

A szerotonerg neuromoduláció mechanizmusai a szaglókéregben

Doktori értekezés tézisei

Piszár Ildikó

Témavezető:

Dr. Lőrincz László Magor

egyetemi docens

Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem



Szeged

2023

A szerotonerg neuromoduláció

Az agytörzsi raphé magokban (RM) található szerotonerg neuronok axonjai közel az egész előagy területét behálózzák és axonterminálisaikból szerotonint (5-hidroxi-triptamin, 5-HT) szabadítanak fel. Az 5-HT egy fontos monoaminerg neuromodulátor, amely számos fiziológias működésben játszik fontos szerepet, beleértve a szenzoros és motoros válaszok, az alvás-ébrenlét ciklus, tanulás és jutalomfeldolgozási folyamatok és a szociális viselkedés szabályozását. Diszfunkciója olyan súlyos neurológiai és pszichiátriai rendellenességekhez vezethet, mint az epilepszia, vagy a depresszió.

A szerotonerg rendszer strukturális és funkcionális sajátosságaiból adódóan, a szenzoros információfeldolgozás különböző állomásain – a halló-, látó- és szomatoszenzoros rendszer perifériás és centrális stációjában – is képes a szenzoros funkciók szabályozására, de ennek sejtes és hálózati mechanizmusai és szerepei a szaglórendszerben kevésbé tisztázottak.

Az agytörzsi dorzális raphé mag (DRM) szerotonerg neuronjainak aktivitása számos szenzoros eseménnyel mutat összefüggést, ezek a neuronok szagingerekre gyors, tranziens változásokkal reagálnak. Ismert, hogy a szerotonin a szaglókérgi neuronok spontán aktivitását csökkenti, de a szenzoros ingerek által kiváltottat nem befolyásolja,

ami által fontos szerepet játszhat a szaglókérgi információfeldolgozás finomhangolásában.

A szaglórendszer

Az illatanyagban található szagmolekulákat az orrüreg szaglóhámjában lévő szaglóreceptorok érzékelik (kb. 300 szagreceptor típust különböztetnek meg emberben és 1000-et rágcsálókban). Az itt található szagló-receptor sejtekre az "egy sejt - egy receptor" jelenség jellemző, azaz minden individuális sejt egy adott típusú szaglóreceptor fehérjét fejez ki. A szaglóhámban szétszórtan elhelyezkedő, de ugyanazt a szaginformációt érzékelő receptorneuronok axonjai egyesülve a szaglógumó (OB) felszínén lévő glomerulusokban végződnek, ahol minden egyes glomerulus az azonos receptorfehérjét expresszáló szaglóneuronoktól kap bemenetet (ez az úgynevezett "glomeruláris konvergencia szabály"). Az OB egy extratalamikus reléállomás, a szaglópálya első átkapcsolóhelye, ingerületfeldolgozó állomása. A glomerulusok jól elkülönülő szinaptikus egységekként egy rendezett térbeli térképet hoznak létre az OB felületén. A szaginformációt az itt található fő projekciós neuronok, a mitrális (MS) és az ecsetsejtek (ES) laterális szaglóköteget (LOT) alkotó axonjai továbbítják az elsődleges szaglókéreg felé és más, magasabb asszociációs területek különböző régióiba, beleértve az amygdalát, a hipotalamuszt és az orbitofrontális kérget. Az elsődleges szaglókéreg, más néven piriform kéreg (PC) egy

filogenetikailag ősi, három sejtrétegű struktúra, a kérgi szenzoros feldolgozás jó modellje. Két, térben és farmakológiailag jól elkülönülő bemenetei az előreccsatoló, afferens (LOT) és a visszacsatoló vagy intrakortikális bemenetek. A az OB-ból érkező LOT terminálisai a PC principális (piramis és szemilunáris) sejteinek disztális dendritjeivel és az 1.a rétegi interneuronokkal lépnek kapcsolatba, míg a más szaglókérgi területekről, orbitofrontális kéregből, amygdalából és az entorhinális kéregből érkező axonok proximálisabban, az 1.b, 2. és 3. rétegben lévő neuronokra adnak szinaptikus bemenetet.

Az érzékszervi reprezentáción kívül, a szaglórendszernek fontos szerepe van olyan, szociális interakciók szempontjából fontos affektív funkciók szabályozásában is, mint a hangulat és a maternális viselkedés. Érdekes, hogy számos neuropszichiátriai megbetegedést a szaglószeri funkciók károsodása és az OB csökkent térfogata kíséri. A depresszió és a szaglórendszer kapcsolata különösen szorosnak mutatkozik.

Mivel a szerotonerg rostok majdnem minden olfaktorikus agyterületre projektálnak, az OB-t és a PC-t is beleértve, az 5-HT fontos szerepet játszhat a szaginformáció feldolgozásban és a szenzoros folyamatok modulációján keresztül magasabb agyi funkciók szabályozásában. Számos tanulmány vizsgálta a szerotonerg rendszer szenzoros információfeldolgozásban betöltött szerepét és annak érzékszervi bemenetekre gyakorolt komplex moduláló hatásait a

szaglórendszerben, ezek azonban gyakran ellentétes eredményeket eredményeztek.

Az egyik ilyen tanulmányban a DRM szerotonerg neuronjainak specifikus fotostimulációjának hatására a szaglókérgi neuronok spontán aktivitása csökkent, míg szagingerekre adott válasza változatlan maradt, illetve a sejtek egy része aktivitás fokozódással válaszolt. Egy másik tanulmányban a szaglókérgi neuronok szagok által kiváltott aktivitása csökkent, spontán aktivitásuk viszont változatlan maradt, az 5-HT neuronok hasonló manipulációja során.

Az ellentétes eredmények az alkalmazott különböző technikákból is adódhatnak. Az utóbbi kísérletsorozatban a szaglókérgi principális neuronok populációs Ca^{2+} dinamikáját mérték fotometriás módszerrel éber egerekben, míg az előző tanulmányban extracelluláris egysejt akciós potenciál elvezetéseket végeztek alvó egerekben *in vivo*.

Munkánk során ennek a kettős szerotonerg-hatás mechanizmusainak tisztázása érdekében *in vitro* és *in vivo* elektrofiziológiai, optogenetikai, farmakológiai és immunhisztokémiai kísérleteket kombináltunk.

CÉLKITŰZÉSEK

Doktori munkám célja a szerotonerg hatások celluláris és hálózati mechanizmusainak, és azok szerepének tisztázása az elsődleges szaglókéregben. A kísérletek eredményei jelentősek lehetnek mind a központi szenzoros információfeldolgozás, mind pedig a neuromoduláció tekintetében.

Részletes célkitűzéseink a következők voltak:

1. A szerotonin sejtszintű hatásainak feltárása az elsődleges szaglókéreg principális sejtjeiben
2. A szerotonin sejtszintű hatásainak feltárása az elsődleges szaglókéreg különböző típusú interneuronjaiban
3. A szerotonin hatásának vizsgálata az afferens és az intrakortikális szinaptikus bemenetekre az anterior piriform kéregben (aPC)
4. Az agykérgi szerotonerg neuromodulációban résztvevő receptorok feltárása
5. Annak kiderítése, hogy a korábban, a szerotonerg neuronok stimulációja során megfigyelt kérgi hatások helyi 5-HT felszabulás közvetlen következményei-e az aPC-ben, vagy a szaglórendszer más állomásain, pl. az OB-ban bekövetkező neuromoduláció közvetett hatásainak eredményei

Vírusfertőzés/műtét

Felnőtt hím, heterozigóta SERT-cre egerek DRM-jába sztereotaxiás injekciójával cre-dependens adenoasszociált víruskonstruktot (0.5-1 µl AAV2/1-Flex-ChR2-YFP (AV1-20298P, Pennsylvania Egyetem, 1013 GC/mL) jutattunk, amelynek hatására a DRM szerotonerg neuronjai és azok axonjai az aPC-ben prominensen expresszálták a fényérzékeny kationcsatornát, channelrhodopsint (ChR2), lehetővé téve így azok szelektív fotostimulációját, illetve a szerotonin specifikus és gyors leadását. A DRM vírusfertőzés koordinátái a következők voltak: anteroposterior irányban (AP), -4.7 mm; dorzoventrálisan (DV), 3.1-3.6 mm. A vírusfertőzést követően minimum egy hónap elteltével, a megfelelő ChR2 expresszió elérése után az egereket elektrofiziológiai kísérleteknek vetettük alá.

Szeletpreparátumok készítése elektrofiziológiai vizsgálatokhoz

8-16 héttel a vírusfertőzés után *in vitro* elektrofiziológiai regisztráció céljából az elsődleges szaglókérget tartalmazó túlélő agyszelet preparátumokat készítettünk. Az egereket ketamin és xylazin elegy keverékével altattuk (80 és 10 mg/ttkg), majd a következő oldattal perfundáltuk őket a szíven keresztül: 93 mM NMDG, 2.5 mM KCl, 1.2 mM NaH₂PO₄, 30 mM NaHCO₃, 20 mM HEPES, 25 mM glükóz, 5 mM N-acetil-L-cisztein 5 mM Na-aszkorbát, 3 mM Na-piruvát, 10

mM MgSO₄, és 0.5 mM CaCl₂. Ugyanezt az oldatot használtuk az aPC-t tartalmazó 320 µm-es koronális szeletek készítéséhez 4°C-on, valamint a kezdeti tárolásához 32°C - 34°C-on 12 percig, majd a szeleteket a következő oldatban inkubáltuk: 30 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.2 mM NaH₂PO₄, 1.3 mM NaHCO₃, 20 mM HEPES, 25 mM glükóz, 5 mM N-acetil-L-cisztein, 5 mM Na-aszkorbát, 3 mM Na-piruvát, 3 mM CaCl₂, és 1.5 mM MgSO₄.

***In vitro* elektrofiziológia**

Az elektrofiziológiai elvezetésekhez a szeleteket 34° C-os kamrába helyeztük, amelyen keresztül folyamatosan oxigenáltatott (95% O₂, 5% CO₂) mesterséges agy-gerincvelői (cerebrospinális) folyadékot (MCSF) áramoltattunk át. Az elvezetéshez használt oldat összetétele a következő volt: 130 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 1 mM KH₂PO₄, 24 mM NaHCO₃, 1.5 mM MgSO₄, 3 mM CaCl₂, és 10 mM glükóz. Az elektrofiziológiai elvezetéseket whole-cell patch-clamp technikával végeztük, a kísérletektől függően áramzár (current-clamp) illetve feszültségzár (voltage-clamp) üzemmódban. A neuronokat infravörös differenciál interferencia kontraszt (DIC) videomikroszkópia segítségével, Olympus BX51WI mikroszkóppal (Tokyo, Japan) tettük láthatóvá. A membránpotenciálok és áramok rögzítése Multiclamp 700B erősítővel történt (Molecular Devices, USA). A mikropipettákat (4-6MΩ) a következő intracelluláris oldattal töltöttük meg (pH 7,25; 275mOsm): 126 mM K-glukonát, 4 mM KCl, 4 mM ATP-Mg,

0.3 mM GTP-Na₂, 10 mM HEPES, 10 mM kreatin-foszfát és 8 mM Biocytin.

A szeletkísérletek egy részében a laterális szaglóköteg illetve a második rétegi neuronok (L₂) elektromos ingerlésével kiváltott populációs serkentő posztszinaptikus potenciálokat (pEPSP) regisztráltunk. Ehhez, két koncentrikus bipoláris stimuláló elektródát (FHC, Németország) használtunk, melyek egyikét az LOT területére, a másikat pedig az L₂ sejtrétegbe helyeztük, majd legvégül a MCSF-et tartalmazó elvezető elektródát (4 MΩ) az L₂ fölött elhelyezkedő rétegbe pozícionáltuk.

Az ingerlés rövid (0,1 ms) áramimpulzusokból (10-100 μA) állt. Az afferens és az intrakortikális bemenetek stimulációja 0,5 másodperc késéssel történt.

A mérések során serkentő mezőpotenciálokat (fEPSP), serkentő posztszinaptikus áramokat (EPSC) és pEPSP-ket regisztráltunk a stabil alapvonal kialakulásig, majd szerotonint mostunk a szeletekre az elvezető kamrában.

A szeletkísérletek második felében whole-cell patch-clamp technikával tanulmányoztuk a szerotonin különböző sejtekre gyakorolt hatását.

A kísérletek egy részében a szerotonint lokálisan a sejttest közelébe (kb. 40-60 μm távolságra attól) injektálva vizsgáltuk annak hatását a szaglókérgi sejtek aktivitására. Az 5-HT-t (100 μM, MCSF-ben oldott) egy üveg mikrokapilláris segítségével jutattuk a regisztrált sejt

szómájának közelébe, a Picospritzer III (Parker Hannifin, USA) műszer segítségével, 2 s hosszú (~200 mbar) impulzust alkalmazva. Az optogenetikai kísérletek során az elvezetéseket a helyi ChR2-expresszálo 5-HT rostok szimultán fotostimulációjával végeztük. A fényingerlés a mikroszkóp objektívjén keresztül, 470 nm-es epifluoreszcens megvilágítással, LED fényforráson keresztül történt (Thorlabs, Németország) (ingerszélesség: 10 ms; ingerlési frekvencia: 10 Hz; ingerlési időtartam: 3 s; fényintenzitás: 0,5 mW). A kontroll és fotostimulációs sorozatokat felváltva alkalmaztuk.

***In vivo* elektrofiziológia**

Az *in vivo* kísérleteket a vírusfertőzést (lásd fentebb) követően 4-8 héttel, utána altatás (1.2 g/ttkg) alatt végeztük. Az egerek fejét sztereotaxiás készülékbe rögzítettük és a Bregmától számított koordináták alapján a célterületek fölött (OB: AP, +6.0-7.0 mm; lateral, 2.2 mm; DV, 2.5-4.0 mm; aPC: AP, +2.3 mm; lateral, 2.5 mm; DV, 2.9-3.6 mm) kis átmérőjű lyukakat fúrtunk, amelyeken keresztül az elvezető mikroelektrodákat az OB-ba illetve az aPC-be vezettük. A DRM-ot egy 470 nm-es fénysugárral összekötött (Laserglow Technologies) optikai szál (200 µm átmérőjű, 0.38 numerikus apertúrájú) segítségével fotostimuláltuk, amelyet 32°-os szögben helyeztünk el a Bregmától számított következő ponton: AP, -4.7 mm; DV, 3.0-3.6 mm. Ezzel egyidejűleg NaCl oldattal töltött, 8-20 MOhm impedanciájú üvegelektrodákkal szimultán extracelluláris

egysejtaktivitásokat vezettünk el OB és aPC neuronokból. Az idegsejtek aktivitását Axoclamp 2B erősítővel rögzítettük (Axon Instruments, USA). Az elektrofiziológiai adatokat a Power 1401 és Spike2 szoftverrel (Cambridge Electronic Design, Egyesült Királyság) 30 kHz-es mintavételezési frekvenciával rögzítettük és számítógépen tároltuk az offline analízishez. Az 5-HT_{1B} receptor antagonistát, a GR127935-t (3 mg/ttkg, sóoldatban oldva) intraperitoneálisan adtuk be.

Immunhisztokémia

Az *in vitro* elvezetésekét követően a szeleteket 4%-os paraformaldehidet tartalmazó 0,1 M foszfát-pufferoldatban (PB) fixáltuk 4°C-on egy éjszakán át. Ezt követően a fixáló-oldatot 0,1 M PB-vel történő többszöri átmosással eltávolítottuk a szeletekről, majd a szeleteket 20%-os szacharózt tartalmazó 0,1 M PB-be helyeztük, hogy védjük az ezt következő fagyasztás során a membránok szerkezetét. A szeleteket zárt Eppendorf csőben néhány másodpercre folyékony nitrogénbe helyezve fagyasztottuk, majd ezt követően 10%-os zselatinba ágyaztuk, végül mikrotóm segítségével jéghideg foszfát-pufferben 50 µm vastag szeletekre metszettük.

Tris-puffer sóoldatban oldott (TBS) 10 %-os ló szérummal (NHS) történő blokkolás után, a szeleteket Rb- α -5-HT elsődleges antitesttel inkubáltuk (Immunostar, Hudson, WI, Egyesült Államok, Rb- α -5-HT poliklonális, 1:1000) egy éjszakán át. Ezek után többszöri TBS mosást

követően a szeleteket Alexa488-kapcsolt Donkey- α -Rb (1:400) másodlagos antitestet tartalmazó oldatba helyeztük 2 óra hosszára, majd Vectashield - DAPI segítségével tárgylemezre vittük.

Az elektrofiziológiai elvezetések során a depolarizáló áramimpulzusok hatására a neuronokba diffundált Biocytint, Alexa488-kapcsolt Streptavidinnel tettük láthatóvá fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatokhoz. A fixáláshoz a szeleteket két szűrőpapír közé helyeztük, majd 4%-os paraformaldehid tartalmú 0,1M PB-ben (pH: 7,4) fixáltuk minimum 12 óráig, amíg azok feldolgozásra nem kerültek.

A processzálás során a fixáló-oldatot 0,1 M PB-vel történő többszöri atmoszással eltávolítottuk a szeletekről, ezt követően krioprotekció céljából 10%-os, majd 20%-os szacharózt tartalmazó 0,1 M PB-be helyeztük azokat. A szeleteket zárt Eppendorf csőben néhány másodpercre folyékony nitrogénbe helyezve fagyasztottuk, majd 10%-os zselatinba ágyaztuk, végül vibratómmal (Leica VT 1000S) jéghideg PB-ben 60 μ m vastagságú sorozatmetszeteket készítettünk. Ezután TBS-ben oldott Triton X-100 oldattal (0.4%) való mosás következett, végül Alexa 488-kapcsolt Streptavidint (1:500) és Triton X-100- at (0.4%) tartalmazó oldatban szobahőmérsékleten inkubáltuk a szeleteket, 2 órán keresztül, ami lehetővé tette az idegsejtek fluoreszcens mikroszkópos azonosítását. A felvételeket konfokális mikroszkóppal (Olympus FV1000) készítettük.

Adatelemzés

A kísérletekből nyert adatok kiértékelését Spike2 (Cambridge Electronic Design), Clampfit (Molecular Devices) és Origin Pro (Microcal) programokkal végeztük. A mért értékek átlagait \pm S.E.M adtuk meg. Az eredményeket $p \leq 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

EREDMÉNYEK

Az aPC-ben megfigyelt szerotonerg hatások celluláris és hálózati mechanizmusainak tisztázása érdekében, *in vitro* és *in vivo* elektrofiziológiai, optogenetikai, farmakológiai és immunhisztokémiai kísérleteket kombináltunk.

Kísérleteink főbb eredményei a következők:

1. Immunhisztokémiai kísérleteinkkel a szaglókéregbe projektáló DRM-i szerotonerg neuronok axonterminálisainak eloszlását, esetleges régió és rétegpreferenciáját vizsgáltuk.
Sikerült láthatóvá tenni az 5-HT rostokat, amelyek régió- és réteg specifikus eloszlást mutatnak a szaglókéregben, mégpedig a legsűrűbben az aPC területének 1. és 3. rétegét hálózzák be.
2. *in vivo* elektrofiziológiai méréseink során a DRM-ban Chr2 expresszáló 5-HT sejtek specifikus fotostimulációjával párhuzamosan, szimultán egysejt elvezetések végeztünk az OB-ben és az aPC-ben. Az 5-HT felszabadulás ellentétes hatást eredményezett a két területen: az OB sejtekben aktivitásnövekedéshez, míg az aPC neuronokban aktivitáscsökkenéshez vezetett. Eredményeink így kizárják annak a lehetőségét, hogy a korábbi *in vivo* kísérletekben megfigyelt aPC-i neuronok spontán aktivitásának csökkenése,

az OB-ból érkező bemenetek 5-HT okozta szupressziójából származik.

3. Farmakológiával és optogenetikával kombinált whole-cell patch-clamp méréseink eredményei alátámasztják a korábbi, szakirodalomban található, a szerotonin sejt és receptorspecifikus hatásaival kapcsolatos megfigyeléseket. A szerotonin az 5-HT_{2A} receptorokon keresztül serkenti a különböző szaglókérgi interneuronok, beleértve a gyorsan tüzelő kosársejtek aktivitását, míg a principális sejtekben 5-HT_{1A} receptor-mediált gátló hatást fejt ki.
4. A pEPSP farmakológiai kísérleteink eredményei a szerotonin útvonalspecifikus hatását mutatják az aPC-ben: az 5-HT fokozza az afferens, de csökkenti az intrakortikális rostok által kiváltott szinaptikus aktivitást. Ezek az eredmények a szerotonin kettős szerepére utalnak a szaglókérgi információfeldolgozás neuromodulációjának tekintetében, ellentétesen hatva a helyi kérgi hálózatok szinaptikus bemeneteire és a beérkező szenzoros információkra.
5. Az intrakortikális bemenetek szupressziójának hátterében álló mechanizmusok feltárására irányuló kísérleteinkből kiderül, hogy a szerotonin elsősorban a preszinaptikus 5-HT_{1B} receptor közreműködésén keresztül csökkenti a glutamát felszabadulását, ami a szaglókérgi neuronok spontán aktivitásának csökkenéséhez vezet.

6. Továbbá, az 5-HT_{1B} receptorok blokkolása jelentősen csökkentette a szerotonerg fotostimuláció okozta aktivitáscsökkenést *in vivo*. Ezek az eredmények kiegészítik és alátámasztják az *in vitro* megfigyeléseinket és szélesebb fiziológiai kontextusba helyezik az 5-HT_{1B} receptorok jelentőségét, az 5-HT aPC neuronjainak aktivitására gyakorolt szuppresszív hatásának közvetítésében.

Eredményeink alapján feltételezhető, hogy sejt- és útvonal-specifikus hatásai által a szerotonin fontos szerepet játszik a szaglókérgi információfeldolgozás finomhangolásában. Az 5-HT különböző neuronpopulációkra és szinaptikus bemenetekre kifejtett specifikus hatásainak feltárásával az aPC-ben, eredményeink hozzájárulhatnak a neuromoduláció kérgi, központi szenzoros információfeldolgozásban betöltött szerepének részletesebb megértéséhez.

A doktori disszertációhoz kapcsolódó közlemények:

1. Ildikó Piszár and Magor L. Lőrincz (2022) Differential serotonergic modulation of principal neurons and interneurons in the anterior piriform cortex. *Front Neuroanat* 16:821695. DOI: 10.3389/fnana.2022.821695 IF: 3.543
2. Ildikó Piszár and Magor L. Lőrincz (2023) Differential serotonergic modulation of synaptic inputs to the olfactory cortex. *International Journal of Molecular Sciences* 24(3):1950. DOI: 10.3390/ijms24031950 IF: 5.6