Hippokampális periszomatikus gátlósejtek kolinerg modulációja és részvétele a karbakol-indukált gyors hálózati oszcillációkban

Doktori tézisek

Szabó Gergely
Semmelweis Egyetem
Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Hájos Norbert, Ph.D., D.Sc.
Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet
Hálózat és Idegélettani Kutatócsoport

A doktori értekezés hivatalos bírálói:
Prof. Czéh Gábor, Ph.D., D.Sc.
Dr. Puskár Zita, Ph.D.

A szigorlati bizottság tagjai:
Prof. Halász Béla Ph.D., D.Sc. - elnök
Prof. Kiss József MD., Ph.D., D.Sc.
Dr. Karmos György MD., Ph.D.

Budapest, 2012

I. BEVE

A piramissejtek általi informá
gátló idegsejt kontrollja mellett
célelem-szelektivitás alapján a
feloszthatók sejtekre, melyek a pi
dendritikus régióját idegzik be.
gátlósejtek hatékonyan szabályozzá
képesek szinkronizálni nagyobb pir

A periszomatikus gátlósejte
kosársejtek (fast spiking basket c
kosársejtek (regular spiking bas
axoaxonikus sejtek (axo-axonic cel
piramissejtek szómáját és proximáli
axon iniciális szegmentumát innerv

Ismert, hogy a kolinerg mod
folyamatokra, mint a figyelem va
GABAerg gátlósejtek sokféle m
receptorok aktivációjával, így fel
acetilkolin hatása az általuk beideg
számos tanulmány taglalta a hippo
receptorainak felépítését és ezen
kolinerg receptor agonistákra, a
hatásmechanizmusát eddig ne
azonosított periszomatikus gátlósejt

A kolinerg neuromoduláció e
különböző működési állapotai közö
változásával. Például, mikor a k
magas, az ún. théta ritmusba ágya
meg a mezőpotenciálban, például e
frekvencia tartományba eső o
agyszeleten is indukálható egy
agonista, a karbakol (CCh) alkalm
hálózati oszcilláció sejtszintű me
periszomatikus gátlósejtek részvé

annak megértésében, hogy milyen folyamatok működhetnek a gamma oszcilláció hátterében szabadonmozgó állatban.

II. CÉLKITŰZÉSEK

A doktori értekezés fő célja annak vizsgálata volt, hogy a különböző periszomatikus gátlósejtek milyen mértékben járulnak hozzá a kolinerg receptorok aktivációjával indukált gyors hálózati oszcillációk létrejöttéhez. Ennek érdekében két nagyobb célt határoztunk meg:

Az első célunk annak meghatározása volt, hogy a különböző periszomatikus gátlósejttípusok milyen kimeneti tulajdonságokkal rendelkeznek, valamint, hogy milyen mértékben érzékenyek az acetilkolin receptorok aktivációjára. Ennek érdekében egy új módszer kidolgozása vált szükségessé a vizsgált neuronok egyértelmű azonosítására. Továbbá, azt is célul tűztük ki, hogy meghatározzuk, milyen receptorok felelősek az acetilkolinnak a periszomatikus interneuronoktól eredő szinaptikus gátlásra kifejtett hatásáért és ezek hátterében milyen hatásmechanizmusok állnak.

Az értekezés másik irányvonala mentén azok a kísérletek sorakoztak, melyeknek célja annak felderítése volt, hogy az egyes periszomatikus gátlósejtek hogyan viselkednek a CCh-indukált gyors hálózati oszcilláció alatt. Ennek érdekében az egyes interneuronok tüzelési mintázatát monitoroztuk hippokampális agyszeletekben, melyekben oszcillációt tartottunk fenn. Ezután azt vizsgáltuk, hogy az egyes periszomatikus gátlósejtek működésének farmakológiai manipulációjával hogyan befolyásolható az oszcilláció.

III. ANYAG É

A kísérleti állatok tartása és f
Unió Tanácsának 1986. novemb
irányelvének. A párelvezetéses k
egereket használtunk, amelyekben a
a glutaminsav dekarboxiláz-65 (GA
(PV) fehérje génjének promoteréhe
tanulmányozásához transzgenikus
tartozó egereket használtunk. Az ag
preparáltuk. Izoflurános altatást ma
jéghideg karbogén gázzal buborék
vibratómmal 200–350µm vastag h
A kísérletek kezdetéig 'interface' tí
a szeleteket, melybe szobahőmérsé
folyadékot (ACSF) helyeztünk.

Az első kísérletsorozatban
preszinaptikus sejthez kálium-, a
cézium-glukonát alapú intracel
preszinaptikus interneuronokat cur
membrán potenciál értéken tartottu
ms, 1–2 nA) akciós potenciál
posztszinaptikus válaszokat a
módban vezettük el, a sejteket -65m

A második kísérletsorozatba
készítettünk. Az oszcillációkat 5 µ
duplafolyású kamrában. A mezo
'spike'-okat ACSF-fel töltött pipet
ingerléssel kiváltott gátló posz
farmakológiailag izoláltuk 3mM kin
ionotróp glutamát receptorokat bl
serkentő posztszinaptikus áramok
receptor-mediált áramokat blo
pikrotoxin (600–650 µM) segítségé

Azon kísérletek kivételével, melyek célzottan az in vivo mérhető gamma oszcilláció és a CCh-indukált oszcilláció hasonlóságát demonstrálták (33°C), minden kísérlet szobahőn zajlott.

Mindkét kísérletsorozatban a pipettaoldat 0.3-0.5% biocytint tartalmazott, melynek segítségével az interneuronok morfológiai bélyegek alapján post-hoc azonosítva lettek. Az FSBC-ek, illetve az AAC-ek elkülönítésére egy további immunfluoreszcens jelölési módszert fejlesztettünk ki az ankyrin-G fehérje elleni antitest használatával, mellyel láthatóvá váltak a neuronok axon inicilis szegmentumai.

IV. EREDMÉNYEK

Első rész: A CA3 periszomatikus gátlósejtek kimeneti tulajdonságai és érzékenysége acetilkolin receptor aktivációra

Transzgenikus egerekben a GFP expresszió révén a PV ill. a GAD65 tartalom vizualizációjával lehetővé vált az FSBC-ek és AAC-ek, valamint az RSBC-ek szelektív kijelölése. A PV-t expresszáló csoportban az FSBC-eket az AAC-ektől az axon iniciális szegmentumok láthatóvá tétele után az azokra adott biocytin-töltött boutonok megléte, illetve hiánya alapján különítettük el. A GAD65eGFP jelölt csoportban a RSBC-ek azonosítása az akkomodáló tüzelés, illetve a morfológia alapján történt.

A jelölt sejtek és posztszinaptikus partnereik közti párelvezetésben az akciós potenciálokra adott IPSC válaszokat regisztráltuk és belőlük különböző szinaptikus tulajdonságokat határoztunk meg. Azt találtuk, hogy az RSBC-ek képesek transzmittert üríteni aszinkron módon, melyre erős frekvenciafüggés jellemző. Ezzel szemben az FSBC-ek és az AAC-ek csak az akciós potenciálhoz pontosan időzített, szinkron transzmitter felszabadításra képesek. A legnagyobb csúcsamplitúdójú és a leglassabb elhalási kinetikájú IPSC-ket az AAC-ek produkálták. A lassú elhalási kinetika

a szomszédos feltehetően a bouton
nak volt köszönhető szobahőmérs
megfigyelhető a másik két típusn
másik két sejttípussal szemben a h
valamint a transzmissziós hiba foko

A következő kísérletekben a p
receptor aktivációra való érzékenys
a CCh mindhárom sejttípus es
amplitúdóját, de különböző mérté
esetében számottevő, de részleg
amplitúdójában. Ezzel szemben az
esetben a transzmisszió teljes hiány
eszközök alkalmazásával felderítet
AAC-ek esetében a CCh a preszin
muszkarinos acetilkolin recept
terminálison hatva csökkentette le
esetében a CCh közvetett módon, a
M3 receptorhoz kötődve endokann
molekulák a preszinaptikus 1-es
kötődve okozzák a GABA ürül
terminálisokból. A GABA ürülés
részvételét valószínűsíti a CCh-indu

Második rész: A periszomatiku indukált gamma oszcilláció létrej

A disszertáció második fele
amelyeknek célja a vizsgált inter
volt CCh-indukált gyors hálózati os
a neuronok milyen mértékben
kialakításához. A sejtaktivitás
indukáltunk CCh-lal a hippokam
elvezetése mellett pedig 'loose pat
periszomatikus gátlósejttípusok tü
hogy mindegyik sejttípus az oszcil
különböző gyakorisággal és preci

legerősebb fáziskapcsoltságot, valamint ezek a sejtek az oszcilláció minden ciklusában kisültek, gyakran dupla akciós potenciállal. A másik két sejttípus kevésbé volt fáziskapcsolt és kisebb gyakorisággal tüzelt az oszcilláció alatt. A RSBC-ek gyenge kapcsoltságot mutattak, mely alátámasztja a hipotézisünket, miszerint részvételük az oszcilláció létrejöttében nem lehet jelentős. A következő kísérletsorozatban azt vizsgáluk meg, mi történik az oszcillációval a μ-opioid receptorok (MOR) aktiválásának hatására, mely receptorok jelenlétét kimutatták a PV-t expresszáló interneuronok terminálisain. A MOR-ok aktiválása egy MOR agonista, a DAMGO-val ([D-Ala 2 ,N-Me-Phe 4 ,Gly 5 -ol]enkefalin acetát) jelentősen csökkentette az oszcillációt , és sok esetben teljesen meg is azt. További kísérleteink során azt találtuk, hogy a DAMGO lecsökkenti a piramissejtekre érkező kiváltott IPSC-k amplitúdóját, mely a piramissejtek tüzelésének deszinkronizációjához vezet. Annak feltárására, hogy melyik periszomatikus gátlósejttípustól érkező IPSC-k amplitúdóját csökkenti a DAMGO, párelvezetéseket végeztünk. Ezen kísérleteink feltárták, hogy CCh jelenlétében a FSBC-ek által produkált IPSC-k amplitúdója tovább csökken DAMGO hatására, míg az AAC-ektől eredő IPSC-k amplitúdója változatlan marad, tehát a DAMGO a CCh-indukált oszcillációt a FSBC-ek terminálisaiból felszabaduló GABA gátlásán keresztül szünteti meg.

Ezen kísérletek összességében azt sugallják, hogy a CCh-indukált gyors hálózati oszcillációk genezisében a kulcsszerepet a FSBC-ek játsszák.

V. KÖVETKI

A disszertáció fő célja a p
tulajdonságainak feltérképezése vo
hogy ezen sejtek milyen mértékb
gyors hálózati oszcillációk genezis
világítottak rá, hogy a vizsgált gá
tekintve különböző tulajdonságo
piramissejtek periszomatikus kont
egyes interneuron típusok különb
hippokampális hálózati aktivitá
mindegyikük érzékenységet muta
felveti annak lehetőségét, hogy
változtatásával a periszomatikus g
különböző működési állapotokat ve
az egyik legfontosabb következte
hálózati oszcillációk kialakulás
részvétele a periszomatikus gátlásb
5μM CCh jelenlétében számottevo
transzmittert, így részvételük az o
jelentős.

A dolgozat második részébe
egyes periszomatikus gátlósejtek
mutatják be, tovább erősítik ezt
gyengén kapcsolt RSBC-ek részve
igen valószínűtlen. Ezzel szemben
FSBC-ek a legalkalmasabbnak a
hálózati oszcillációk elsődleges ritm
ek szerepe az oszcilláció kiala
kiterjeszthető az in vivo elvezethető
thétába ágyazott gamma oszci
mechanizmusok számos hasonlósá
vizsgált CCh-indukált oszcillációva
lehet a thétába ágyazott gam
hippokampális memóriafunkciókba

VI. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Hájos Norbertnek a folyamatos szakmai támogatásért, bátorításért és segítőkészségért, amit tanúsított a csoportban eltöltött évek során. Külön köszönöm a dolgozat többszöri kritikus és alapos átnézésére szánt idejét.

Hálás vagyok Prof. Freund Tamásnak, aki lehetőséget biztosított munkám elvégzéséhez, valamint akinek folyamatos támogatását élvezhettem a Ph.D. évek alatt és azt megelőzően a Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézetben.

Köszönet illeti Prof. Gulyás Attilát, aki kísérletes munkájával hozzájárult a dolgozat második felének eredményeihez, külön köszönet továbbá az általa írt számítógépes szoftverekért, amelyek nagyban megkönnyítették a kísérleti adatok analízisét.

Hálás köszönettel tartozom Dr. Holderith Noéminek, aki az anatómiai vizsgálatok nagyrészét végezte a dolgozat mindkét részéhez.

Köszönet illeti továbbá Dr. Erdélyi Ferencet és Dr. Szabó Gábort a transzgenikus állatokért. Köszönöm Gregori Erzsébetnek és Lengyel Katalinnak a kiváló asszisztenciát.

Külön köszönet illeti Dr. Zemankovics Ritát, aki a dolgozatot elolvasta és azt számos kommenttel és építő jellegű kritikával látta el.

Hálás vagyok a Hálózat-Idegélettani Kutatócsoport minden jelenlegi és volt munkatársának, akik a laborban eltöltött időt kellemessé és örömtelivé tették és akiknek mindennapi segítsége nélkül a dolgozat biztosan nem jött volna létre.

Legvégül köszönet illeti szüleimet, akik mindvégig támogatták elképzeléseimet.

VII. PUBLIKÁCI

A disszertációhoz kapcsolódó pub

Szabo GG, Holderith N, Gulyas AI,
Distinct synaptic properties of per
their different modulation by chol
CA3 region of the mouse hippocam
EUROPEAN JOURNAL OF NEU
2246. (2010)

Gulyas AI, Szabo GG, Ulbert I, H
Szabo G, Freund TF, Hajos N
Parvalbumin-containing fast-spikin
potential oscillations induced by ch
hippocampus.
JOURNAL OF NEUROSCIENCE

Egyéb publikáció

Hajos N, Holderith N, Nemeth B,
R, Freund TF, Haller J
The Effects of an Echinacea Prep
and the Firing Properties of
Hippocampus.
PHYTOTHERAPY RESEARCH 2