

Összefoglaló

A CA1 hippocampális piramis sejtek szinaptikus kapcsolatai révén más idegsejtektől sok tízezer serkentő és gátló bemenetet kap, melyek integrációja meghatározza az adott idegsejt elektromos aktivitását. Ezen szinaptikus kapcsolatokban két fő ideg ingerület átvivő anyag a glutamát és a γ -amino-vajsav (γ -amino-butyric-acid, GABA) felelős az információ áramlásért. A serkentésért felelős glutamáterg szinaptikus bemenet több száz mikron hosszban terül szét a dendritikus hálózaton, míg az akciós potenciált indító kimenet az axon kezdeti szakaszára lokalizálódik. Ezen serkentő bemenetekben a glutamát aktiválta ionotrop csatornák (iGluR) α -amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazole-4-propionate (AMPA), *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) és kainate (KA) aktiválódásán keresztül történik az információ átvitel, melyek neveiket az őket szelektíven aktiváló kémiai anyagokról kapták. Az AMPA receptorokon a gyors információ átvitel zajlik, míg az NMDA receptorok speciális aktivitási mintázatok hatására képesek a szinaptikus kapcsolatok erejét hosszú időre is megváltoztatni, módosítva az AMPA receptorok mediálta választ.

Az AMPA receptorok 4 fő alegységből épül fel, melyek homomer vagy heteromer kombinációt alkotva tetramer vagy pentamer csatornát képeznek. A közelmúltban több fontos részlet került napvilágra a különböző transzportációs és sejtmembránba való receptor szállításról, melyek rámutattak az alegységekben rejlő szabályzó mechanizmusokra, hangsúlyozva az eltérő C-terminálisokon lévő foszforilációs, és a különböző szállító-, lehorgonyzó-fehérjék kötődési helyek fontosságát. Ezen tanulmányok sejtetik a különböző alegységekből felépülő receptorok eltérő szerepét a három fő szinaptikus plaszticitási formákban (I. Homeosztatis, II. Hebbian-típusú, III. távolság-függő-szinaptikus-behangoló) és óriási lehetőséget kínálnak a plaszticitási formák vizsgálatához ezen alegységek manipulálásával.

- I. A Homeosztatis plaszticitás celluláris és hálózati stabilitást biztosít, globálisan optimalizálja a szinaptikus kapcsolatokat, valamint szabályozza a jel értékét és az adott idegsejt válaszképességét a dinamikusan változó környezetben.
- II. A Hebbian-típusú plaszticitás /hosszú-távú potenciálódás (Long-Term Potentiation or Depression; LTP, LTD, stb)/ progresszíven módosítja a

hálózat tulajdonságait, asszociatív változásokat során növeli a szinaptikus kapcsolatok közötti különbségeket (az azokat ért hatások történeti sorrendjétől függően). Jelen felfogásunkban fontos szerepe lehet különböző komputációs és memóriális folyamatokban.

- III. A távolság-függő-szinaptikus-behangolás (Distance-Dependent-Synaptic-Scaling; DDSS) úgy állítja be az egyes szinapszisok erejét, hogy minden egyes szinapszis egyenlő hatással bírhatson a sejtben gerjedő kimenetre, függetlenül a kimeneti válaszreakció helyétől mért távolságtól. Ezen plaszticitási forma sok hasonlóságot mutat a korábban leírt és fentebb említett két fő plaszticitási jelenségekkel. Mind a Homeosztatis mind a távolság-függő plaszticitási mintázat globálisan optimalizálja a szinaptikus kapcsolatokat.

Korábbi eredményekre alapozva valószínű, hogy mindhárom plaszticitási forma célja a szinaptikus transzmisszió módosítása, megváltoztatva a számát és/vagy a tulajdonságait a poszt-szinaptikus glutamát receptoroknak.

Az elmúlt pár évben, a DDSS valamint a Hebbian típusú plaszticitási formák kutatására fókuszáltunk, hogy meghatározzuk a bennük működő mechanizmusokat. E célból lokálisan vizsgáltuk a szinaptikus eseményeket, elektromos/molekuláris beavatkozások előtt és után, vad típusú és genetikailag módosított egereken, elkerülve a térbeli és időbeli hatását más szinaptikus eseményeknek, valamint a dendritikus vezetőképesség egyenetlenségeiből adódó mellékhatásokat, melyek a korábban használt szomatikus elvezetéseket nagymértékben befolyásolták. Mindemellett az AMPA receptorok biofizikai tulajdonságainak analizálásához, mint egyetlen csatorna vezetőképessége, maximális nyitási valószínűsége, glutamát affinitása és az AMPA áramok kinetikájának leírásához a patch-clamp technika egy másik speciális konformációját használtuk, nevezetesen az "outside-out patch" formációt mely a szinaptikusan aktív dendritikus plazmamembrán mintavételezését jelentette.

Elsőnek, kísérleteinkben a CA1 piramis sejtek apikális dendritfájának a CA3 sejtekből eredő Schaffer kollaterálisok által beidegzett szakaszára fókuszáltunk. A Schaffer kollaterálisok viszonylag homogén eloszlással, több száz mikron távolságban serkentő szinaptikus bemenetekkel látja el az apikális dendrit fát. A sejttesttől való

távolsággal folyamatosan növekvő szinaptikus vezetőképesség csökkenti azok távolság függőségét. AMPA és NMDA receptorok biofizikai és kinetikai tulajdonságainak leírásához outside-out patch konfigurációt használtunk, mely a sejtől való membránkiszakítással szerzett minta gyors glutamát applikációs rendszerbe való helyezése során kiváltott AMPA, NMDA áramok elemzése jelentette. Karakterizáltuk az áramok méretét, agonista affinitását, kinetikai és biofizikai tulajdonságát és összehasonlítottuk az apikális dendritfa eltérő helyeiről származó mintákon. Kísérleteinkből egyértelműen kiderült, hogy az AMPA áramok amplitudójának középértéke legalább megkétszereződött a szomától való. A növekedés oka lehet az AMPA receptor számának vagy denzitásának növekedése, vagy a receptorok valamely tulajdonságának megváltozása. Eltérő alegységekből felépülő receptor kompozíciók vagy különböző foszforilációs állapotok megváltoztathatják a kinetikai tulajdonságait, ion permeabilitását, agonista affinitását, feszültség-áram kapcsolatát, egyedi csatorna vezetőképességét és maximális nyitási képességét az adott AMPA receptornak. Megvizsgáltuk az összes lehetőséget, és ezeket összehasonlítottuk a különböző távolságból vett mintákon, de nem találtunk egyik jellemzőben sem jelentős eltérést. Azonban a receptorok száma kétszeresére nőtt. Ezen eredmény meggyőző bizonyíték arra, hogy az AMPA receptor számának progresszív növekedése lehet az alapja a távolság-függő-szinaptikus-behangolás mechanizmusának és nem a receptorok megváltozott tulajdonsága.

További kísérleteinkben GluR-1 alegység hiányos egerek szinaptikus AMPA áramait és az apikális dendritről származó membrán mintákon (patch-eken) mérhető AMPA áramok tulajdonságait hasonlítottuk össze vad típusú egereken mért eredményekkel. A kiszakított membrándarabokon mért AMPA áramok mérete nagymértékben csökkent, (lokalizációtól függetlenül) közel 97%-kal. Ezen áramok kinetikája is gyorsult, valamint a csatornák nyitási képessége is jelentősen csökkent. A szinaptikus áramok mérete szintén csökkent, s a csökkenés mértéke távolság függvényében nőtt. Vad típusú állatoknál a szomától való távolság függvényében 107 %-os növekedés volt megfigyelhető, míg a génmanipulált egerekben mindössze 23 %-os volt. Statisztikai analízise a szinaptikus áramoknak azt mutatta GluR1-es alegység hiánya esetén, hogy a disztálisan lévő Schaffer kollaterálisokkal alkotott szinapszisok

elvesztették a vad típusú egerekben meglévő, távolsággal együtt növekvő poszt-szinaptikus válaszképességüket. Egyedi szinapsziszra fókuszált glutamát adása (két-fotonos mikroszkoppal végzett kísérlet) megerősítette a fenti megfigyelésünket, és kizárta a pre-szinaptikus oldal érintettségét. Vizsgálataink eredményei azt sugallják, hogy extra-szinaptikus AMPA receptor állomány szinte kizárólagosan GluR1-es alegységet tartalmazó receptorokból áll (valószínű, hogy GluR1/2 heteromer) és a DDSS-t a Schaffer kollaterálisokkal alkotott szinapsziszok szinaptikus erejének ezen receptorok megnövekedett transzportja eredményezi távolság függvényében. Fenti eredményeinkből arra következtethetünk, hogy ezen szabályozott receptor transzport magába foglalja az extra-szinaptikus és szinaptikus receptor állomány közti dinamikus csereforgalmat.

Munkánk harmadik részében megvizsgáltuk felnőtt patkányban a hosszú-távú potenciálódás (LTP) során, az AMPA áramokon bekövetkező változásokat. Tetanusz kiváltotta potenciálódás során jelentős mértékben (~75%) megnövekedett az AMPA receptorok által képviselt glutamát áramok amplitúdója az apikális dendrit membránból származó (outside-out patch) mintákon és ennek oka AMPA receptorok számának megnövekedése. Az áramok deaktiválódási kinetikájában lassulás figyelhető meg, valamint kismértékben megnövekedett a csatornák maximális nyitási képessége. Mindazonáltal az AMPA receptorok más tulajdonságai nem változtak, nevezetesen az egyedi csatorna vezetőképesség, áram-feszültség viszony és agonista affinitás megegyező volt a kontrol állapotban mért értékekkel.

Megnövelt intracelluláris CaMK-II aktivitás utánozta a tetanusz stimulálás kiváltotta potenciálódás során bekövetkező és fentebb említett változásokat. A szinaptikus stimulálás során befolyásolt dendritikus régió nem sokkal nagyobb, mint a stimulált terület, és a serkentő szinapsziszok jelenléte szükséges ezen változások megjelenéséhez. Eredményeink értelmezése szerint az általunk használt stimulus megnövelte az AMPA (valószínűleg GluR1/2 heteromer típusú) receptor transzportot a szinaptikusan aktív dendritikus régióban, anélkül, hogy jelentős változás történt volna a receptorok alap, biofizikai tulajdonságaiban. Mindezek alapján feltételezzük, hogy elsődlegesen az extra-szinaptikus receptorok azok, amelyek megjelennek a membránból vételezett mintáinkban, s melyek a potenciálódás során idővel megérkeznek az aktiválódott poszt-szinaptikus-denzitásba (PSD). Az ezt végrehajtó szabályzó

mechanizmus dinamikus transzportot bonyolít le az extra-szinaptikus és szinaptikus AMPA receptor populáció között.

Összefoglalva és egy egyszerűsített modellbe sűrítve eredményeinket, elmondhatjuk, hogy az AMPA receptorok számának és/vagy bizonyos tulajdonságainak megváltozása a fő alap mechanizmusai a különböző szinaptikus plaszticitási formáknak, valamint azt, hogy bizonyos típusú alegységekből felépülő csatornák eltérő módon érintettek ezen folyamatokban. Nevezetesen a GluR1-es alegységet tartalmazó AMPA csatornák alap alkotója a Schaffer kollaterálisok által alkotott serkentő szinapszisoknak, különös tekintettel a sejttesttől távolabb elhelyezkedő szinapszisokra. A GluR1-es alegységgel rendelkező AMPA receptorok alkotják szinte a teljes extra-szinaptikus receptor állományt. Valamint ugyanezen receptor távolság-függő szinaptikus beágyazása a DDSS plaszticitás mechanizmusa. Eredményeink szerint a kifinomult szabályozású AMPA receptorok dinamikus transzportja a szinaptikus és extra-szinaptikus receptor populáció között GluR1 alegység jelenlététől függő, továbbá valószínű, hogy a két funkcionálisan eltérő szinaptikus plaszticitási forma (LTP és DDSS) használja ezen dinamikus transzport rendszert a szinapszisok szinaptikus-súlyának behangolására. Ugyanakkor a GluR1-es alegység hiányában minden egyes szinapszist közel azonos számú (feltételezhetően) GluR2/3 típusú AMPA receptor alkotja, függetlenül a sejt-testtől való távolságuktól. Ezen megfigyelés indirekt sejteti, hogy a GluR1 tartalmú AMPA receptorok a fent említett GluR2/3 receptor alkotta szinapszisokhoz hozzáadódnak a szinapszis elektromos távolságával egyenes arányban. Az így behangolt szinapszisokhoz további GluR1 tartalmú AMPA receptorok adódnak LTP során. Mindazonáltal a három fő szinaptikus plaszticitási forma kifinomult szabályozási rendszert sejtet, mely képes a sejt, valamint a neuronális hálózat homeosztatikus egyensúlyát meghatározni úgy, hogy közben képessé teszi megfelelő és többirányú válaszadásra a dinamikusan változó környezetben.