B 3679

Ösztradiol által kiváltott szinaptikus átrendeződés mechanizmusának vizsgálata patkány nucleus arcuatus-ban

Hoyk Zsófia

Szegedi Tudományegyetem Természettudományi Kar

neurobiológia doktori program

Témavezetők: **Dr. Dionysia Theodosis**

Neurobiologie Morphofonctionnelle

INSERM U.378

Institut François Magendie, Bordeaux

Dr. Párducz Árpád

Molekuláris Neurobiológiai Csoport

MTA SZBK, Biofizikai Intézet, Szeged

SZEGED, 2000

BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A külső és belső környezetből érkező változatos fizikai és kémiai jeleket - fényt, hangot, hőmérsékletet, izmok összehúzódását és elernyedését, szagokat, ízeket, hormonokat, ingerületátvivő anyagokat - a gerincesek idegrendszerét alkotó több millió neuron érzékeli, feldolgozza és reagál rá. Ennek alapfeltétele az idegrendszer magasfokú szervezettsége, a rugalmas alkalmazkodásra képes kapcsolat a különböző funkciójú struktúrák között, melyet a sejtek közti szabályozott kommunikáció biztosít.

Az embrionális fejlődés során kialakuló idegsejt hálózat tehát nem merev szerkezet, hanem az egész élet folyamán a környezeti hatásoknak megfelelően változó rendszer. Ez a szerkezeti átrendeződésre való képesség a neuronális plaszticitás. A finomszerkezeti változások az idegrendszert alkotó neuronok és gliasejtek morfológiai átalakulásában nyilvánulnak meg: eltérő lehet pl. az idegsejtek nyúlványainak kiterjedése, a dendrittüskék száma, a glia alakja, mindennek következtében a neuronok és gliasejtek közti érintkező felület mérete és jellege. Mindez alapvetően befolyásolja a szinaptikus hálózat szerveződését, mely a működés szempontjából a sejtek közti kommunikációt érinti, azaz az információ terjedése is módosulhat.

Az embrionális fejlődés során nem meglepő, hogy az idegsejtek közti kapcsolatok folyamatosan változnak, hiszen ebben az időszakban alakulnak ki az idegpályák, a főbb működési egységek, tehát a növekvő axonok termináljai ekkor találják meg célsejtjeiket. Érdekes módon azonban az embrió idegrendszerére általánosan jellemző folyamatok nem tűnnek el teljesen az egyedfejlődés során: a felnőtt idegrendszernek bizonyos kitüntetett területein kimutattak olyan, korábban kizárólag az embrióra specifikusnak tartott jellegzetességeket, mint a sejtosztódást és vándorlást, a radiális glia jelenlétét, a sejtek felszínén pedig egy különleges glikoprotein, a hosszú polisziálsavat (PSA) hordozó neuronális sejtadhéziós molekula expresszióját. A molekula legjellemzőbb része az élővilágban igen ritkán előforduló α2,8-as kötéssel kapcsolódó N-acetil-neuraminsav egységekből felépülő polisziálsav, mely a PSA-NCAM molekula össztömegének 30 %-át teszi ki. Ugyanakkor a felnőtt idegrendszerre általánosan jellemző neuronális sejtadhéziós molekula fehérje részén jóval rövidebb a PSA lánc, a molekula tömegének mindössze 10 %-át képezi. Ez a PSA láncot érintő különbség rendkívül lényeges módon befolyásolja a molekula tulajdonságait: a felnőtt NCAM a stabil kapcsolatok kialakulását teszi lehetővé,

hatékonyan egymáshoz tapasztja a sejteket. Ezzel szemben a korábban csak embrióra specifikusnak tartott PSA-NCAM molekulát a hosszú PSA-nak köszönhetően negatív töltés és nagy térkitöltés jellemzi. Ebből következően a sejt-sejt kapcsolatok erőssége gyengül, vagyis a plazmamembránjukon PSA-NCAM molekulát expresszáló sejtek könnyedén elmozdulhatnak egymáson.

A sejtfelszíni molekulák szerepe a neuronális plaszticitás mechanizmusa szempontjából különösen lényegesnek tűnik, mivel a szinaptikus átrendeződés egyben membrán-membrán kapcsolatok átalakulását is jelenti, továbbá figyelemre méltó a korreláció az idegrendszer különböző területeinek plaszticitásra való képessége és a hosszú polisziálsavval jellemezhető neuronális sejtadhéziós molekula előfordulása között.

Kísérleteink a plasztikus változások lezajlásának módjára, ezen belül a nagy polisziálsav tartalmú neuronális sejtadhéziós molekula funkciójának megértésére irányultak. Ezt a célt szem előtt tartva egy olyan modell rendszert kerestünk, mely megfelel a következő kritériumoknak: egyrészt expresszálódik benne az említett neuronális sejtadhéziós molekula, másrészt fiziológiás körülmények között plasztikus átrendeződés jellemzi, és ez az átalakulás kísérletes, kontrollált körülmények között megbízhatóan reprodukálható. Ennek alapján a hipotalamuszban található nucleus arcuatus-t választottuk modellül, mert ezen a területen a neuronális sejtadhéziós molekulának az embrióra általánosan jellemző formája felnőtt állatban is jelen van, ugyanakkor érvényesül a másik kritérium is: fiziológiás körülmények között az ösztradiol koncentráció függvényében ciklikusan változik az axo-szomatikus szinapszisok száma, mely kísérletesen is előidézhető, ha ovariektomizált nőstény patkányokat ösztradiollal kezelünk. A disszertációban összefoglalt valamennyi kísérletünket ezen a jól kézben tartható modell rendszeren végeztük.

Annak érdekében, hogy a neuronális plaszticitás egy lehetséges mechanizmusának finomszerkezeti és működésbeli vonatkozásait feltárjuk a rendelkezésünkre álló morfológiai és elektrofiziológiai módszerek segítségével, a dolgozatban ismertetett kísérletek elé a következő célokat tűztük ki:

1. megvizsgálni, hogy az ösztradiol hatására lejátszódó szinaptikus átrendeződést milyen membránszintű változások kísérik
2. kideríteni, hogy a hosszú polisziálsav láncot hordozó neuronális sejtadhéziós molekula milyen szerepet tölt be az axo-szomatikus szinapszis szám változásban:
   a) milyen következményekkel jár a polisziálsav enzimatikus úton való eltávolítása

b) mi történik, ha a polisziálsavhoz egy specifikus antitestet kapcsolva befolyásoljuk a sejtek közti adhéziót

3. megállapítani, hogy az ösztradiol által indukált szinapszis szám változás csak az axo-szomatikus szinapszisokat érinti-e, vagy az axo-dendritikus szinapszisok is részt vesznek-e a folyamatban
4. kimutatni, hogy a szinapszisok szintjén végbemenő átrendeződések hogyan befolyásolják az idegsejtek működését

EREDMÉNYEK

I. Az exo-endocitótikus aktivitás változása

A 17 ösztradiol indukált plaszticitás részletes elemzéséhez a finomszerkezet vizsgálata jelentette a kiinduló pontot. Az elektronmikroszkóphoz kapcsolt képanalizáló rendszer segítségével meghatároztuk a GABAerg és nem GABAerg axo-szomatikus szinapszisok számát a neuronális sejttest membránjának 1000 m-ére vonatkoztatva. 24 órával az ösztradiol kezelés után a GABA immunpozitív axo-szomatikus szinapszisok előfordulási gyakorisága csökkent, míg a nem GABAerg szinapszisok száma nem változott szignifikánsan.

A nucleus arcuatus neuronjainak perikarionjában számos tüskés vezikula volt megfigyelhető. Ezek közül a kvantitatív analízishez csak azokat vettük számításba, melyek a sejtet határoló membrántól maximum 500 nm távolságra helyezkedtek el. Külön figyelmet fordítottunk a membránnal éppen fúzionáló tüskés vezikulákra, mivel ezek számából a sejt exo-endocitótikus aktivitására lehet következtetni. Ezek a lefűződések ugyanolyan gyakorisággal fordultak elő az asztrocita nyúlványokkal szemközti membrán területeken, mint a posztszinaptikus denzitásoknál. Az ösztradiol kezelés hatására az exo-endocitótikus aktivitásra utaló lefűződések 1000 m membránra vonatkoztatott száma megközelítőleg a hormon injekció előtti érték kétszeresére nőtt. A vezikulák sűrűsége az ösztradiol hatására szintén növekedett, bár a különbség nem volt szignifikáns.

Arra a következtetésre jutottunk, hogy ezek a morfológiai változások olyan ösztradiol indukált változásokat jeleznek, melyek a neuronális membrán alkotórészeinek transzportját és/vagy újratermelődését érintik. Mivel a nucleus arcuatus azon idegrendszeri területek közé tartozik, ahol a PSA-NCAM termelődése az egész élet során fennmarad, nem zárhattuk ki azt a lehetőséget, hogy a

megnövekedett exo-endocitótikus aktivitásban részt vevő molekulák között a neuronális sejtadhéziós molekula embrionális formája is megtalálható. Figyelmünket ezért a PSA-NCAM felé fordítottuk, hogy megvizsgáljuk, milyen szerepet játszik a molekula a nucleus arcuatus szinaptikus kapcsolatainak átszerveződésében.

II. A PSA-NCAM szerepe a neuronális plaszticitásban

A PSA-NCAM, illetve a molekula legfontosabb részének, a polisziálsavnak (PSA) a funkcióját kétféle kísérleti megközelítéssel tanulmányoztuk. Egyrészt egy, a PSA láncot specifikusan hasító, de az NCAM fehérje vázát érintetlenül hagyó enzim, az endoneuraminidáz (endo-N) nucleus arcuatus fölé történő egyszeri injektálásával eltávolítottuk a PSA-t. Másrészt egy miniozmotikus pumpa segítségével öt napon keresztül egy, az α2,8-as kötéseket specifikusan felismerő egér monoklonális IgM antitestet juttattunk az oldalkamrába. Mindkét eljárást 17β-ösztradiol injektálás követte. A PSA lánc megbolygatásának hatékonyságát fénymikroszkópos PSA-NCAM immunhisztokémiai reakcióval ellenőriztük. A nucleus arcuatus fölé történő egyszeri endo-N injekció sikeresen eltávolította a hosszú polisziálsav láncot, mivel az injektálás oldalán nem volt festődés, a kontralaterális oldalon viszont a kontroll állapotra jellemző PSA-NCAM immunreakció volt megfigyelhető: a neuropil diffúz, pontszerű, erős jelet mutatott, maguk a sejttestek pedig fehéren rajzolódtak ki, nem jelölődtek.

A miniozmotikus pumpából a nucleus arcuatus-ba diffundált PSA-t felismerő antitest jelenlétét olyan módosított immunfestéssel mutattuk ki, ahol a primer antitestet kihagytuk a reakcióból. A normál PSA-NCAM immunreakcióval összevethető, bár kevésbé specifikus és gyengébb festődést tapasztaltunk, míg a kontroll, csak mesterséges agy-gerincvelői folyadékot kapott állat esetében nem kaptunk immunhisztokémiai jelet.

Annak érdekében, hogy megállapítsuk az ösztradiolnak az axo-szomatikus szinapszisok denzitására kifejtett hatását, mindkét kísérleti megközelítés esetében beágyazást követő GABA immunhisztokémiai reakciót végeztünk ultravékony metszeteken, majd a szinapszisok sűrűségét az ún. diszektor módszerrel határoztuk meg. Kimutattuk, hogy az ösztradiol kezelést követő jellegzetes, a GABAerg axo-szomatikus szinapszisokat érintő számbeli csökkenés csak akkor következett be, ha a PSA-NCAM molekula érintetlen volt. Amennyiben a PSA-NCAM valamilyen

módosítást szenvedett, legyen az az anti-PSA adszorpciója vagy a PSA endo-N-nel történő hasítása, az ösztradiol nem volt képes a jól ismert szinaptikus átrendeződést indukálni a nucleus arcuatus-ban.

III. A 17β-ösztradiol axo-dendritikus szinapszisokra gyakorolt hatása

Az axo-szomatikus szinapszisok részletes elemzése után az kezdett el foglalkoztatni bennünket, hogy a másik típusú neuronális bemenet, azaz az axo-dendritikus szinapszisok is reagálnak-e az ösztradiol kezelésre. Az axo-szomatikus szinapszisokhoz képest figyelemre méltó különbséget találtunk: érdekes módon itt a nem GABAerg szinapszisok száma változott, mégpedig eltérő képpen reagáltak a dendrittörzsön és a dendrittüskén található végződések. A dendrittüske szinapszisokat önállóan elemezve látványos növekedés volt megfigyelhető a nem GABAerg axo-dendritikus szinapszisok sűrűségében 17β-ösztradiol adását követöen. A GABAerg tüskeszinapszisok nem mutattak szignifikáns változást. Az összesített nem GABAerg axo-dendritikus szinapszisok száma ugyan némiképp megnövekedett a hormonkezelés hatására, de ez a változás statisztikailag nem volt szignifikáns. A GABAerg axo-dendritikus szinapszisok egészét tekintve pedig még ez az enyhe növekedési tendencia is alig figyelhető meg. Az axo-dendritikus szinapszisok összességéről tehát elmondható, hogy a nem GABAerg tüskeszinapszisok számának változása beleolvadt a jóval nagyobb arányban jelenlévő és az ösztradiolra nem reagáló dendrittörzsön elhelyezkedő szinapszisok adataiba. Ez azonban nem jelenti azt, hogy a plaszticitás szempontjából leginkább fogékony tüskeszinapszisok átrendeződése elhanyagolható lenne.

IV. Az ösztradiol indukált szinaptikus változások funkcionális következményei

Ezek a morfológiai eredmények felvetették azt a kérdést, hogy vajon a dendrittüskén levő serkentő bemenetek számának növekedése és az idegsejtek szómájára irányuló gátlás csökkenése ugyanazon neuron populációt érinti-e, mely az elektromos aktivitás fokozódásához teremtene kedvező feltételeket. A probléma megválaszolása érdekében elektrofiziológiai vizsgálatokat végeztünk a JATE Összehasonlító Élettani Tanszékével kollaborációban.

A nucleus arcuatus idegsejtjei kontroll, ösztradiol mentes állapotban viszonylag mérsékelt spontán aktivitást mutattak: egyenletes, nagyobb ingadozásoktól

mentes tüzelési mintázat volt megfigyelhető mintegy 25-30 percen keresztül. Ez a nyugodt működési mód drámaian megváltozott 17β-ösztradiol hatására. 25 perccel a hormon i.p. injektálása után az idegsejtek tüzelési aktivitása a kontroll értéknek megközelítöleg négyszeresére növekedett. Ez alátámasztja a morfológiai módszerekkel kimutatott finomszerkezeti átrendeződést, mely szerint a nucleus arcuatus neuronjainak egyrészt csökken a sejttestre irányuló gátló afferentációja, másrészt a tüskeszinapszisokon keresztül a serkentő bemenet fokozódik ösztradiol kezelést követöen.

Mivel az ösztradiolnak meghatározó szerepe van a nemi különbségeket mutató magatartási és neuroendokrin reakciókban, megvizsgáltuk, hogy hogyan befolyásolja a nucleus arcuatus neuronjainak aktivitását két eltérő érző ingerület ösztradiol injekció előtt és után. Az egyik érző bemenet a járulékos szaglógumóból származott. Ennek ingerlése az arcuatus idegsejteinek elektromos aktivitását csökkentette, míg a másik módosító tényező, a bajuszpárna ingerlése fokozta ugyanezen neuronok tüzelési aktivitását. Meglepő módon sem a szagló, sem a trigeminális rendszer ingerlésének hatását nem befolyásolta a 17β-ösztradiol jelenléte.

AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

1. A 17β-ösztradiol hatása a patkány nucleus arcuatus-ban 25 perccel a kezelést követően már detektálható.
2. Egyszeri 17β-ösztradiol i.p. injekciót követően a nucleus arcuatus idegsejtjeinek membránjában szignifikánsan nagyobb számban jelennek meg vezikula lefűződések és a tüskés vezikulák száma is hasonló módon változik.
3. A 17β-ösztradiol csak PSA-NCAM jelenlétében képes indukálni a GABAerg axo-szomatikus szinapszisok visszahúzódását.
4. Az axo-szomatikus szinaptikus változással párhuzamosan a nem GABAerg axo-dendritikus tüskeszinapszisok száma 17β-ösztradiol hatására megnő.
5. A PSA-NCAM normál expressziója esetén a 17β-ösztradiol által kiváltott szinaptikus átrendeződések funkcionálisan a neuronok fokozott tüzelési aktivitásában nyilvánulnak meg.
6. A trigeminális illetve szaglórendszerből a nucleus arcuatus-ba érkező afferentáció az ösztradioltól függetlenül befolyásolja a neuronok tüzelési mintázatát.

Kísérleteink alátámasztják azt a feltételezést, mely szerint az ösztradiol indukált szinaptikus plaszticitásban részt vesznek a membránt alkotó molekulák. A szinaptikus átrendeződéseket az exo-endocitótikus aktivitás nagyfokú növekedése kíséri. A folyamatban valószínűleg érintett sejtfelszíni molekulák közé sorolhatjuk a PSA-NCAM-et, mely permisszív faktorként vesz részt a neuroplasztikus változásokban: jelenléte előfeltétel ahhoz, hogy az induktív tényezők, mint amilyen pl. az ösztradiol, hatása megnyilvánulhasson, de a PSA-NCAM önmagában nem vált ki szerkezeti átrendeződéseket. Az ösztradiol kezelést követően mind az axo-szomatikus, mind az axo-dendritikus szinapszisok átalakulnak. A szinaptikus kapcsolatok összehangolt változása a nucleus arcuatus idegsejteinek spontán aktivitását növeli, mely azonban nem változtatja meg ugyanezen sejtek szomatoszenzoros vagy szaglórendszer felől érkező ingerlésének hatását. Mindennek alapján az ösztradiol hatása specifikusan csak a hormonális szabályozásban részt vevő idegi kapcsolatokat érinti.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ SAJÁT KÖZLEMÉNYEK ÉS ELŐADÁSOK

I. Közlemények

Párducz, Á., Szilágyi, T., Hoyk, S., Naftolin F & Garcia-Segura, L.M.: Neuroplastic changes in the hypothalamic arcuate nucleus: the estradiol effect is accompanied by increased exoendocytotic activity of neuronal membranes.
Cellular and Molecular Neurobiology, 16: 259-269 (1996)

Kis, Zs., Horváth, Sz., Hoyk, Zs., Toldi, J. & Párducz, Á.: Estrogen effects on arcuate neurons in rat. An in situ electrophysiological study.
Neuroreport, 10: 3649-3652 (1999)

Hoyk, Zs., Párducz, Á. & Theodosis, D.T.: The highly sialylated isoform of the neural cell adhesion molecule is required for estradiol-induced morphological synaptic plasticity in the adult arcuate nucleus.
European Journal of Neuroscience, közlésre benyújtva.

II. Előadások

Hoyk, Zs., Párducz, Á., Poulain, D.A. & Theodosis, D.T.: Transient neuronal and glial expression of the polysialylated isoform of the neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM) following stab wounds to the adult brain.
2nd Meeting of European Neuroscience, (1996) Strasbourg, France

Hoyk, Zs., Párducz, Á., Garcia-Segura, L.M. & Theodosis, D.T.: The role of PSA-NCAM in estradiol-induced structural synaptic plasticity in the adult arcuate nucleus.
Polysialic acid; Biochemistry, Cell biology and Diseases, (1998) Ile des Embiez, France

Hoyk, Zs., Párducz, Á. & Garcia-Segura, L.M.: Nemi különbségek kialakulása a nucleus arcuatus szinaptikus kapcsolataiban.
Magyar Idegtudományi Társaság V. konferenciája, (1998) Debrecen

Párducz, Á., Hoyk, Zs. & Theodosis, D.T.: A PSA-NCAM szerepe az ösztradiol által kiváltott plasztikus változásokban.
Magyar Idegtudományi Társaság V. konferenciája, (1998) Debrecen

Párducz, Á & Hoyk, Zs.: A nemi hormonok és az idegrendszeri plaszticitás: lehetséges sejt- és molekuláris szintű mechanizmusok.
Straub-napok, (1999) Szeged

Hoyk, Zs. & Párducz, Á.: A PSA-NCAM szerepe a hypothalamus plasztikus folyamataiban.
Straub-napok, (1999) Szeged

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ NEM KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK ÉS ELŐADÁSOK

I. Közlemények

Hoyk, Zs., Lago-Schaaf, T. Zippel H.P. Füzesi, G. & Halász, N.: Fast regeneration of the olfactory nerve in goldfish: fine structure and behaviour.
Journal für Hirnforschung, 34: 461-465 (1993)

Hoyk, Zs., Szilágyi, T. & Halász, N.: Modulation by thyroid hormones of the development of external plexiform layer in the rat olfactory bulb.
Neurobiology, 4: 45-57 (1996)

II. Előadások

Halász, N. & **Hoyk, Zs.**: Pajzsmirigy-hormonszint és idegi szerveződés: kísérleti rendszerünk, problémáink és első eredményeink a patkány szaglórendszerén.
A Magyar Anatómusok, Hisztológusok és Embriológusok Társaságának 7. kongresszusa, (1991) Szeged

Hoyk, Zs., Vecsernyés, M. & Halász, N.: Effect of thyroid hormones on the development of the rat olfactory bulb: a morphometric study.
Xth Congress of ECRO, (1992) Munich, Germany

Lago-Schaaf, T., Hoyk, Zs., Zippel, H.P., Füzesi, G. & Halász, N.: Fast behavioral and morphological regeneration in the olfactory bulb of the goldfish, Carassius auratus L.
Xth Congress of ECRO, (1992) Munich, Germany

Hoyk, Zs., Vecsernyés, M. & Halász, N.: Hypo- and hyperthyroidism causes changes in the olfactory bulb morphology but not in the expression of microtubule-associated protein 2.
16th Annual Meeting of the European Neuroscience Association, (1993) Madrid, Spain

Hoyk, Zs., Krizbai, I., Varga, Cs., Péterfi, Z. & Párducz, Á.: GAP-43 expresszió hormonális regulációja bulbus olfactoriusban.
IBRO-MITT Millenniumi Konferencia, (2000) Budapest