

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

A SZINAPSZIS-SPECIFIKUS RETROGRÁD JELÁTVITEL FEJLŐDÉSÉT MEGHATÁROZÓ TÉNYEZŐK AZ AGYKÉRGI NEURONÁLIS HÁLÓZATOKBAN

Dobszay Márton

Témavezető: **Harkány Tibor** Ph.D. (Egyetemi tanár, Karolinska Institutet,
University of Aberdeen)

Társ-témavezető: **Farkas Tamás** Ph.D. (Egyetemi docens,
Szegedi Tudományegyetem)

Biológus Doktori Iskola, Szegedi Tudományegyetem
Szeged – Stockholm, 2009

BEVEZETÉS

Az agykéreg idegsejtjeinek két fő csoportját már több mint 100 esztendővel ezelőtt elkülönítették. A serkentő piramis sejtek száma mintegy tízszerese a gátló GABAerg interneuronokénak. Az interneuronok alcsoportjainak megfelelő osztályozása, mely pontosan meghatározza például azok speciális elrendeződését, citoarchitektúráját, neurokémiai és molekuláris különbségeit, elektrofiziológiai tulajdonságait valamint kapcsolatrendszerüket, még továbbra is intenzív kutatás tárgya. Az utóbbi évtizedekben egyre több kutatás irányult arra, hogy megértsük az előagyi interneuronok sokféleségének alapjait. Mára kialakult egy kifinomult koncepció, mely leírja a speciális interneuron alcsoportok születési helyeit, migrációs útvonalait, és azokat a vezérlő elveket, melyek az embrogenézis és a korai posztnatális periódus során az interneuronok molekuláris és funkcionális differenciálódását meghatározzák. Az interneuronok sokfélesége szerepet játszik a neuronális hálózatok plaszticitásában, amely alapvető jelentőségű a neuronális adaptáció és az információ feldolgozása folyamán.

A retrográd jelátvitel jelensége során a posztszinaptikusan felszabaduló bioaktív hírvivő molekula átjutva a szinaptikus résen a preszinaptikus receptorához kötődik. A retrográd jelátvitel szerepet játszik az agyi szinapszisok plaszticitásának fenntartásában. A retrográd jelátvivők, mint az endokannabinoidok, a glutamát, γ -aminovajsav (GABA) és az ún. brain-derived neurotrophic factor (BDNF), a kutatások szerint alapvető hatást fejtenek ki az idegi fejlődésben. Mindez alátámasztja az ún. funkcionális folytonosság hipotézisét, mely megegyezést feltételez a magzati korra jellemző szinaptogenezis kulcsmolekulái, valamint azon anyagok között melyek a születés utáni szinapszis-fennmaradásért felelősek.

A jelen tézis fel kívánja tární azt, hogy milyen kapcsolat tapasztalható a retrográd jelátvitelben szerepet játszó neuroanatómiai elrendeződés és az adott szignalizációs kazetták szinapszis-specifikussága között. Ezen túl munkám során bemutatom az endokannabinoid rendszer elsődleges idegfejlődési funkcióit az agykérgi interneuronokban. A tézis továbbá bemutatja, hogy a kortikális neuronális hálózatok kifejlődése, szerveződése és azok tartós funkcionális integritásának fennmaradása olyan morfogének kontrollja alatt van, melyek az agyban mind a neuronális mind a szinaptikus különbségek kialakulására jól körülhatárolható formában hatnak.

A TÉZISBEN FELHASZNÁLT PUBLIKÁCIÓK

- I. Harkany T, Dobszay MB, Cayetanot F, Härtig W, Siegemund T, Aujard F and Mackie K, Redistribution of CB₁ cannabinoid receptors during evolution of cholinergic basal forebrain territories and their cortical projection areas: comparison between grey mouse lemur (*Microcebus murinus*, Primates) and rat. *Neuroscience* (2005) 135:595-609.
- II. Harkany T, Härtig W, Berghuis P, Dobszay MB, Zilberter Y, Edwards RH, Mackie K, Ernfors P. Complementary distribution of type 1 cannabinoid receptors and vesicular glutamate transporter 3 in basal forebrain suggests input-specific retrograde signaling by cholinergic neurons. *Eur J Neurosci* (2003) 18:1979-1992.
- III. Harkany T, Holmgren C, Härtig W, Qureshi T, Chaudhry FA, Storm-Mathisen J, Dobszay MB, Berghuis P, Schulte G, Sousa KM, Fremeau RT Jr, Edwards RH, Mackie K, Ernfors P, Zilberter Y. Endocannabinoid-independent retrograde signaling at inhibitory synapses in layer 2/3 of neocortex: involvement of vesicular glutamate transporter 3. *J Neurosci* (2004) 24:4978-4988.
- IV. Berghuis P*, Dobszay MB*, Sousa KM, Schulte G, Mager PP, Härtig W, Göres TJ, Zilberter Y, Ernfors P, Harkany T. Brain-derived neurotrophic factor controls functional differentiation and microcircuit formation of selectively isolated fast-spiking GABAergic interneurons. *Eur J Neurosci* (2004) 20:1290-1306.
- V. Grumelli C, Berghuis P, Pozzi D, Caleo M, Antonucci F, Bonanno G, Carmignoto G, Dobszay MB Harkany T, Matteoli M, Verderio C, Calpain activity contributes to the control of SNAP-25 levels in neurons. *Mol Cell Neurosci* (2008) 39:314-323.
- VI. Berghuis P, Dobszay MB, Wang X, Spano S, Ledda F, Sousa KM, Schulte G, Ernfors P, Mackie K, Paratcha G, Hurd YL, Harkany T. Endocannabinoids regulate interneuron migration and morphogenesis by transactivating the TrkB receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* (2005) 102:19115-19120.

* a szerzők egyenlő arányban járultak hozzá a munkához

MÓDSZEREK

Többszörös immuno-fluoreszcens jelölés

A neuroanatómiai kutatások során, fénymikroszkópos szinten, többszörös immuno-fluoreszcens jelölést alkalmaztam. A kapott metszeteket nagy felbontású konfokális lézer-scanning mikroszkóppal analizáltam. *(I-VI. publikáció).*

Whole-cell patch-clamp elektrofiziológiai mérések

Az interneuronok *in vitro* fejlődésének és fenotipikus változásainak vizsgálatára *(IV-VI. publikáció)*, valamint az agykéreg 2/3 rétegének gyorstüzelő GABAerg interneuronjai (FS) és piramissejtjei között fennálló gátló terminálisokban található retrográd jelátvitel tanulmányozására *(III. publikáció)*, egy, illetve két sejtet érintő whole-cell patch-clamp technikát használtam.

In vitro vizsgálatok

A periszomatikus kosársejtek molekuláris tulajdonságainak leírására nagy tisztaságú interneuron sejt kultúrán végeztem kísérleteket. Az általam vizsgálni kívánt GABAerg interneuron alcsoportok szelektíven expresszálnak bizonyos sejtfelszíni markereket, mely alapja lehet ezen interneuron alcsoportok ún. target-specifikus izolációjának (TSI). Röviden, a TSI lehetővé teszi, hogy a vizsgálandó idegsejt típust nagy mennyiségben tartalmazó sejt kultúrát hozzunk létre. Felhasználva, hogy az FS interneuronok szelektíven expresszálják a feszültségfüggő kálium csatorna 3.1b alegységét *(IV-V. publikáció)* a kolecisztokinin-tartalmú kosársejtek pedig korai időktől kezdve kifejezik az 1-es típusú kannabinoid (CB₁) receptorokat *(VI. publikáció)* elemezni tudtam a fenti sejt típusok molekuláris, morfológiai és biofizikai tulajdonságait.

CÉLKITŰZÉSEK

Az agykérgi szinapszisokban tapasztalható retrográd jelátvitel szinapszis-specifitása, valamint az azokat működtető kifinomult molekuláris mechanizmusok alapján érdemesnek látszik megvizsgálni azt, hogy van-e kapcsolat a szinaptogenezis idegfejlődési mechanizmusa, (melynek során a pre- és a posztzinaptikus oldalak közötti dinamikus jelátvitel elősegíti a szinapszisok formálódását) és az érett szinapszisokban működő retrográd jelátvitel molekuláris anyagai között. Feltevéseink szerint néhány, a magzati telenkefalban expresszáldó és az éretlen dendritekből felszabaduló kulcs morfogén szerepet játszik a szinapszisok születés utáni fennmaradásában ésérésében is. Hipotézisünk szerint, ha a posztzinaptikus idegsejtekben ezeknek a neuroaktív anyagoknak dendritikus felszabadulása fennmarad, akkor az érintett faktorok végül retrográd jelátvivőként képesek működni.

Munkám során molekuláris tulajdonságaikban és fejlődési programukban élesen elkülönülő periszomatikus kosársejt al csoportok összehasonlító vizsgálatát végeztem el.

A felnőtt telenkefalón esetén vizsgálni kívántam:

- a CB₁ receptorok eloszlását a kolinerg bazális előagyban és a neokortexben, különös tekintettel a fajok közötti különbségekre, valamint a CB₁ receptorok serkentő és gátló agykérgi szinapszisok közötti megoszlására (*I-II. publikáció*),
- az agykéreg 2/3 rétegének gyorsüzelő CB₁ receptor-negatív interneuronjai és piramissejtjei között fennálló retrográd szinaptikus jelátvitel molekuláris alapjait (*III. publikáció*).

A fejlődő nagyagy esetén vizsgálni kívántam:

- segítheti-e a GABAerg interneuron alcsoportok szelektív izolálását lehetővé tevő eljárás, az FS interneuronok *in vitro* fejlődésének karakterizálását, beleértve a sejtek BDNF szükségletének leírását, amíg azok el nem érik a gyors frekvenciájú akciós potenciál sorozatok generálásának képességét (*IV. publikáció*),
- hogyan járul hozzá a belső calpain aktivitás a synaptoszóma-asszociált 25 kDa protein (SNAP-25) mennyiségének szabályozásához a FS interneuronokban az egyedfejlődés folyamán (*V. publikáció*),
- a fejletlen kolecisztokinin-pozitív agykérgi interneuronok által kifejezett CB₁ receptorok fejlődéstani jelentőségét (*VI. publikáció*),
- az endokannabinoid szignalizáció, kölcsönhatásban az egyedfejlődés során működő neurotrofin jelátviteli rendszerrel, részt vesz-e az interneuronok migrációjának és morfológiai differenciálódásának irányításában (*VI. publikáció*).

EREDMÉNYEK

A kortikális neuronális hálózatok tartós funkcionális integritásának kialakulása és fennmaradása nagyszámú diffúzibilis faktor kontrollja alatt áll. A tézisemben szereplő tanulmányok bizonyítják, hogy:

- a CB₁ receptor-tartalmú neuronok, valamint azok célterületeinek szerveződése a bazális előagyban evolúciósan konzervált a rágcsálók, valamint a félmajmok, mint a főemlősök képviselői között (*I. publikáció*),
- az agykérgi mezők növekedése és citoarchitektonikai differenciálódása kapcsolatba hozható a CB₁ receptor-tartalmú kéreg alatti és intrakortikális afferensek eltérő mintázatával (*I. publikáció*),
- az endokannabinoid és a glutamát közvetítette retrográd jelátviteli kaszkád hozzájárul az izokortex és a bazális előagy területének eltérő szinapszis populációjánál kimutatható plaszticitás kontrolljához (*II. publikáció*),
- egy adott neuron képes több retrográd jelátvivő rendszer komponenseit is expresszálni, és ezeket dendritjének jól meghatározott helyén kifejezni. A retrográd szinaptikus hálózat kialakulása ugyanakkor mindig szinapsziszspecifikus, melyet a fejlődés során a pre- és posztzinaptikus neuronok összjátéka határoz meg (*III. publikáció*),
- a glutamát képes retrográd jelátvivőként viselkedni, amikor a szinapszisban található dendritből kvantális formában felszabadul, módosítva a gyorstüzelő sejt felől érkező hatást (*III. publikáció*),
- a target-specifikus izoláció új módszere olyan interneuron alcsoportokban gazdag *in vitro* rendszerek előállítására alkalmas, melyek az adott alcsoportok molekuláris elemzésére sejtbiológiai jelátviteli különbségeik vizsgálatára használható (*IV-V. publikáció*),

- az endokannabinoidok alapvető szerepet játszanak az agykéreg kifejlődésében (*VI. publikáció*).