

**Két molekula sejtszintű kifejeződése patkány agyszövetben:
a KCC2, mely közvetett módon, a posztszinaptikus GABA_A receptor
mediált sejtválaszban játszik szerepet,
valamint a δ alegységgel rendelkező GABA_A receptor, mely a
tónusos áramok kialakításában vesz részt.**

Ph.D. értekezés tézisei

Báldi Rita



Témavezető:

Tamás Gábor, Ph.D., D.Sc.

Biológia Doktori Iskola

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék

Szeged

2012

BEVEZETÉS

Az idegrendszert felépítő neuronok precízen szabályozott ionháztartása az alapja elektromos tulajdonságaiknak, és ezáltal a közöttük fellépő kapcsolatok minőségének. A központi idegrendszer legfőbb gátló neurotranszmittere, a γ -aminovajsav (GABA) az általa aktivált ligandfüggő Cl^- ioncsatornához (GABA_A receptor) kötődve az egyedfejlődés kezdeti szakaszán a posztszinaptikus sejt serkentését (depolarizációját) váltja ki, míg ez a válasz két hét elteltével már gátlóvá (hiperpolarizálóvá) alakul. Ezt nagyrészt a K^+-Cl^- kotranszporter KCC2 mennyiségi változása hozza létre, mely működésével elősegíti az alacsony intracelluláris Cl^- ion koncentráció kialakítását. A KCC2 mennyiségi eloszlásának a posztszinaptikus GABA_A válaszra gyakorolt hatását kutatócsoportunk már korábbiakban az agykérgi piramissejtek periszomatikus régióján leírta, miszerint az axon iniciális szegmentumon található elenyésző mennyiségű KCC2 tartalom hozzájárul az axo-axonikus sejt által kiváltott GABA_A depolarizáló válaszhoz. A piramissejtek dendritikus régiójában a potenciálisan különböző KCC2 tartalom magyarázatot adhat a GABA_A válasz vizsgálatával kapott eltérő eredményekre, ehhez azonban a KCC2 dendritikus eloszlása meghatározásra vár. Ennek elvégzéséhez nagy felbontású elektronmikroszkópiás módszert alkalmaztunk.

A szinaptikus GABA_A receptorok aktiválódása gyors (fázikus) posztszinaptikus választ eredményez, azonban az extraszinaptikus receptorokon keresztül létrejövő, időben tartósabb, tónusos áramok nagysága mintegy 3-5-szöröse a fázikus áramoknak, ebből kifolyólag meghatározóak a hálózati aktivitás szabályozásában, és az információfeldolgozásban. A specifikusan extraszinaptikus elhelyezkedésű δ alegységet tartalmazó GABA_A receptort számos tulajdonsága teszi hatékonyá a tónusos gátláshoz való közreműködésében. A neurogliaform sejtek extraszinaptikus GABA_A hatását vizsgálva, mindezek ismeretében,

szemügyre vettük az ott jelenlévő δ alegységgel rendelkező GABA_A receptorok kortikális elhelyezkedését.

CÉLKITŰZÉSEK

I. A sejtszintű KCC2 tartalom meghatározása során a következő kérdésekre kerestük a válaszokat (a hippocampális régiót választva objektumul, ahol a principális sejtek azonos struktúrái jól elkülöníthető rétegekbe szerveződnek, **I. Cikk** Baldi et al., 2010):

1. a CA1 piramisisejtek mentén hogyan alakul a KCC2 elhelyezkedése
 - 1.1. citoplazmatikusan valamint
 - 1.2. a plazmamembránhoz kötve?
 - 1.3. Milyen különbségek figyelhetők meg a GABAerg bemenetekkel rendelkező dendritikus plazmamembrán és a glutamáterg beidegzésű dendrittüskék membránja között?
2. A hippocampusz másik principális sejt típusán, a GD szemcsesejtjeinek mentén hogyan alakul a KCC2 elhelyezkedése?

II. A neurogliaform sejtek nagy mértékű GABA felszabadításuk révén hatásukat az extraszinaptikus GABA_A receptorokon keresztül is kifejthetik. Ezáltal meg kívántuk vizsgálni a specifikusan extraszinaptikusan előforduló δ alegységet tartalmazó GABA_A receptorok elhelyezkedését, melyek potenciális célpontjai lehetnek a neurogliaform sejt aktivitása során felszabaduló GABA-nak (**II. Cikk** Olah et al., 2009).

MÓDSZEREK

Szövetpreparátum készítése immunhisztokémiához.

Minden eljárás a Szegedi Tudományegyetem jóváhagyásával és a Helsinki Nyilatkozat értelmében történt. A felnőtt Wistar patkányokat ($n = 12$) tribromoethanol (10 ml/kg) hasüregbe adott injekciójával mélyen elaltattuk, majd a szíven át az érrendszer fiziológiás sóoldattal történt átmosása után 4% paraformaldehid, 0,2% pikrinsav, és 0,05% glutáraldehid oldatával végeztük a perfúziót a kálium-klorid-kotranszporter KCC2 fluoreszcens jelöléséhez ($n = 3$). A GABA_A receptor δ alegységének festésekor a glutáraldehidet elhagytuk az oldatból ($n=5$).

A KCC2 elektronmikroszkópiás feltárása esetében a perfúzió során 4% paraformaldehid és 4% akrolein 0,1 M-os foszfát pufferes oldatát ($n=3$) valamint egy pH-eltoláson alapuló, Sloviter (1991) féle fixálást alkalmaztunk ($n=1$).

Az állatok agyának eltávolítása után horizontális és koronális metszeteket (60 μm) készítettünk vibrotóm (Leica VT 1000S) segítségével, amelyeket 0,1 M-os foszfát pufferbe gyűjtöttünk. Az immunhisztokémiai eljárások során a hippokampusz dorzális részét valamint a szomatoszenzoros kérget vizsgáltuk.

Immunfluoreszcens jelölés

A GABA_A receptor δ alegységével szembeni elsődleges antitestet W. Siegharttól (Center for Brain Research, Bécs, Ausztria) kaptuk. Az elsődleges antitesttel történt 3 éjszakás 4 °C-os inkubációt követően biotinilált másodlagos antitesttel inkubáltuk a metszeteket, majd ABC komplex (Vector Laboratories) és tyramid jelamplifikációs kit (Molecular Probes) segítségével hívtuk elő a reakciót.

A δ jelölést követően kettős valamint hármas kolokalizációkat végeztünk a metszeteken a következő fehérjék ellen termeltetett antitesteket használva: α -actinin, parvalbumin, calbindin, vazóaktív intesztinális peptid, calretinin, szomatosztatin és reelin. Az elsődleges antitesteket fluoreszcensen jelölt másodlagos antitestekkel jelenítettük meg.

A KCC2-t jelölő elsődleges antitest előhívására szintén fluoreszcensen jelölt másodlagos antitestet alkalmaztunk.

Fotók készítésénél fénymikroszkópot (Olympus BX60) valamint konfokális lézer pásztázó mikroszkópot (IX81, Olympus) használtunk.

Beágyazás előttit elektronmikroszkópiás immunhisztokémia.

A KCC2 molekula elektronmikroszkópiás megjelenítéséhez koronális metszeteket használtunk a dorzális hippokampusz területéről. A primer antitestet 0,8 nm arany kötött másodlagos antitesttel jelöltük, majd ezüst kittel (Aurion) tettük láthatóvá a további vizsgálatok számára. A metszeteket növekvő alkoholsorban dehidratáltuk, gyantába ágyasztuk, majd a kívánt területekről (CA1 és gyrus dentatus régió) további átágyazást követően 80nm-es metszetsorokat készítettünk ultramikrotóm segítségével, amiket gridekre történt felvétel után elektronmikroszkópban vizsgáltunk (Tecnai-12, FEI), és CCD kamerával fotóztunk (MegaView III, Soft Imaging System).

Az immunarany jelölés kvantitatív analízise.

Az akroleines és szloviteres fixálással is hasonló eredményt kaptunk, így az adatokat együtt kezeltük. A KCC2 immunarany a CA1 piramissejtek szómája, dendritörzse, dendritüskéi és az axoniniciális szegmentumok (AIS) mentén, a következő régiókban határoztuk meg: str. pyramidale ("0 μm "), a str. radiatum proximális és disztális része (0-100 μm és 230-300 μm -re a sejttestek rétegétől) str.

lacunosum moleculare (320-400 μm) és str. oriens (0-70 μm). A GD szemcsesejtjeinek mentén a szomatikus, dendritikus és az AIS membránhoz kapcsolt KCC2 sűrűségértékeket határoztuk meg a str. granulosum ("0 μm ") valamint a str. moleculare proximális (0-40 μm) és disztális területén (140-180 μm). Az elektronmikroszkópos felvételeket a metszetek felső 2 μm -éről készítettük, ügyelve arra, hogy az immunrészecske-sűrűséget azonos mélységben vizsgáljuk. Először az aspecifikus jelölés sűrűségét határoztuk meg a sejtmag területén (arany/ μm^2) valamint a sejtmaghártya mentén (arany/ μm). Megmértük az immunarany részecskék plazmamembrántól való távolságát, ami Gauss eloszlást mutatott 18,8 nm-es csúcserővel és 11,1 nm-es szórással, így azokat a részecskéket tekintettük membránkapcsoltnak, melyek a membrántól 41 nm-en belül helyezkedtek el a sejt belsejében (± 2 szórással + csúcserő), ami egy 41 nm-es effektív membrán szélességet eredményezett. A KCC2 immunarany sűrűséget immunrészecske per effektív membrán terület valamint immunrészecske per membránhosszban határoztuk meg, ami lehetővé tette, első esetben, a membránkapcsolt jelek összehasonlítását a citoplazmatikus sűrűséggel, második esetben, a membránkapcsolt sűrűségek egymás közötti összehasonlítását. A sűrűség meghatározásához Reconstruct szoftvert használtunk (Synapse Web, Kristen M. Harris, PI, <http://synapses.clm.utexas.edu/>). Az értékek 'átlag \pm szórással'-ként vannak feltüntetve. Minden sűrűségértéket páros *t*-próbával vetettünk össze az aspecifikus háttérjellel (membrán kapcsolat a membrán kapcsolttal, citoplazmatikus a citoplazmatikussal) majd a szignifikáns értékeket a háttérjellel való korrigálás után tovább analizáltuk. (A háttérértékeket minden állatban meghatároztuk, és állatonként külön kezeltük őket.) Páros összehasonlításokat végeztünk ANOVA analízissel. Annak érdekében, hogy elkerüljük a variancia homogenitásának hiányából származó statisztikai problémákat, Brown-Forsythe és Welch módszerekkel megvizsgáltuk az F-értékeket, amelyek minden esetben

szignifikáns értékeket mutattak ($P < 0,001$), majd adatainkat Games-Howel post hoc tesztnel vetettük alá, ami nem alapul az egyenlő varianciák feltevésén.

EREDMÉNYEK ÉS TÁRGYALÁS

I. A KCC2 elhelyezkedése a hippocampusz két principális sejtípusán.

A patkány hippocampusz principális sejtek KCC2 koncentrációjának meghatározására nagy felbontású beágyazás előtti immunolokalizációs módszert alkalmaztunk. Agykérgi piramissejtekről kapott korábbi eredményeinket alátámasztotta a CA1 piramissejtjeinek valamint a gyrus dentatus szemcsesejtjeinek axon iniciális szegmentumán mért KCC2 tartalom, ami a megfelelő szomatikus érték $6,4 \pm 11,9\%$ és $6,6 \pm 14,1\%$ -át érte el. A bazális dendritek KCC2 koncentrációja a str. oriensben hasonló a szomatikus koncentrációhoz ($109,2 \pm 48,8\%$). A piramissejtek apikális dendritjének mentén a KCC2 komplex eloszlást mutatott. A szomatikus értékekhez viszonyítva (100%) a következő eredményeket kaptuk: $124,5 \pm 15,7\%$ és $79 \pm 12,4\%$ a str. radiatum proximális és disztális részén valamint $98,2 \pm 33,5\%$ a stratum lacunosum moleculareban. A CA1 piramissejtek dendrittüskéi, amelyekre a serkentő bemenetek érkeznek, $39,9 \pm 8,5\%$ -ban tartalmaznak KCC2-t a nekik megfelelő régiókban mért dendritörzshöz viszonyítva, ahová a GABA_A bemenetek érkeznek. A gyrus dentatus sejt felszíni KCC2 tartalma nagyobb értékeket mutatott a dendriteken ($148,9 \pm 54\%$), mint a szómán (100%), azonban a dendritek mentén nem észleltünk koncentrációgrádienszt a proximális és disztális régiók között.

A KCC2 sűrűségének axo-szomato-dendritikus növekedése mindkét principális sejt esetében azt sugallja, hogy a disztális dendritszakaszokon a GABA_A receptorokon keresztül létrejövő sejtválaszok hiperpolarizálóak, feltehetően

negatívabb reverzpotenciállal, mint a proximális szomatodendritikus szinapszisok esetében. A KCC2 koncentrációjának növekedése és/vagy a KCC2 GABAerg szinapszisokkal szembeni nagyobb aránya közreműködhet a reverzpotenciál különbségekhez, amiket a szomatikus és dendritikus válaszok esetében mértek. A disztális területek szimmetrikus szinapszisokra nézve magasabb Cl^- kipumpáló kapacitása hozzájárulhat az intracelluláris Cl^- ion homeosztázis és a GABA_A receptor mediált sejtválasz polaritásának fenntartásában egy tartós GABAerg neurotranszmissziót követően is, ami előfordulhat normál agykérgi tevékenységek, de patológiás körülmények között is, mint a trauma, ischémia, oxidatív stressz, vagy az epilepszia, amikről tudjuk, hogy a KCC2 expresszióját leszabályozzák.

II. A GABA_A receptor δ alegységének kortikális feltérképezése.

A δ alegységgel szembeni immunfluoreszcens jelölés a szupragranuláris rétegek intenzív neuropil festődése mellett, amely nagyrészt a piramissejtek dendritjeinek köszönhető, az interneuronok egy részének igen erős jelölődését mutatotta. Ez a $\text{GABA}_A\delta$ $-/-$ állatok esetében hiányzott. A GABA_A receptorok δ alegységére ($\text{GABA}_A\delta$) immunopozitív interneuronok azonosítására többjelöléses immunreakciókat végeztünk. A $\text{GABA}_A\delta$ receptort tartalmazó sejtek $65 \pm 12\%$ -a adott α -actinin2-vel kolokalizációt ($n = 3$ patkány), ami az elektrofiziológiásan azonosított neurogliaform sejtekben megtalálható. További interneuron markerekkel, mint a parvalbumin, szomatosztatin, calbindin, calretinin és vazoaktív intesztinális peptid, nem találtunk átfedést. A hippocampusz CA1-3 területén, a stratum radiatum / lacunosum moleculare határán és a stratum pyramidalehez közel elhelyezkedő interneuronokon észleltünk intenzív festődést a GABA_A receptor delta alegységével szemben. Ezek az interneuronok feltehetően megfelelnek a hippocampális neurogliaform valamint Ivy sejteknek. A hippocampusz immunfluoreszcens mintázata alátámasztja a korábbi elektrofiziológiai adatokat,

miszerint a gyrus dentatus szemcsesejtjein és a molekuláris réteg interneuronjain, ellentétben a hippocampális piramis sejtek kisebb áramaival, relatíve nagy tónusos gátlás érvényesül.

ÖSSZEFOGLALÁS

A KCC2 sűrűségének elektronmikroszkópos feltérképezésével megállapítottuk, hogy elhelyezkedése a hippocampális principális sejtek axoszomato-dendritikus tengelyének mentén növekszik, és sejtípus specifikus eloszlást mutat. Mindez hatással lehet a posztszinaptikus sejten kiváltott GABA_A sejtválaszra, ezáltal az idegsejtre érkező jelek integrálódására.

A specifikusan extraszinaptikus elhelyezkedésű δ alegységgel rendelkező GABA_A receptor immunfestése rámutatott annak szomatodendritikus kifejeződésére, ami az interneuronok között nagy szelektivitást mutatott a neurogliaform sejtekre nézve. A neurogliaform sejtek a GABA_A és GABA_B receptorokon kiváltott posztszinaptikus gátlásukon kívül szerepet játszanak a hálózati kommunikáció csökkentésében a preszinaptikus terminálisokon elhelyezkedő GABA receptorok és a tónusos gátlásban résztvevő GABA_A csatornák nyitásával. Nagymértékű δ alegységet tartalmazó GABA_A receptor tartalmuk alkalmassá teszi őket a neuroszteroidok általi szabályozásra, amikor elcsendesítésük megváltoztatja a hálózati gátlás eloszlását, lehetőséget teremtve nagyobb lokális aktivitásra, az idegsejtek közötti élénkebb kommunikációra.

KÖZLEMÉNYEK

Rita Báldi, Csaba Varga, Gábor Tamás: Differential distribution of KCC2 along the axo-somato-dendritic axis of hippocampal principal cells. Eur J Neurosci. 2010. Oct:32(8):1319-25

IF: 3,418

Szabolcs Oláh, Miklós Füle, Gergő Komlósi, Csaba Varga, **Rita Báldi**, Pál Barzó, Gábor Tamás: Regulation of cortical microcircuits by unitary GABA-mediated volume transmission. Nature. 2009 Oct 29:461(7268):1278-81

IF: 34,48

Összesített impakt faktor: 37,898

KONFERENCIA POSZTEREK

Rita Báldi, Csaba Varga, Gábor Tamás; Differential distribution of KCC2 along the axo-somato-dendritic axis of hippocampal principal cells; 7th FENS Forum of European Neuroscience, Amszterdam, Hollandia, 2010

Rita Báldi, Csaba Varga, Gábor Tamás; Differential distribution of KCC2 along the axo-somato-dendritic axis of CA1 pyramidal cells; MITT konferencia, Budapest, Magyarország, 2009

Rita Báldi, Csaba Varga, Gábor Tamás; Differential distribution of KCC2 along apical dendrites of CA1 pyramidal cells; 6th FENS Forum of European Neuroscience, Genf, Svájc, 2008

Gergely Komlósi, Gábor Molnár, Szabolcs Oláh, **Rita Báldi**, Éva Tóth, Pál Barzó, Gábor Tamás; Diverse excitatory and inhibitory connections between identified neuron sin the human cerebral cortex, IBRO World Congress of Neuroscience, Melbourne, 2007