nociceptív küszöbértéket.

3.2.2 Drogok és kezelések

A kiindulási termális nociceptív küszöbértékek mérése után az egerek intraperitoneálisan (i.p.) 15 mg/kg NTG vagy oldószer (49 mg glükóz-monohidrát/ml) injekciót kaptak. Szumatriptánt alkalmaztunk kísérleteink validálására: az egerek 5 perccel az NTG i.p. beadást követően i.p. 600 µg/kg szumatriptán vagy sóoldat injekciót kaptak. A P2X7 receptor antagonistát, Brilliant Blue G-t vagy annak oldószerét (sóoldat) két különböző protokoll alapján alkalmaztuk:

- akut kezelés: a kiindulási termális nociceptív küszöbérték mérése után és az NTG kezelés előtt 30 perccel 50 mg/kg i.p. BBG vagy sóoldat injekciót adtunk, vagy

- szubakut kezelés: az egereket 5 egymást követő nap kezeltük 50 mg/kg i.p. BBG vagy sóoldat injekcióval, az utolsó injekciót 30 perccel az NTG kezelést megelőzően adtuk.

A dózisok kiválasztása korábbi vizsgálatokon alapult. Minden oldat frissen lett elkészítve a felhasználás napján.

3.2.3 TNC immunhisztokémia

Két órával az i.p. NTG (15mg/kg) vagy oldószer injekciót követően az egereket 5%-os paraformaldehid (0.5% bórax) oldattal transzkardiálisan perfundáltuk. Az egész agyat és a nyaki szakaszi gerincvelőt eltávolítottuk. Ezután a vizsgálandó területekről 30 µm-es koronális sorozatmetszeteket készítettünk szánkás mikrotommal. Minden negyedik metszeten c-Fos immunhisztokémiát végeztünk. A metszetekről mikrofotókat készítettünk és a fos-reaktív magokat számoltuk a nyaki gerincvelő mindkét oldalán és a TNC-ben. Állatonként a c-Fos pozitív magok átlag értékét határoztunk meg területenként.

3.3 Optogenetika

3.3.1 Vírus beadása és optogenetikai paraméterek

40 nl ChR2 fehérjét (AAV2.5.hSyn.hChR2(H134R)eYFP.WPRE.hGH) kódoló adenoasszociált vírus (AAV) vektort injektáltunk az egerek MRR-jába (AP: 4.10 mm; L: 0.0 mm; DV: 4.60 mm) MicroSyringe szivattyúvezérlőhöz csatlakoztatott 20-30 µm csúcsátmérőjű üveg kapillárisból. A vírus beadása után a kapilláris még 5 percig a helyén maradt, hogy segítse a vírus diffúzióját és minimálisra csökkentse a visszafolyását. Közvetlenül az injekció beadása után a furatot lezártuk és a fejbőrt varratoltuk. A kísérletekben az optikai stimulushoz 473 nm-es DPSS lézert használtunk.

3.3.2 Vírus injektált egerek lokomotoros aktivitásának és freezing viselkedésének optogenetikai manipulálása

Az AAV konstrukció beadása után két héttel az optikai szál beültetését az egerekbe ketamin-xilazin keverékkel kiváltott mély anesztéziában végeztük. A megfelelő pozicionálás érdekében az állat fejét sztereotaxiás készülékkel rögzítettük. Az optikai szálát a MRR fölé ültettük be, a pontos koordinátái a következők: 10°-os dorzális szögben, AP:-4.80; L: 0.0 mm; DV: 4.062. Az implantátumokat akrilgyantával rögzítettük. A műtétet követően 4-7 nap múlva kezdődtek a viselkedés kísérletek. A lézersugarakat alacsony zajszintű diódalézerrel generáltuk majd kollimáltuk és

bevezettük az optrodához száloptikai patch kábelek segítségével. Az egereket folyamatosan stimuláltuk 20 Hz-en 5 percen keresztül egy $30 \times 30 \times 30$ cm-es plexi stimulációs arénában. Két kontroll csoport volt, az egyikben olyan egerek, melyek injektálva és stimulálva is voltak, de ChR2 expressziót nem mutattak az MR-ben, a másikon pedig intakt egerek. A viselkedést videokamera segítségével rögzítettük, majd meghatároztuk a lokomotoros aktivitást.

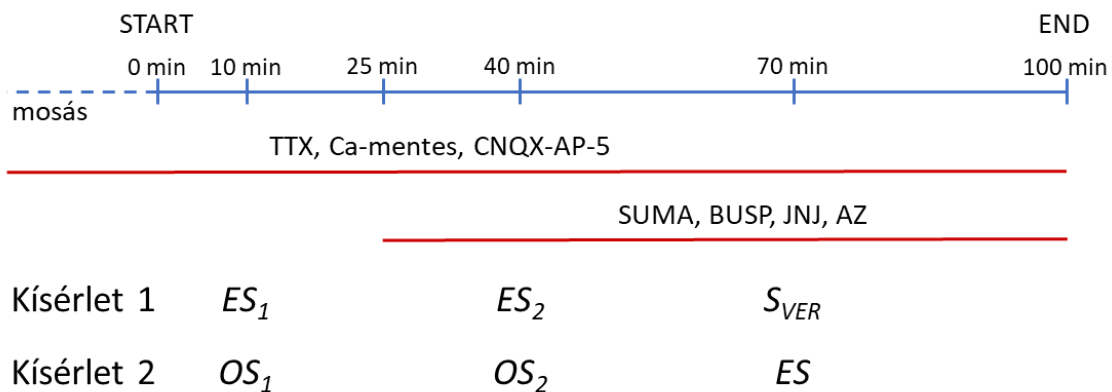
A freezing (lefagyás) viselkedési formát egyszerűen mértük, hiszen csak a mozgás teljes hiányát kellett regisztrálni, a légzés kivételével. 20 Hz-es stimulust alkalmaztunk, a freezing állapotot a stimuláláskor (0. nap), az 1. nap és a 7. nap során elemeztük, amikor az egereket visszahelyeztük a stimulációs ketrecbe.

3.3.3 Túlélő agyszelet preparálása

Miután dekapitáltuk az állatot, eltávolítottuk az agyat, majd Microm HM 650 V vibratom segítségével $300 \mu\text{m}$ -es koronális agyszeleteket vágunk, melyek preparálása mindvégig jéghideg karbogenizált Krebs' oldatban történt. A szeleteket trícíált izotópot tartalmazó Krebs' oldatban inkubáltuk 1 órán keresztül, majd áthelyeztük a perfúziós kamrába, ahol 45 percen keresztül előperfúziót alkalmaztunk a felesleges radioaktivitás kimosása céljából ezt követően méréseket végeztük. Az inkubációs és perfúziós oldatot is karbogen gázkeverékkel buborékolattuk 37°C -on, ezzel biztosítva az oldat megfelelő O_2 tartalmát és pH-ját.

3.3.4 *In vitro* [^3H]szerotonin és [^3H]glutamát felszabadulás mérése egér median raphe és hippokampusz szeletekből szövetperfúziós technika segítségével

Az inkubációt és perfúziós mosást követően a szeleten átfolyó oldatból 3 (Kísérlet 1) és 1 (Kísérlet 2) perces mintákat gyűjtöttünk és meghatároztuk a minták radioaktivitás tartalmát. A mintagyűjtési periódus alatt 3 alkalommal ingerlést alkalmaztunk, illetve amelyik kísérletben erre szükség volt, ott drogokat adagoltunk a perfúzióban, a kísérleti eljárásokat lásd az alábbi ábrán.



A kísérletek végeztével a szöveteket 0.5 ml 10% triklórecetsavban homogenizáltuk, majd 15 perc elteltével a szöveti minták 0.1 ml aliquotjainak radioaktivitását határoztuk meg. A vizsgálandó vegyületeket (drogokat) a második ingerlés előtt 15 perccel adtuk a perfúziós folyadékhoz, míg módosított Krebs' oldattal történő kísérleteinkben az előperfúzió kezdetétől a kísérlet végéig azt alkalmaztuk.

A minták radioaktivitását Wallac 1409 szcintillációs spektrométer segítségével határoztuk meg. A kísérlet kiértékelése során az egyes perfuzátum minták radioaktivitás-tartalmát fejeztük ki a mintavétel időpontjában kalkulált szöveti tartalom százalékában (FR%). A szöveti trícium felvételt az össz release + szövetben maradt tartalom kiszámolásával határoztuk meg és Bq/g-ban fejeztünk ki.

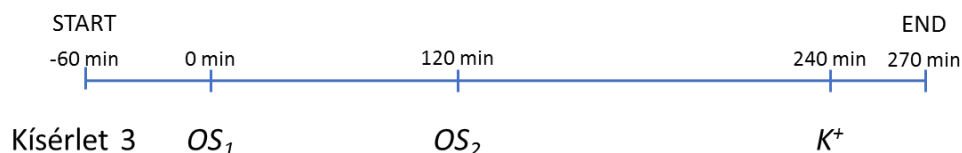
3.3.5 Mikrodialízis szonda beültetése

A mikrodialízis szonda beültetését az egerekbe 20% uretánnal kiváltott mély anesztéziában végeztük. A megfelelő pozicionálás érdekében az állat fejét sztereotaxiás készülékkel rögzítettük. A mikrodialízis szondát a median rapheba ültettük (pontos koordináták: 10°-os dorzális szögben, AP: -4.80; L: 0.0 mm; DV: 5.50). Az optikai szál szonda vezetőkanüljén keresztül volt bevezetve és a membrán tetején ért véget. A mikrodialízis kísérleteket a 2 órás kiegyenlítődési idő után kezdtük meg.

3.3.6 Mikrodialízis kísérletek

A kísérletek során az állatok fejét sztereotaxiás készülékben rögzítettük és a mikrodialízis szondán keresztül ACSF-et perfundáltunk. A perfúzió kezdetétől számított 2 óra elteltével kezdtük a 30 perces minták gyűjtését. Az egyes frakciókat mintatartó csövekbe gyűjtöttük majd HPLC-vel elemeztük. Minden állat esetén 12 db mintafrakciót gyűjtöttünk és az első mintából állapítottuk meg az alapkonzentrációkat. Az optikai

stimulációt (OS) a negyedik (20 Hz) és nyolcadik (50 Hz théta burst) minta gyűjtésének elejétől számítva 5 perccel később kezdtük és 5 percig tartott (Kísérlet 3 eljárás az alábbi ábrán). Az utolsó minta esetében kémiai stimulációt alkalmaztunk, 100 mM KCl-t 5 percig (K^+).



3.3.7 Monoaminok meghatározása magas nyomású folyadékkromatográfiával (HPLC)

A HPLC analízis során a MRR-ből származó dializátumokból meghatároztuk a 5-HT, glutamát (Glu) és a GABA neurotranszmittereket, és az endotoxikusan felszabaduló ATP-t hippokampusz szeletek szuperfuzátumából. Az extrakciós oldat 0,1 M perklórsav (PKS) volt, amely 10 μ M teofillint tartalmazott (belső standardként).

Az 5-HT, Glu és GABA *in vitro* extrahálási hatékonyságát $21,1 \pm 4,8\%$, $17,1 \pm 2,8\%$ és $21,9 \pm 3,4\%$ becsültük. Az 5-HT, Glu, GABA koncentrációját abszolút mennyiségben (nmol/ml vagy pmol/ml) vagy az alapkonzentráció százalékában (átlag \pm SEM) fejeztük ki, a vírus injekciót követő optikai és kémiai stimuláció után a bazális szintekből származó változások megfigyelésének érdekében.

3.3.8 Szövetteni ellenőrzés

A viselkedési és mikrodialízis kísérletek után mély altatásban lévő egereket először 0.1 M foszfát pufferes fiziológiás sóoldattal 1 percig, majd 4%-os foszfát pufferes fiziológiás sóoldattal oldott paraformaldehid oldattal 10 percig (PFA, pH: 7.4) transzkardiálisan perfundáltuk. Az agyakat kivettük, majd a vizsgálandó területekről 40 μ m-es koronális sorozatmetszeteket készítettünk fagyasztó mikrotommal. Ezután Minden harmadik metszeten 5-HT immunhisztokémiát végeztünk, majd a metszetekről mikrofotókat készítettünk. A felszabadulás kísérletek után a szeleteket 4%-os foszfát pufferes fiziológiás sóoldattal oldott paraformaldehid oldattal fixáltuk és további feldolgozás nélkül tárgylemezre húztuk a vírus konstrukció fluoreszcens jelének kimutatására.

A metszeteket Nikon C2 konfokális mikroszkóppal értékeltük ki. Az optikai szál, a mikrodialízis szonda és a vírusfertőzés helyét sztereotaxiás atlasz segítségével határoztuk meg.

4 Eredmények

4.1 A P2X7 receptorok genetikai deléciójának és farmakológiai antagonizmusának hatása migrén állat modellben

Az eddig kevésbé ismert purinerg szabályozást vizsgáltuk a migrén patomechanizmusában. Megállapítottuk, hogy a P2X7 antagonizmus – melyet BBG-vel váltottunk ki – vezetett az NTG által kiváltott termikus hiperszenzitivitás enyhítéséhez egerekben. Továbbá, mivel a BBG kezelés hatástalan volt P2X7 KO egerekben, ésszerű feltételezni, hogy ezt a hatást a P2X7 receptor közvetíti. A TNC-ben az NTG által kiváltott c-Fos expresszió is csökkent szubakut BBG kezelést követően, amely megerősíti a TNC szerepét a BBG hatás közvetítésében az NTG által kiváltott hiperszenzitivitásban. Mindezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a P2X7 gátlásában rejlik terápiás potenciál a migrénben.

Bates és munkatársai által korábban leírt NTG-indukált migrén modellt alkalmaztunk és reprodukáltuk eredményeit, az i.p. NTG kezelés időfüggő módon váltott ki termális hiperszenzitivitást. Valamint, az NTG által kiváltott hiperszenzitivitást az antimigrén hatóanyag szumatriptán enyhíteni tudta, és az NTG kezelést c-Fos expresszió követi a TNC-ben és felső gerincvelőben.

Érdekes módon a P2X7 KO egerekben az NTG által kiváltott hiperszenzitivitás nem mutatott különbséget a vad típustól. Ennek a negatív eredménynek a legvalószínűbb magyarázata a nem-P2X7 P2X receptorok potenciális fejlődési felülszabályozottsága a P2X7 KO egerekben, mint pl. a P2X3 és P2X4. Ezt támasztja alá korábbi megfigyelésünk, a P2X4 mRNS upregulációja P2X7 KO egerekben.

A profilaktikusan alkalmazott, mind akut, mind szubakut BBG kezelés hatásos volt az NTG által kiváltott termikus hiperszenzitivitás csillapításában a P2X7 vad típusú egerekben. A BBG-ről ismert, hogy átjut a vér-agy gáton és az általunk alkalmazott dózisban specifikus a P2X7 receptorra. Bár *in vitro* kísérletek során kiderült, hogy a BBG tudja gátolni a Na⁺ csatornákat mikromoláros koncentrációkban, hasonló dózisu (45,5 mg/kg) *in vivo* vizsgálatokban a BBG koncentrációja az agyban nem nagyobb, mint 200 nM, ami a P2X7 receptorra szelektív. Valamint az az eredményünk, hogy a P2X7 KO

egerekben a BBG hatása teljesen megszűnt is cáfolja a lehetőségét másik célpont létezésének kísérleteinkben.

Az ATP egy jól ismert vészjelző molekula, amely a sejtek sérülésére, gyulladásra, mechanikai behatásra és anyagcsere zavarára válaszul szabadul fel és önmagában is egy fájdalmat keltő vegyület. A P2X7 receptor is egy olyan Ca^{2+} permeábilis ligand-függő kationcsatorna, mely csatornák különböző módokon járulnak hozzá a fájdalom transzmisszióhoz. A hátsó gyöki ganglionokban a P2X7 a szatellit glia sejteken expresszálódik és a proinflammatorikus citokin TNF- α felszabadulása révén fokozza a P2X3 receptor közvetítette jelátvitelt. Hasonló mechanizmus szintén szerepet játszhat a migrénben, mivel a terminális ganglionban a szatellit glia sejtek szintén expresszálják a P2X7 receptorokat és P2X3 receptorok is részt vesznek a cranio-faciális fájdalomban NGF, szubsztancia P és CGRP kölcsönhatásával. A P2X3 receptorok fokozott aktivitását mutatták ki a migrén genetikai állatmodelljében is. Opcionálisan, a P2X7 antagonisták sokkal központibb szerepet játszanak a felső nyaki gerincvelő szintjén vagy a trigeminus magban. A P2X7 modulálja az afferens nociceptív információfeldolgozást a gerincvelő hátsó szarvában és aktivációja részt vesz a centrális szenzitizációban, és annak alárendelt hátsótalpi hiperalgiában. Mivel a trigeminális mag szürkeállományában közepesen nagy sűrűségű P2X7 receptor kötőhelyek találhatóak, és az NTG által indukált c-Fos expresszió a BBG kezelésre reagálva kimutatott csökkenése jelzi, hogy a TNC potenciális célterülete a P2X7 receptor antagonistáknak. A P2X7 aktivációja ezen a területen excitatoros aminosavakat szabadít fel, amelyeknek blokkolása a BBG hatása alatt állhat.

Továbbá a P2X7 az agy más területein is expresszálódik, ezért nem zárható ki a szupraspinalis mechanizmus köztiagi, agytörzsi vagy kortikális régiókon keresztül. Végül a P2X7 expresszálódik a keringő és lokálisan képződő immunsejteken is és a P2X7 aktiváció legjellemzőbb hatása a proinflammatorikus citokinek poszttranszlációs feldolgozásában játszott szerepe, például IL-1 β és TNF- α esetén, amelyek szintén ismert fájdalomkeltő vegyületek.

Végezetül az itt bemutatott adatok azt jelzik, hogy a P2X7 gátlása potenciális célpont lehet a migrén megelőzésében. Továbbá, mivel a BBG egy FDA által jóváhagyott, nem toxikus élelmiszer színezék zárt szerkezeti analógja, érdemes megfontolni terápiás

alkalmazását. Valamint adataink a humán NTG által kiváltott migrén modellben elért eredményekre támaszkodnak.

4.2 Hippokampális 5-HT felszabadulás szabályozása P2X7 receptorokkal válaszul az egerek median raphe termináljainak optogenetikai stimulálására

Szelektív, optogenetikai stimulációt alkalmaztunk az MRR neuronokból származó neurotranszmitter felszabadulás jellemzésére. Míg az elektromos stimuláció vagy a kémiai depolarizáció egyidejűleg stimulálja a sejttestet, axonokat és idegi terminálisokat a stimulációs mezőben, addig az optogenetikai technika lehetővé teszi a kiválasztott neuronális útvonal külön aktiválását.

A 20 Hz-es optikai stimuláció az állatok lokomotoros aktivitásának növekedését eredményezte és a stimuláció után 7 nappal freezing viselkedést váltott ki, jelezve, hogy ez a fajta stimuláció viselkedési szempontból releváns. Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a felszálló szerotonerg pályák alapvető szerepet játszanak olyan motoros mozgásokban, mint a járás, a fej mozgatása vagy a testhelyzet megváltoztatása általános vagy fokozott mozgásban.

Hasonló, bár nem teljesen azonos fotostimulációs protokollt használtunk az 5-HT felszabadulás kiváltására MRR és hippocampális perfúziós mintákban rAAV injektált egerekben. Az MRR-ben az optikai stimuláció reprodukálható 5-HT felszabadulást váltott ki, melynek mennyisége kisebb, de összehasonlítható volt az elektromos stimuláció és kémiai depolarizáció által kiváltott mennyiséggel. Ez a különbség teljesen reális, hiszen az elektromos stimuláció aktiválja az egész bejövő idegköteget, míg az optikai stimuláció specifikusabb, csak azokat a neuronokat és azok idegvégződéseit stimulálja melyek a ChR2 fehérjét expresszálják. Ez a megfigyelés azt jelzi, hogy a szerotonerg idegvégzések jelenléte az MRR-ben, amelyek kívül esnek a vírus injekció által elért területtől konzisztensen, hogy kölcsönös az innerváció az MRR és más agytörzsi szerotonerg magokkal, mint pl. a DR-rel.

Az optikai és elektromos stimuláció által kiváltott 5-HT felszabadulás az MRR-ben $[Ca^{2+}]_o$ függő volt, amely megmutatja, hogy vezikuláris exocitózis közvetíti. Mind az elektromosan, mind az optikailag kiváltott 5-HT felszabadulás érzékeny volt az ionotróp Glu receptorok antagonistáira, ami azt jelenti, hogy az 5-HT felszabadulást a ChR2 fehérjét expresszáló MRR neuronokból a Glu befolyásolja. Ez összeegyeztethető olyan

anatómiai vizsgálatokkal, amelyek az MRR neuronok autapsz és rekurrens axon kollaterálisait azonosítják. Továbbá, az 5-HT tartalmú neuronok immunpozitívak voltak Glu-ra és foszfát aktiválta glutaminázra, amely a Glu bioszintézisében kulcsszerepet játszik, valamint a raphe mag 5-HT neuronjai expresszálnak VGluT3 transzportert. Mindezeket a feltételezéseket alátámasztják az általunk tett megfigyelések is, hogy egyidejűleg Glu is felszabadul az optikai stimulációra. Mivel az optikailag kiváltott 5-HT felszabadulás érzékeny volt a TTX-re, valószínűleg a felszabadult 5-HT és Glu különböző idegvégződések populációjából származik és az 5-HT szintén származhat dendritekből és sejtestestekből. Ismeretes, hogy az 5-HT-t a raphe sejtekben lévő neuronok somata és dendritjei is kiválasztják az NMDA receptorok aktivációjára válaszul $[Ca^{2+}]_o$ függő módon, valamint az 5-HT nagy része nem szinaptikus módon is felszabadulhat. Vizsgálatunk újdonsága az optogenetikai technika által aktivált MRR azonosítása, amely a fenti jellemzőket reprezentáló neuronális szubpopuláció.

Azt is megvizsgáltuk, hogy az 5-HT hasonló úton szabadul-e fel az MRR egyik célterületéből a hippocampusból, mint az MRR terminálisokból. Mindhárom féle stimuláció (elektromos, optikai, kémiai) 5-HT felszabadulást idézett elő, amely hasonló volt, mint az MRR-ben. Azonban abszolút mennyiségben az optikai és elektromos stimuláció által kiváltott 5-HT felszabadulás kevesebb volt a HP-ben, mint az MRR-ben. Ez összhangban van azzal a megfigyelésünkkel, hogy az EYFP jelölődési intenzitás kevésbé volt erős a HP-ben, amely megfelel a távoli célterület kevésbé sűrű beidegzésének.

Míg mind optikai mind elektromos stimulálással indukált 5-HT felszabadulás nagymértékben $[Ca^{2+}]_o$ függő ezen a területen is, a későbbi kísérleteinkben két féle eltérés is mutatkozott a transzmitter felszabadulásban a HP-ben. Először is másfajta frekvencia függést mutat, jelezve, hogy különböző transzmitter-poolok mobilizálódtak a két féle stimulációval aktivált idegi terminálisok szubpopulációiból különböző frekvenciákon. Ezenkívül míg az elektromos stimuláció által indukált 5-HT felszabadulást gátolták a TTX és a Glu receptor antagonisták, addig az optikai stimuláció által kiváltott 5-HT efflux nem volt érzékeny a fenti drogokra, ami azt jelzi, a hippocampusban a Chr2 fehérjét expresszáló idegvégződések közvetlenül aktiválódtak a fény stimulus hatására és a trícium kibocsátása az MRR-ből eredő varikozitásokból származó 5-HT kiáramlást képviseli. Mivel a Chr2 permeabilis a nátriumra, ésszerű feltételezni, hogy a csatornán

keresztül történő közvetlen ionáramlás felelős az idegvégződések membránjának lokális depolarizációjáért és az ezt követő transzmitter felszabadulás kiváltásáért. Érdekes további megfigyelés, hogy az elektromos stimuláció által indukált 5-HT felszabadulás a HP-ben érzékeny az ionotróp Glu receptorok blokkolására. Ennek egyik meggyőző magyarázata, hogy az elektromos stimuláció ellentétben a fény stimulációval szintén depolarizálja az excitátoros idegi terminálisokat és glutamátot szabadít fel, amely ezután hat az ionotróp glutamát receptorokra és közvetlenül vagy közvetve mobilizálja az 5-HT-t a DR-ből származó idegvégződésekből.

A közepagi szerotonerg neuronok szomatodentritikus tájakon és az idegvégződéseken lévő gátló autoreceptorokkal rendelkeznek. Ezek a receptorok nagy mértékben szerepet játszanak a szerotonerg transzdukciót befolyásoló különböző szerek hatásában, mint például a 5-HT újrafelvételt gátló (SSRI) antidepresszánsok és szorongás oldó szerek esetében. Miközben a szomatodendrikus autoreceptorok aktivációja csökkenti az idegsejtek tüzelési rátáját lokálisan, valamint az idegvégződések aktivációja csökkenti az 5-HT felszabadulást a célterületeken, azaz a kéregben és a hippocampusban, mindkét területen megtalálhatók 5-HT_{1B/1D} receptorok. Kísérleteinkben az 5-HT_{1A/1B/1D} agonista szumatriptán csökkentette az elektromos, de nem az optikai stimulus által kiváltott 5-HT felszabadulást, míg a szelektív 5-HT_{1A} agonista buspiron nem volt hatással sem az elektromos sem a fény indukálta 5-HT felszabadulásra. Az 5-HT_{1B/1D} receptorok nem szabályozták a fény indukálta 5-HT felszabadulást, ez azzal magyarázható, hogy azok a szerotonerg neuronok, amelyek hippocampális idegvégződéseiken 5-HT_{1B/1D} receptorokat expresszálnak az MRR-n kívül helyezkednek el, valószínűleg a DR-ben. Adataink jól illusztrálják az optogenetikai módszer alkalmasságát a neurokémiai transzmisszió szubpopuláció specifikus modulációjának vizsgálatára, amelyek nagyrészt eddig ismeretlenek voltak.

Vizsgálataink következő célja volt, hogy megvizsgáljuk a hippocampális terminálisokból felszabaduló 5-HT potenciális modulációját P2X7 receptorokkal. Megállapítottuk, hogy mind a genetikai deléciója, mind a farmakológiai blokája a P2X7 receptornak csökkentette az elektromos és optikai stimulációval kiváltott 5-HT felszabadulást. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a fenti stimulációs paradigmák által felszabadított endogén ATP elősegítette az 5-HT felszabadulását a szerotonerg varikozitásokból a P2X7 receptorok aktiválásával. E feltételezésünket is alátámasztja az a megfigyelésünk, hogy

az azonos elektromos és optikai stimulációk szignifikánsan növelték az extracelluláris ATP szinteket a hippocampusban. Mivel az optikai és elektromos stimuláció által kiváltott 5-HT felszabadulást a P2X7 receptorok gátlásával csökkentettük, ebből arra következtethetünk, hogy a P2X7 receptor aktivációja nem csak a median rapheból származó szerotonerg idegvégződésekre gyakorolt hatást, hanem kiterjedt a nem median rapheból származó neuronokra is a hippocampusban. Továbbá, mivel az optikai stimuláció által kiváltott 5-HT felszabadulás érzéketlen volt a TTX-re, ebből azt feltételezhetjük, hogy azok a P2X7 receptorok, melyek az 5-HT felszabadulást modulálják az MRR terminálisokból ugyanazokon a terminálisokon expresszálódnak. Azonban nem zárható ki az a lehetőség sem, hogy az 5-HT felszabadulást szabályozó vegyületek a közeli asztrocitákból szabadulnak fel a P2X7 asztroglialis aktivációjára válaszul. A P2X7 szabályozta 5-HT felszabadulás szabályozása szintén jelentős lehet a pszichiátriai rendellenességekben, mivel a közelmúltban végzett vizsgálatok rámutattak arra, hogy a P2X7 receptorok gátlásával enyhítették a depresszió és szkizofrénia szerű viselkedés mintákat rágcsáló állatmodellekben.

Végül az *in vitro* kísérlet során kapott eredményeink igazolására *in vivo* kísérleteket is végeztünk, melyekben megnéztük a neurotranszmitterek egyidejű felszabadulását az optikai stimuláció hatására. Itt láttuk, hogy az 5-HT és a Glu egyidejűleg szabadul fel a 20 Hz-es optikai stimuláció hatására, míg a GABA szint nem emelkedett a stimuláció hatására. Másrésztől mind a három neurotranszmitter ugyanolyan jól reagált a K^+ depolarizációra, amely nem korlátozódik csak a ChR2 fehérjét expresszáló neuronokra. Ugyanakkor, az 50 Hz-es theta burst-ök a GABA szint szignifikáns emelkedését idézték elő, míg az 5-HT és Glu szintek nem emelkedtek. Ez az eredmény azt szemlélteti, hogy a különböző mintázatú idegi aktivitások az MRR-ben különböző mintázatú transzmitter felszabadulásokat eredményeznek.

Végezetül az optogenetikai aktiváció alkalmas modell az *in vitro* és *in vivo* szelektív neurotranszmitter felszabadulásnak és azonosított jelátviteli útvonalból való detektálásuknak vizsgálatára, a Na^+ csatorna aktiválással és későbbi Ca^{2+} függő exocitózis fokozásával. Eredményeink azt mutatják, hogy az MRR-ben az 5-HT és Glu is felszabadul a ChR2 fehérjét expresszáló neuronokból és az 5-HT felszabadulás az ionotróp Glu receptor aktiváció eredménye. A HP-ben az 5-HT az MRR terminálisokból szabadul fel függetlenül a glutamáterg transzmissziótól és nincs a preszinaptikus 5-

HT_{1B/1D} autoreceptorok neuromodulációjának kitéve. Ezzel ellentétben mind a hippocampális MRR és nem-MRR terminálisokból felszabaduló 5-HT-t szabályozza a P2X7 receptorok endogén aktivációja.

5 Következtetések

Kutatásaink során a purinerg P2X7 receptor közreműködésére kerestünk bizonyítékokat a központi idegrendszert érintő migrén kórfolyamatában. Míg a hippocampális szerotonin felszabadulás vizsgálatában a P2X7 receptor moduláló szerepére kerestük a választ.

A következő néhány pontban szeretném kiemelni kísérleteinkkel igazolt főbb eredményeink a célkitűzések tükrében:

Migrén modell:

1. Migrén egér modellel demonstráltuk nincs különbség a vad típusú és P2X7 KO egerek fájdalom fenotípusában. A két genotípus nem mutatott szignifikáns különbséget az NTG indukálta termális hiperszenzitivitásban. A P2X7 KO egerek nem ellenállóbbak a fájdalommal szemben, mint vad társaik.
2. Az akut és szubakut BBG kezelés befolyásolta a vad típusú egerek nocifenzív viselkedését, de nem a P2X7 KO egerekét. Ebből arra következtethetünk, hogy a P2X7 receptor aktív működése szükséges a fájdalominger feldolgozásában.
3. Az NTG aktiválja a cefalus fájdalomban résztvevő agyterületeket, ahol befolyásolja a c-Fos expressziót. Kimutattuk, hogy az NTG kezelés növelte a c-Fos expressziót a gerincvelőben (C1-2) és a TNC-ben vad típusú és P2X7 KO egerekben is. Ebből arra következtethetünk, hogy a modell és a c-Fos expresszió kapcsolatban áll egymással.
4. Továbbá megállapíthatjuk, hogy a szubakut BBG kezelés csökkentette a c-Fos expressziót a TNC-ben vad típusú egerekben. Ezzel tovább erősítettük a P2X7 receptor aktiváció szerepét a migrénes fájdalomban és jellegzetes tünetek kiváltásában.

Szerotonin felszabadulás szabályozása:

1. Kísérleteinkben bemutattuk, hogy mind az elektromos, mind az optikai ingerlés hatására emelkedett az 5-HT felszabadulás az MRR-ben és a HP-ben. Tehát az optogenetikai aktiváció alkalmas modell az *in vitro* és *in vivo* szelektív neurotranszmitter felszabadulásnak vizsgálatára.
2. Vizsgáltuk a glutamát érintettségét is a szerotonin felszabadulásban. A raphe magvak hippokampális afferenseiből az optikai ingerlés indukálta szerotonin felszabadulásra nincsenek hatással a glutamát receptor antagonisták.
3. Megvizsgáltuk az 5-HT_{1A/1B/1D} receptorok érintettségét is a hippokampális 5-HT felszabadulásban, azonban úgy tűnik, hogy a specifikus optikai ingerlésre felszabaduló 5-HT mennyiségére nincsenek hatással 5-HT_{1A/1B/1D} és 5-HT_{1A} agonisták.
4. Kísérleteinkben bemutattuk, hogy a P2X7 receptor aktív működése szükséges a median rapheből és a nem-median rapheből származó hippokampális szerotonerg idegvégződésekből a szerotonin felszabadulásához.
5. Tovább erősíti a P2X7 receptor aktiváció szerepét, hogy mind az optikai, mind az elektromos stimulációs paradigmák által felszabadított endogén ATP elősegíti az 5-HT felszabadulását a szerotonerg varikozitásokból.

Összefoglalva eredményeinket, a P2X7 receptorok hatásközvetítő szerepe igazolódott a migrén kórfolyamatában NTG indukált egér migrén modellben, és az elektromos és optikai stimulációk által kiváltott hippokampális 5-HT felszabadulás szabályozásában.

6 Saját publikációk

Az értekezés témájában megjelent közlemények:

Göloncsér E, Baranyi M, Balázsfi D, Demeter K, Haller J, Freund TFF, Zelena D, Sperlággh B. (2017) Regulation of hippocampal 5-HT release by P2X7 receptors in response to optogenetic stimulation of median raphe terminals of mice. *Front Mol Neurosci.* 2017 Oct 12;10:325. doi: 10.3389/fnmol.2017.00325. eCollection 2017.

Gölöncsér F, Sperlágh B. (2014) Effect of genetic deletion and pharmacological antagonism of P2X7 receptors in a mouse animal model of migraine. *J Headache Pain*. 2014 May 1;15:24. doi: 10.1186/1129-2377-15-24.

Egyéb közlemények:

Balázsfi DG, Zelena D, Farkas L, Demeter K, Barna I, Cserép C, Takács VT, Nyíri G, Gölöncsér F, Sperlágh B, Freund TF, Haller J. (2017) Median raphe region stimulation alone generates remote, but not recent fear memory traces. *PLoS One*. 2017 Jul 14;12(7):e0181264. doi: 10.1371/journal.pone.0181264.

Bekő K, Koványi B, Gölöncsér F, Horváth G, Dénes Á, Környei Z, Botz B, Helyes Z, Müller CE, Sperlágh B. (2017) Contribution of platelet P2Y12 receptors to chronic Complete Freund's adjuvant-induced inflammatory pain. *J Thromb Haemost*. 2017 Mar 27. doi: 10.1111/jth.13684.

Baranyi M, Porceddu PF, Gölöncsér F, Kulcsár S, Otrókoci L, Kittel Á, Pinna A, Frau L, Huleatt PB, Khoo ML, Chai CL, Dunkel P, Mátyus P, Morelli M, Sperlágh B. (2016) Novel (Hetero)arylalkenyl propargylamine compounds are protective in toxin-induced models of Parkinson's disease. *Mol Neurodegener*. 2016 Jan 13;11:6. doi: 10.1186/s13024-015-0067-y.

Huleatt PB, Khoo ML, Chua YY, Tan TW, Liew RS, Balogh B, Deme R, Gölöncsér F, Magyar K, Sheela DP, Ho HK, Sperlágh B, Mátyus P, Chai CL. (2015) Novel arylalkenylpropargylamines as neuroprotective, potent, and selective monoamine oxidase B inhibitors for the treatment of Parkinson's disease. *J Med Chem*. 2015 Feb 12;58(3):1400-19. doi: 10.1021/jm501722s. Epub 2015 Jan 28.

Horváth G, Gölöncsér F, Csölle C, Király K, Andó RD, Baranyi M, Koványi B, Máté Z, Hoffmann K, Algaier I, Baqi Y, Müller CE, Von Kügelgen I, Sperlágh B. (2014) Central P2Y12 receptor blockade alleviates inflammatory and neuropathic pain and cytokine production in rodents. *Neurobiol Dis*. 2014 Oct;70:162-78. doi: 10.1016/j.nbd.2014.06.011. Epub 2014 Jun 25.

Csölle C, Baranyi M, Zsilla G, Kittel A, Gölöncsér F, Illes P, Papp E, Vizi ES, Sperlágh B. (2013) Neurochemical Changes in the Mouse Hippocampus Underlying the Antidepressant Effect of Genetic Deletion of P2X7 Receptors. *PLoS One*. 2013 Jun 21;8(6):e66547. doi: 10.1371/journal.pone.0066547. Print 2013.

Sperlágh B, Csölle C, Andó RD, Gölöncsér F, Kittel A, Baranyi M. (2012) The role of purinergic signaling in depressive disorders. *Neuropsychopharmacol Hung*. 2012 Dec;14(4):231-8. Review.

Csölle C, Andó RD, Kittel Á, Gölöncsér F, Baranyi M, Soproni K, Zelena D, Haller J, Németh T, Mócsai A, Sperlágh B. (2013) The absence of P2X7 receptors (P2rx7) on non-haematopoietic cells leads to selective alteration in mood-related behaviour with dysregulated gene expression and stress reactivity in mice. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2013 Feb;16(1):213-33. doi: 10.1017/S1461145711001933. Epub 2012 Jan 16.

Kováts N, Ács A, Gölöncsér F, Barabás A. (2011) Quantifying of bactericide properties of medicinal plants. *Plant Signal Behav*. 2011 Jun;6(6):777-9. Epub 2011 Jun 1.

Hracskó Z, Baranyi M, Csölle C, Gölöncsér F, Madarász E, Kittel A, Sperlágh B. (2011) Lack of neuroprotection in the absence of P2X7 receptors in toxin-induced animal models of Parkinson's disease. *Mol Neurodegener.* 2011 May 4;6:28. doi: 10.1186/1750-1326-6-28.

További közlemények, melyek a Könyvtári Adatlapon nem szerepelnek:

Stephan G, Huang L, Tang Y, Vilotti S, Fabbretti E, Yu Y, Nörenberg W, Franke H, Gölöncsér F, Sperlágh B, Dopychai A, Hausmann R, Schmalzing G, Rubini P, Illes P. (2018) The ASIC3/P2X3 cognate receptor is a pain-relevant and ligand-gated cationic channel. *Nat Commun.* 2018 Apr 10;9(1):1354. doi: 10.1038/s41467-018-03728-5.

Beamer E, Gölöncsér F, Horváth G, Bekő K, Otrokocsi L, Koványi B, Sperlágh B. (2016) Purinergic mechanisms in neuroinflammation: An update from molecules to behavior. *Neuropharmacology.* 2016 May;104:94-104. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.09.019. Epub 2015 Sep 16. Review.

Kováts N, Gölöncsér F, Ács A, Razaey M. (2010) Quantification of the antibacterial properties of *Artemisia absinthium*, *A. vulgaris*, *Chrysanthemum leucanthemum* and *Achillea millefolium* using the *Vibrio fischeri* bacterial bioassay. *Acta Bot Hung.* 2009 Sep;52(1-2). doi: 10.1556/ABot.52.2010.1-2.e2