

**Fiziológiás és patológiás agyi állapotok  
celluláris és hálózati mechanizmusai**

Doktori értekezés tézisei

**Horváth-Furdan Szabina**

Témavezető:

Dr. Lőrincz László Magor

egyetemi docens

Biológia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék



2021

Szeged

## Rövidítésjegyzék

5-HT: 5-hidroxi-triptamin; szerotonin

AE: absence epilepszia

ChR2: Channelrhodopsin2

DPP: depolarizáló posztszinaptikus potenciál

DRM: dorzális raphé mag

EEG: elektroencefalogram

GABA: gamma-amino-vajsav

HCN: hiperpolarizáció-aktivált ciklikus nukleotid kapuzott

HPP: hiperpolarizáló posztszinaptikus potenciál

IPSP: inhibitorikus posztszinaptikus potenciál

LA: lassú hullámú alvás

LH: laterális hipotalamusz

PA: paradox alvás

STG: Stargazer

SWD: tüske-hullám kisülés (az angol spike and wave discharge elnevezéséből származó rövidítés: SWD)

TC: talamokortikális

VB: ventrobazális

Vgat: vezikuláris GABA transzporter

VT: vad-típusú

## **Bevezetés**

Doktori disszertációmban kettő kutatási témával foglalkozom: mind fizioiógias (alvás-ébredés ciklus) mind pedig patológiás (epilepszia) agyi állapotok celluláris és hálózati mechanizmusainak feltárásával.

Szenzoros bemenetek hiányában az emlős agyra az állapotfüggő spontán aktivitások széles skálája jellemző. Ilyen spontán agyi állapotok és a köztük lévő átmenetek detektálhatóak mind fizioiógias (pl. alvás-ébredés ciklus), mind pedig patológiás (pl. epilepszia) körülmények között. Az agykéreg állapotfüggő aktivitását az idegsejtek intrinszik tulajdonságai, a talamo-kortiko-talamikus hálózattól érkező projekciók dinamikája és a neuromodulátor rendszerek együttesen szabályozzák.

### **Fizioiógias agyi állapot: alvás-ébredés ciklus**

Az agyi állapotokat a talamo-kortiko-talamikus hálózaton kívüli más agyi struktúrák is jelentős mértékben befolyásolják. Az agyi állapotok közötti különbség ébredés és alvás között a legegyszerűbb, azonban az állapotok közötti átmenetek mechanizmusai nagyon összetettek, kevésbé feltártak. Az agyi állapotok mechanisztikus feltárásának fő akadály a résztvevő sejt elemek heterogenitása, továbbá hogy egyre több, egymással kölcsönhatásban lévő agyi területről és azok neuromodulátoros rendszeréről fedezik fel, hogy dinamikus interakciójuk szabályozza az agyi állapotok változását.

A szerotonerg rendszer egy evolúciósan konzervált, komplex neuromodulátor rendszer, amely közel az összes agyi régióba projektál. A szerotonin (5-hidroxi-triptamin, 5-HT) az agytörzsben lévő raphé magban elhelyezkedő szerotonerg neuronok axon terminálisáiból szabadul fel és számos agyi funkciót befolyásol. Az alvás-ébredés szabályzásában betöltött szerepe mellett az 5-HT részt vesz az egyes szenzoros, motoros és kognitív funkciók finomhangolásában, diszfunkciója viszont olyan kóros állapotokkal hozható összefüggésbe, mint például schizofrénia, depresszió, autizmus, szorongás. A dorzális raphé mag (DRM) szerotonerg neuronok alvás-ébredés ciklus szabályzásában betöltött szerepéről ellentmondásos kísérleti eredmények születtek. Korai tanulmányok eredményi alapján az 5-HT hipnógén hatású, azonban az elektrofizioiógiai tanulmányok leírták, hogy a vélhetően szerotonerg neuronok aktivitása az ébredés alatt a legmagasabb, a lassú hullámú alvás (LA) alatt csökken és paradox alvás (PA) alatt szinte teljesen megszűnik. Érdekes módon, még az újabb kutatások eredményeiben is találunk ellentmondásokat. Az 5-HT neuronok optogenetikai stimulációja egyes esetekben ébredést idézett elő és csökkentette

az alvással töltött időt, míg más vizsgálatok szerint hipnogén hatású volt. A részben egymásnak ellentmondó eredmények oka a DRM heterogén sejttypusai, illetve az alkalmazott stimulációs protokollok közötti különbségekben keresendő.

A laterális hipotalamusz (LH) és DRM közötti kölcsönös kapcsolat közismert, azonban ennek funkcionális jelentősége még nem tisztázott. A LH nagy kiterjedésű, neurokémiaileg heterogén struktúra, amely több, jól megkülönböztethető magból épül fel és számos folyamat szabályzásában vesz részt. Jelentős szerepet tölt be az alvás-ébrenléti ciklus szabályzásában, részt vesz az emóciók szabályzásában, a célorientált magatartásokban, mint például evés, ivás, agresszió és bizonyos kognitív funkciók szabályzásához is hozzájárul. A LH-on belül két olyan neuropeptidet szintetizáló sejtpopuláció is található, amelyeknek jelentős szerepük van az alvás-ébrenlét ciklus szabályzásában. Az egyik ilyen populációt az orexint termelő idegsejtek alkotják. Optogenetikai módszerekkel történő szelektív aktivációjuk alvó egerek spontán ébredését eredményezi, továbbá genetikai csendesítésük alvászavart, narkolepsziát idéz elő. A LH-ban található másik jelentős sejtpopulációt a melanin-koncentráló hormont (MCH) expresszáló sejtek alkotják. Ellentétben az orexiner neuronokkal, az MCH neuronok optogenetikai stimulációja az LA és a PA kialakulásához vezet. Az orexint és MCH-t szintetizáló neuronok mellett a LH-ban található, vezikuláris gamma-amino-vajsav (GABA) tarszportert (Vgat) expresszáló idegsejtekről (LH<sub>Vgat</sub>) is bebizonyosodott, hogy fontos szabályzó funkciót töltenek be az alvás-ébrenlét ciklus során. Az LH<sub>Vgat</sub> idegsejtek specifikus ingerlése megnövelte az ébrenlét időtartamát, valamint ébredést eredményezett LA-ból. Továbbá az LH<sub>Vgat</sub> sejtek szelektív csendesítése hipnogén hatású volt. Az LH<sub>Vgat</sub> sejtek nyúlványainak *locus coeruleus* területén történő optogenetikai stimulációja LA-ból és PA-ból egyaránt ébredést eredményezett. Az LH<sub>Vgat</sub> idegsejtek funkcionális kapcsolata egyéb agytörzsi neuromodulátor rendszerekkel nem ismert.

### **Patológiás agyi állapot: epilepszia**

Az absence epilepszia (AE) a leggyakoribb epilepszia típus gyerekkorban, amely a generalizált epilepsziák csoportjába sorolható. Fő tünetei a hirtelen fellépő és rövid ideig tartó tudatvesztés, pillanatnyi cselekvésképtelenség, illetve az elektroencefalogram (EEG) regisztrátumon jelentkező 2,5-4 Hz-es túske-hullám kisülés (az angol *spike and wave discharge* elnevezéséből származó rövidítés: SWD). Az SWD-ok nyugodt ébrenlét és szendergés során jelennek meg a talamo-kortiko-talamikus hálózat oszcillációiban. Újabban számos kutatás foglalkozik a ritmikus folyamatokban

fontos szerepet játszó ioncsatornák diszfunkciójával, mint például a hiperpolarizáció-aktivált ciklikus nukleotid által kapuzott (HCN) csatornákkal. A HCN csatornák szabályozzák a nyugalmi membránpotenciált és a membrán ellenállást. A membrán depolarizációja által pozitívan hatnak az akciós potenciál kialakulására. Továbbá inhibitorikus posztszinaptikus potenciálok (IPSP) időtartamának befolyásolása révén hatással vannak a sejtek neuronális válaszaira és jelentős szerepet töltenek be a ritmikus oszcillációk kialakításában. Azáltal, hogy a HCN csatornák az idegi hálózat serkenthetőségét, a szinaptikus válaszokat és a hálózati aktivitást befolyásolják, fontos szerepet játszanak számos fiziológias folyamatban, mint például tanulás és memória. Megváltozott expressziójuk és működésük olyan patofiziológias állapotokkal hozható összefüggésbe, mint például az epilepsziás rohamok. Patológias működésben betöltött szerepüket alátámasztja, hogy temporális lebeny epilepsziával vagy AE-val diagnosztizált betegek esetében HCN csatorna mutációkat, valamint megváltozott HCN1 vagy HCN2 expressziót figyeltek meg. Kísérleti eredmények utalnak arra, hogy mind a csatornák túlszabályozása, mind pedig az alulszabályozása epilepsziás rohamok megjelenésével hozható összefüggésbe, de a talamikus HCN2 csatornák iktogenezisben betöltött pontos szerepe még tisztázatlan.

## Célkitűzések

Egy komplex és dinamikus környezethez való állandó alkalmazkodás során az élőlények magatartása folyamatosan változik. A legfeltűnőbb változás az alvás-ébrenlét átmenetkor figyelhető meg. Ennek az átmenetnek a precíz neuronális kontrollja létfontosságú és ez a neuromodulátor rendszerek egyik fő feladata. Azonban a különböző agyi állapotok közötti átmenetek precíz szabályzása nagyon összetett és ennek megfelelően aktívan kutatott. Kísérleteink során a LH és DRM neuronjainak szinaptikus kapcsolatait és azok alvás-ébrenlét ciklusra gyakorolt hatását vizsgáltuk.

Munkám során célul tűztem ki:

- Feltárni a LH területéről a különböző DRM célsejtekre érkező szinaptikus hatások mechanizmusait *in vitro* whole-cell patch clamp technika és optogenetika szimultán alkalmazásával.
- A DRM-ban található célsejtek neurokémiai identitásának immunhisztokémiai módszerekkel történő meghatározását.
- Intakt állatokban feltárni a DRM-ba projektáló LH GABAerg rostok specifikus stimulációjának hatását azonosított DRM neuronokra.

Figyelembe véve a HCN csatornák sokoldalú celluláris és szinaptikus hatását, a csatornák működése és a rohamok iktogenezise közötti ok-okozati összefüggés meghatározása nem egyszerű feladat. Munkánk során AE állatmodellekben vizsgáltuk meg, hogy a ventrobazális (VB) talamusz talamokortikális (TC) sejteiben, farmakológiai és genetikai úton történő HCN2 csatorna csendesítés milyen hatással van az epilepsziás rohamokra.

Munkám során célul tűztem ki:

- A HCN2 csatornák genetikai csendesítésének sejtszintű hatásának feltárását a VB talamuszban található TC neuronokban *in vitro* elektrofiziológiát alkalmazva, Stargazer (STG) egértörzsben.
- Az általunk használt genetikai HCN2 csatorna csendesítés immunhisztokémiai módszerrel történő validálását.

## **Anyagok és módszerek**

**Fertőzés:** Vad típusú (VT), GAD67-GFP és Vgat-ires-Cre egerek LH-át (AP: -0,94 mm; ML:  $\pm 1.00$  mm; DV: -5,2 mm és -5,4 mm), valamint STG és VT egerek VB talamuszát (AP: -1,8mm; ML:  $\pm 1,5$ ;mm DV:-3.0 mm) Channelrhodopsin2-t expresszáló (LH) vagy HCN2 csatornát csendesítő shRNS-t (VB talamusz) tartalmazó, valamint kontroll virális vektorral fertőztük.

**In vitro elektrofiziológia:** A fertőzést követően a DRM és VB talamusz relé neuronokból whole-cell patch clamp elvezetésekét végeztünk. A DRM neuronok regisztrálása során a LH-ból érkező axonokat fotostimuláltuk (475 nm; 0,5-0,8 mW; 5 darab 10 ms-os, 20 Hzes fényfelvillanás).

**In vivo elektrofiziológia és juxtacelluláris jelölés:** Annak érdekében, hogy a DRM neuronok aktivitását intakt állatban is megvizsgáljuk, altatott és éber fejrögzített egerekből egysejt elvezetésekét végeztünk. Az altatott mérések során elvezetett sejtek jelölése 2-10 percig tartó 0,5-4 nA 500 ms áram impulzusok segítségével történt. A fotostimuláció 5 darab 10 ms-os, 20 Hz-es fény pulzust tartalmazott.

**EEG regisztrálás és műtéti eljárás:** A STG egerek absence rohamainak detektálása, valamint a Vgat-ires-Cre állatok alvás-ébrenlét ciklusának monitorozásának érdekében a fertőzést követően EEG vizsgálatokat végeztünk. A Vgat-ires-Cre egerek esetében, az EEG jelek regisztrálása alatt a DRM területére érkező LH<sub>Vgat</sub> axonok fotostimuláltuk (5 ms 5 vagy 20 Hz-es fényimpulzusok).

**Immunhisztokémia:** *In vitro* és *in vivo* méréseinket követően a Biocytinnel feltöltött DRM sejteket Cy3- vagy Alexa488- konjugált Streptavidin segítségével tettük láthatóvá. Az *in vitro* elvezetett sejtek neurokémiai identitását szerotonin vagy GABA immunfestéssel határoztuk meg. A HCN2 csatornák expressziójának vizsgálata érdekében HCN2 immunfestést alkalmaztunk.

**Adatértékelés:** Az *in vitro* eredményeket FitMaster, OriginPro 8.5 és IgorPro 8 programokkal analizáltuk. Az *in vivo* kísérletekből nyert adatokat Spike2 program segítségével analizáltuk.

**Statisztikai analízis:** Két csoport nem normál eloszlású adatainak vizsgálatához Wilcoxon tesztet (páros minta), valamint Mann-Whitney U-tesztet (független minta) használtunk. Nem normál eloszlású, több mint két paraméter esetében, három-utas ANOVA tesztet alkalmaztunk. A fluorofórok (anti-HCN2; GFP) intenzitásának korrelációját lineáris regresszióval állapítottuk meg. Az eredményeket  $\leq 0,05$  esetén tekintettük szignifikánsnak.

## Eredmények és megvitatásuk

### LH-DRM projekció funkcionális kapcsolatának vizsgálata

- VT és GAD67-GFP egerek LH fertőzését követően DRM neuronokból *in vitro* whole-cell patch clamp elvezetésekkel végeztünk a lokális agytörzsi ChR2 expresszálo LH axonok szimultán fotostimulációjával. A ChR2-t expresszálo axonok fotostimulációja 7 (10%) DRM neuronon hiperpolarizáló posztszinaptikus potenciálokat (HPP) és 10 (20%) DRN neuronon depolarizáló posztszinaptikus potenciálokat (DPP) váltott ki. Az elvezett sejtek 66%-án (n=34) nem detektáltunk posztszinaptikus potenciálokat.
- Az AMPA/kainát receptor blokkoló, NBQX alkalmazás minden esetben blokkolta a fénystimulus kiváltotta DPP-okat. Kísérleteinkben az NBQX alkalmazása nem tüntette el a HPP-okat, azonban a GABA<sub>A</sub> receptor blokkoló (gabazin) szeletekre mosásával minden alkalommal blokkolni tudtuk a fénystimulus kiváltotta HPP-okat. A GABA<sub>A</sub> receptort mediált IPSP-ok TTX és 4-AP rámosását követően is jól detektálhatóak voltak.
- A LH fotostimulációra EPSP-okkal válaszoló öt általunk immunhisztokémiával vizsgált sejt 5-HT-immunreaktív. Az összes olyan sejt, amely a fotostimulációra IPSP-al válaszolt GABAerg neuron (GABA immunhisztokémia n=5; GAD67-GFP egérből elvezetés n=2).
- A LH fertőzést követően extracelluláris egysejt elvezetést végeztünk altatott egerek DRM neuronjaiból, mialatt az LH ChR2-t expresszálo GABAerg axonjait lokálisan fotostimuláltuk. Méréseink során a DRM területére vetítő LH<sub>Vgat</sub> axonok lokális fotostimulációja gyors aktivitás csökkenést eredményezett a vizsgált DRM neuronok spontán aktivitásában. Az elvezetések során 8 DRM neuront jelöltünk juxtacelluláris technikával, amelyek a DRM-on belüli elhelyezkedésük, morfológiájuk és spontán tüzelési rátájuk  $\geq 6$  Hz alapján vélhetően GABAerg interneuronok.
- Éber, fejrögzített állatokból való elvezetéseink során a regisztrált DRM sejtek 17 %-nál (2/12) fotostimulációt követő aktivitás csökkenést, míg 83%-nál (10/12) emelkedett aktivitást tapasztaltunk. Az aktivitásváltozás látenciája viszonylag lassú (~200 ms), de körülbelül 1 mp-ig emelkedett maradt.
- A alvás-ébrenlét ciklus szakaszait EEG és elektromiogram szimultán regisztrálásával különítettük el. A LH<sub>Vgat</sub> axonok fotostimulációja a DRM területén gyors (<7 mp) ébredést



idézett elő LA állapotból, azonban a PA fázisban történt fotostimuláció nem vezetett állapotváltozáshoz.

*In vitro* elektrofiziológia eredményeink alapján elmondható, hogy a LH-ból érkező ChR2-t expresszáló axonok lokális fotostimulációja bizonyos DRM neuronokban AMPA-/kainát receptor mediált excitatorikus, míg más sejtekben GABA<sub>A</sub> receptor mediált inhibitorikus posztszinaptikus potenciálokat váltott ki és a posztszinaptikus potenciálok polaritása jól korrelál a DRM neuronok neurokémiai identitásával. Farmakológiai vizsgálataink eredményei monoszínaptikus serkentő és gátló kapcsolatokat bizonyítanak. *In vivo* elektrofiziológia eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy az LH→DRN projekciók hatása számottevő, ugyanis a LH fotostimulációja mind altatott, mind pedig éber állatok DRM neuronjainak spontán elektromos aktivitását nagymértékben képes befolyásolni. Kísérleteink során bizonyítottuk, hogy *in vitro* elvezetéseink során az általunk vizsgált összes olyan sejt, amely a LH-ból érkező axonok fotostimulálására IPSP-al válaszolt GABAerg interneuron és a DRM GABA neuronok jelentős részénél az LH axonális fotostimulációja IPSP-t váltott ki. Mindemellett altatott állatokból származó méréseink során a GABAerg LH axonok lokális fotostimulációja gyors aktivitás csökkenést eredményezett feltételezett DRM GABAerg neuronokban. A DRM területére vetítő LH<sub>vgat</sub> projekciók funkcionális vizsgálata során kimutattuk, hogy lokális optogenetikai aktivációjuk ébredést idéz elő LA-ból, azonban PA-ból nem. Eredményeink alátámasztják és kiegészítik korábbi tanulmányok megfigyelését, miszerint az LH<sub>vgat</sub> neuronok jelentős mértékben szabályozzák az alvásból ébrenléti állapotba való átmenetet.

Összességében elmondható, hogy eredményeink egy új ébrenléti moduláló gátló projekciót azonosítanak.

## A HCN2 csatornák és az absence rohamok közötti kapcsolat

- Szabadon mozgó STG egerek EEG aktivitásának vizsgálata során a fertőzést követő 28. és 32. napon szignifikáns csökkenést figyeltünk meg a rohamok teljes idejében és az egyedi rohamok hosszában a HCN2 csendesítést követően. A HCN2 csatornák genetikai csendesítése a rohamok gyakoriságában is csökkenést eredményezett, azonban ez nem volt szignifikáns.
- Az általunk alkalmazott shRNS celluláris, funkcionális hatásának vizsgálata során megfigyeltük, hogy a HCN2 csatorna gént csendesítő shRNS-sel fertőzött TC neuronok nyugalmi membránpotenciálja a kontroll neuronokénál hiperpolarizáltabb volt. Továbbá a hiperpolarizáló áramlépcső hatására megfigyelhető HCN2 csatorna mediált depolarizáció szinte teljes mértékben megszűnt a HCN2 csatorna csendesített sejtekben, míg a kontroll vírussal fertőzött sejtek esetén megfigyelhető volt. Az elvezetett sejtek bemenő ellenállása hasonló volt a két csoport esetében. Azonban a kezdeti és a végpontban mért bemenő ellenállás aránya szignifikánsan nagyobb volt a HCN2 csatorna gént csendesített TC neuronokban, mint a HCN2 csatornát továbbra is kifejező relé neuronokban. A HCN2 csatornák genetikai csendesítése nem volt hatással a TC sejtek akciós potenciáljainak tulajdonságaira.
- A HCN2 immunfestés sejtenkénti intenzitását korreláltatva a GFP jel sejtenkénti intenzitásával, megállapítottuk, hogy a csendesítő shRNS-el fertőzött metszetek esetében negatív korreláció figyelhető meg a két jel intenzitása között. Továbbá a GFP pozitív, shRNS-sel fertőzött TC neuronok anti-HCN2 immunreakciója jelentősen kisebb volt, mint a kontroll shRNS-el fertőzött TC sejtek esetén. A kérgi HCN2 expresszió erőteljes maradt.

Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a TC neuronok HCN2 csatornái jelentős mértékben befolyásolják az absence roham alatt megfigyelhető SWD-ok megjelenését és hosszát. *In vitro* elektrofiziológiai kísérleti eredményeink azt bizonyítják, hogy az általunk alkalmazott genetikai csendesítés szelektív hatást gyakorol a TC sejtek HCN2 csatornáinak funkciójára, egyéb neuronális működést nem befolyásol. Továbbá, immunhisztokémia vizsgálataink eredményei alátámasztják, hogy a HCN2 csatornát csendesítő shRNS-t tartalmazó virális vektor kizárólag a VB talamusz sejtjeiben csökkentette a HCN2 csatornák expresszióját, így lehetővé téve a csatornadefektus régió specifikus vizsgálatát.

## Értekezés alapjául szolgáló közlemények

Gazea M\*, **Furdan S\***, Sere P, Oetsch L, Molnár B, Di Giovanni G, Fenno L, Ramakrishnan C, Mattis J, Deisseroth K, Dymecki S, Adamantidis A, Lorincz ML (2021) Reciprocal lateral hypothalamic and raphé GABAergic projections promote wakefulness. *J Neurosci*; DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2850-20.2021>

IF: 5,673

David F\*, Carcak N\*, **Furdan S**, Onat F, Gould T, Meszaros A, Di Giovanni G, Hernandez VM, Chan CS, Lorincz ML, Crunelli V (2018) Suppression of Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Channel Function in Thalamocortical Neurons Prevents Genetically Determined and Pharmacologically Induced Absence Seizures. *J Neurosci*; 38:6615-6627.

IF: 6,074

## **Egyéb közlemények**

Csajbok EA, Kocsis AK, Farago N, **Furdan S**, Kovacs B, Lovas S, Molnar G, Liko I, Zvara A, Puskas LG, Patocs A, Tamas G (2019) Expression of GLP-1 receptors in insulin-containing interneurons of rat cerebral cortex. *Diabetologia*; 62:717-725.

IF: 7,518

Borbely E, Horvath J, **Furdan S**, Bozso Z, Penke B, Fulop L (2014) Simultaneous changes of spatial memory and spine density after intrahippocampal administration of fibrillar abeta1-42 to the rat brain. *Biomed Res Int*; 2014:345305.

IF: 1,579

Összesített IF: 20,844

