

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**A nucleus pedunculopontinus direkt neuronális és
indirekt, asztrocitafüggő neuromodulációs
mechanizmusainak vizsgálata**

Bordás Csilla



DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2017

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**A nucleus pedunculopontinus direkt neuronális és
indirekt, asztrocitafüggő neuromodulációs
mechanizmusainak vizsgálata**

Bordás Csilla

Témavezető: Dr. Pál Balázs Zoltán



DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2017

A nucleus pedunculopontinus direkt neuronális és indirekt, asztrocitafüggő neuromodulációs mechanizmusainak vizsgálata

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az Elméleti orvostudományok tudományágban
Írta: **Bordás Csilla** okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája
(Élettan és Neurobiológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Pál Balázs Zoltán, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Szöllősi János, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Matesz Klára, az MTA doktora
Dr. Gálosi Rita, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK,
Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet 2.306 iroda
2017. október 25. 10:30 óra

Az értekezés bírálói: Prof. Dr. Tóth Attila, az MTA doktora
Dr. Kalló Imre, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szöllősi János, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Matesz Klára, az MTA doktora
Prof. Dr. Tóth Attila, az MTA doktora
Dr. Gálosi Rita, PhD
Dr. Kalló Imre, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK
Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2017.október 25. 13 óra

BEVEZETÉS

A nucleus pedunculopontinus és a retikuláris aktivációs rendszer

A nucleus pedunculopontinus (PPN) a középagyban, annak tegmentum nevű területén elhelyezkedő, kolinerg stuktúráként ismert mag. A PPN a pedunculus cerebellaris superiorától lateralisán, a lemniscus lateralistól pedig medialis irányban található. A substantia nigra posterolateralis része határolja rostralisan, a nucleus cuneiformis és a subcuneiformis pedig dorsalis irányból szegélyezi. A nucleus laterodorsalis mellett a PPN alkotja a középagy egyik fő kolinerg magcsoportját. A PPN nem homogén struktúra, mivel különböző neurokémiai markerekkel rendelkező sejtek alkotják, valamint az itt elhelyezkedő sejtek szómájuk és dendritfájuk méretében is különböznek. A nucleus pedunculopontinus a retikuláris aktivációs rendszer része; legjobban ismert szerepe az alvás-ébrenlét és a mozgás szabályozásában való részvétel.

A retikuláris aktivációs rendszert (RAS) az irodalomból úgy ismerjük, mint egy olyan struktúrát, mely az éberség és figyelem szervezésében játszik fontos szerepet. A RAS egy diffúz, hálózatos rendszer, ami az agykéreg felé küld felszálló rostokat, míg bemenetei

zömmel szenzorosak. Több agytörzsi mag is része ennek a hálózatnak a PPN mellett, mint például a nucleus laterodorsalis tegmentalis, a locus coeruleus, a nucleus parabrachialis, a raphe magvak, a ventralis tegmentalis area, és funkcionálisan ide tartoznak a hypothalamus egyes területei és a bazális előagyi kolinerg magvak. Bemeneteit képzik a fájdalom-, tapintási-, hő-, vizuális és hangingerek. Két fő útvonalon keresztül éri el az agykérget, melyek a dorsalis, thalamuson keresztüli és a ventralis, bazális előagyon és hypothalamuson keresztüli útvonalak.

A PPN-en kívül az agyban más kolinerg struktúrák is léteznek. A nem motoros kolinerg magcsoportok a bazális előagyan és az agytörzs felső részében helyezkednek el, innen projiciálnak más agyi központok felé. Ezeket az agytörzsi és előagyi kolinerg struktúrákat Ch1-Ch6 jelöléssel illetik. A Ch1 és Ch2 csoportba tartozik a nucleus septalis medialis és a nucleus striae diagonalis verticalis, ezek a hippocampus legfontosabb kolinerg beidegző területeit képezik. A septum kolinerg magvai a Ch1-et alkotják. A nucleus striae diagonalis verticalis főágából kiinduló útvonal a Ch2-t alkotja, melyek a hippocampus kolinerg beidegzéséért felelősek. A Ch3-ba tartozik a nucleus striae diagonalis horizontalis főágának laterális része, mely a bulbus olfactorius legfőbb kolinerg bemenete. A Ch4-es útvonal a cortexet és az amygdalát látja el kolinerg beidegzéssel, ez a nucleus basalis magnocellularis kolinerg magjaiból indul. A Ch5-ös a nucleus

pedunculopontinust jelöli, amely a pontomesencephalicus formatio reticularisban helyezkedik el, és a Ch6 pedig a periventriculáris area nucleus laterodorsalis tegmentalisát (LDT) foglalja magába. Ezek a kolinerg útvonalak a thalamus fő kolinerg bementetét képezik.

A PPN morfológiai jellemzői és kapcsolatai

A PPN-t, mint magot a kolinerg neuronok kimutatásával szokás azonosítani. Ezek a tanulmányok immunhisztokémiával, kolin-acetiltranszferáz enzim ellen termeltetett monoklonális antitest segítségével mutatták meg szelektíven a kolinerg neuronok elhelyezkedését. A kolinerg sejtek ezen a területen 40%-kal nagyobbak mutatkoztak, mint a kolin-acetiltranszferáz immunonegatív sejtek. Újabb kísérletek alapján megállapították, hogy a PPN-en belül különbözik a kolinerg sejtek eloszlása rostralis irányból caudalis irány felé haladva, mégpedig a kolinerg sejtek száma és aránya növekszik a PPN caudalis része felé.

A PPN-nek egyre több struktúrával való kapcsolatára derült fény, például a gerincvelő, pontomedullaris formatio reticularis, cerebellum, substantia nigra, globus pallidus, hypothalamus lateralis része, bazális előagy tartozik közéjük. A leszálló útvonalak végpontjaiként tartják számon a mély cerebellaris magvakat, a pontomedullaris formatio reticularis magvait, a medioventralis medulla

oblongatát és a gerincvelő felé is tart néhány kisebb útvonal, amit patkányban figyeltek meg.

A PPN és a LDT számos részen átfed projekcióikban, de az LDT inkább a középvonal illetve a limbikus struktúrák felé projiciál, míg a PPN a laterális motoros magvak felé. A PPN és az LDT anatómiailag részleges átfedést mutat néhány más magcsoporttal, a substantia nigrával (SN) és a locus coeruleussal (LC). Kimutatták, hogy egyes projekcióik is egymással párhuzamosan futnak. A kolinerg és kolinoceptív struktúrák között oda-vissza kommunikáció, beidegzés létezik.

A PPN sejttípusai és elektrofiziológiai markerei

A PPN nem homogén struktúra, hanem különböző neurokémiai markerekkel rendelkező sejtek alkotják. A kolinerg neuronok mellett GABAerg és glutamaterg neuronok fordulnak elő nagy számban, melyek rostro-caudalis irányban eltérő sűrűséget mutatnak. Parasagittalis irányban, a kolinerg és a glutamaterg neuronokhoz képest a GABAerg neuronok sűrűbben helyezkednek el a nucleus pedunculopontinus rostralis részén. Ezzel szemben, a glutamaterg sejtek nagy számban találhatók a PPN caudalis részén. Ezen a három csoporton belül még további morfológiai alcsoportok különíthetők el;

például a PPN-ben található sejtek eltérhetnek a bennük található kalciumkötő fehérjék típusában és arányaiban is.

A PPN sejteit membrántulajdonságaik alapján is különböző csoportokba osztották. Kang és Kitai alapján háromféle csoport létezik, így az alábbi három neurontípus különíthető el membrántulajdonságaik alapján: az A-árammal (tranziens kifelé irányuló áram, amely egy hiperpolarizáló impulzus után a kiindulási membránpotenciálra történő visszatérést késlelteti) rendelkező I. típus, az alacsony-küszöbű kalciumtűskékkel bíró II. típus, és a két csoportba egyértelműen nem beosztható III. csoport, amely egyik jellemzővel sem rendelkezett. Leonard és Llinas ugyancsak három neurontípust állapított meg elektrofiziológiai markereik alapján. Az első PPN neuroncsoporton előzetes hiperpolarizációt követő depolarizáció TTX-rezisztens kalciumkonduktanciát aktivál, ami burst tüzelési mintázatot hoz létre. A második csoportban található neuronokra szintén jellemző az alacsony küszöbű kalciumtűskék megléte, valamint A-árammal is rendelkeznek. A harmadik csoportba olyan neuronok tartoznak, melyeknek van A-áramuk, de nem mutatnak alacsony küszöbű kalciumtűskéket.

A PPN kolinerg és nem-kolinerg neuronjait in vivo tüzelési tulajdonságaik szerint is csoportosíthatjuk. Altatott patkányon, a fizioiógias lassú hullámú aktivitásra hasonlító szinkronizált kérgi

aktivitás alatt a PPN kolinerg sejtjei kétféle tüzelési mintázatot mutattak. A nagyobb populációt a lassan tüzelő kolinerg neuronok alkották, melyek a kérgi lassú oszcillációk alatt az oszcillációk aktív, "up state" fázisával szinkron működnek. Létezett emellett egy kisebb csoport: a gyorsan tüzelő kolinerg neuronok, melyek a lassú oszcillációk alatt a passzív "down state" állapotával egy időben voltak aktívak. Egyes nem-kolinerg neuronok, melyek valószínűleg nagyrészt glutamaterg neuronok, szintén két csoportba sorolhatók: az egyik csoport neuronjai gyorsan tüzelnek és a kérgi lassú oszcillációk "down state" állapotával szinkronitást mutatnak, a másik neuroncsoport vagy lassan (vagy nem) tüzelő neuronokból áll, melyek tüzelése független az agykéreg lassú oszcillációitól.

A PPN mérhető extracelluláris oszcillációkat produkál. A PPN-ben fiziológiai fontosságú a nagy amplitúdójú alfa oszcillációk (8-13 Hz) jelenléte. Ezeknek az oszcillációknak az amplitúdója csökken Parkinson-kór kialakulása esetén. Egy in vitro megközelítést alkalmazó tanulmány kimutatta, hogy majdnem minden PPN neuron képes gamma frekvenciájú membránpotenciál-oszcillációkat létrehozni, ha depolarizáljuk őket.

A PPN szerepe és neuromodulációs szabályozása

A PPN, mint a RAS egyik kolinerg magja, részt vesz az alvás-ébrenlét ciklusok szabályozásában. Az irodalom szerint a PPN neuronok növelik tüzelési frekvenciájukat a REM (gyors szemmozgásokkal járó alvás – "rapid eye movement") alvás és ébrenlét alatt, viszont csökkentik tüzelési frekvenciájukat a lassú hullámú alvás alatt. A kolinerg neuronokhoz hasonlóan, egyes GABAerg és glutamaterg neuronok ébrenlét és REM alvás alatt ugyancsak nagyobb frekvenciával tüzelnek.

A PPN, mint a középagy egyik legfőbb kolinerg magja, nemcsak számos agyterületet lát el bemenettel, viszont ő maga is számos neuromodulációs mechanizmus célpontja.

In vivo vizsgálatokkal kimutatták, hogy ha glutamátot injektálnak a PPN területére, az növeli a paradox alvás idejét és ébrenlétet produkál. Az NMDA beinjektálása az ébrenlétet fokozza a kísérleti állatban. Kainát receptor agonista injektálása viszont csak a paradox alvás idejét növeli. Ha az altatásban lévő állat PPN-jébe az acetilkolin receptor agonista karbakolt injektáltak, az állatról elvezetett kérgi EEG regisztrátumon gamma oszcillációk alakultak ki.

A medialis és a dorsalis raphe magvak kapcsolatban állnak a PPN-el, illetve számos egyéb magcsoportot szerotoninerg beidegzéssel látnak el. A szerotonin az 5-HT₁, 5-HT₂ és az 5-HT₇ receptor

altípusokon keresztül képes módosítani a PPN neuronok aktivitását. A szerotonin receptor stimuláció az ébrenlést fokozza, míg a REM alvást gátolja, posztzinaptikus támadásponton keresztül gátolja a PPN neuronok REM-on neuronjainak, azaz a kolinerg sejtjeinek aktivitását.

Az orexin, ami a táplálékfelvétel szabályozásában is fontos szerepet tölt be, szintén hatással van a PPN sejtjeire, azokon az orexin receptor mindkét altípusa megtalálható. Az orexin képes gátolni mind a REM, mind a non-REM alvást, az ébrenlést támogató hatása van. A ghrelin is képes hatni a PPN kolinerg neuronjaira, ugyanazon neuronok depolarizálódnak hatására, melyek orexin hatására is.

Az M-áram

Az M-áram egy feszültségfüggő, alacsony küszöbű, lassan aktiválódó, nem inaktiválódó káliumáram mely képes szabályozni a neuronok ingerelhetőségét. Többféle metabotróp receptor aktivációja képes gátolni, ilyenek többek között a muszkarinos acetilkolin, angiotenzin, P-anyag, purinerg, szerotonin, és metabotróp glutamát receptorok. Az M-áramért felelős csatorna a KCNQ-, más névenklatúrával Kv7 alegységcsalád elemeiből áll, melyeket KCNQ1-5 (Kv7.1-5) nevekkal illettek. Mivel számos receptor aktivációja képes az M-csatorna zárását előidézni, így ehhez egy vagy több közös másodlagos hírvivő molekula közbenjárása szükséges. Az M-csatornát gátló receptorok főképp G fehérjéhez kapcsolt receptorok, melyek a $G_{q/11}$ fehérjét képesek aktiválni. Az M-áram aktiválhatóságához szükséges egy bizonyos PIP_2 szint a sejtben. A legjobban ismert az az útvonal, ahol a G_q protein aktivációval kiváltott PIP_2 hidrolízise váltja ki az M-áram gátlását. Mivel az M-áram gátlásával növekszik a neuronok ingerelhetősége, így ez akár epilepszia kialakulásához járulhat hozzá.

Az endokannabinoid rendszer

Az endokannabinoidok a neurotranszmisszió fontos szabályozói; a klasszikus leírás szerint az 1-es típusú kannabinoid (CB1) receptor a

neuronokon preszinaptikusan helyezkedik el, emiatt fontos szerepet játszik a szinapszisok működésében. Az endokannabinoidok receptorhoz való kötődésekor $G_{i/o}$ fehérje aktiválódik, ami másodlagos hírvivő molekulákon keresztül különböző hatásokat közvetít. Az endokannabinoidok szerkezetileg membránlipid származékok, és a nevüket onnan kapták, hogy ugyanahhoz a G-fehérje kapcsolt receptorhoz képes kötődni a Cannabis sativa nevű növény egyik hatóanyaga a Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) is. Az agyban és a periférián az arachidonoil etanolamide (AEA vagy más néven anandamid) és a 2-arachidonoil glicerol (2-AG) nevű endokannabinoidok ismertek leginkább.

A kannabinoidok klasszikusan kétféle receptoron képesek hatni, ezek a kannabinoid-1 (CB1) és a kannabinoid-2 (CB2) típusú receptorok. A klasszikus receptorok mellett "novel" receptorok (mint a GPR55 és a GPR119) is ismertek.

Az endokannabinoidok prekursor formájukban a plazmamembránban tárolódnak, így innen szintetizálódnak, majd szabadulnak fel a felszabadulásukhoz szükséges stimuláció hatására.

Az endokannabinoidok fontos funkcionális szereppel bírnak a szinapszisok működésén keresztül létrejövő retrográd szabályozó mechanizmusokban. A kannabinoid receptorok a preszinaptikus

membránban helyezkednek el, így a posztszinaptikus depolarizáció hatására felszabaduló endokannabinoidok az extracelluláris térben a preszinaptikus neuron receptorain kötődve, annak neurotranszmitter felszabadulását gátolják. Ez a gátlás lehet rövid távú (short-term depression – STD), illetve lehet hosszú távú is (long-term depression – LTD), így a rövid távú és a hosszú távú szinaptikus plaszticitásban is szerepük van. A gátlás érvényesülhet a gátló (DSI: a gátlás depolarizáció-indukált csökkentése) és a serkentő (DSE: a serkentés depolarizáció-indukált csökkentése) szinapszisokon.

Újabb kutatások bizonyították, hogy a neuronok mellett az asztrociták is rendelkeznek funkcionális CB1 receptorral.

Asztrocita-neuron kommunikáció

Az utóbbi időben nagy figyelem övezi az gliasejtek valódi szerepét a neuronok számos működésének szabályozásában. A gliasejteken belül elkülöníthetünk különböző típusokat. A központi idegrendszerben makroglia, mint asztrociták, oligodendrociták és ependyma sejtek, valamint mikroglia léteznek, míg a periférián találjuk még a Schwann-sejteket és a szatellita sejteket. Az önálló csoportot képező asztrociták is különböznek egymástól, attól függően, hogy milyen szerepet látnak el, vagy éppen hol helyezkednek el az idegrendszeren belül. Az asztrociták szerepet játszanak a szinapszisok

morfológiai felépítésében, és azok megfelelő működésében. Ezen túl homeosztatikus hatásokat közvetítenek, például az extracelluláris tér ionösszetételének és a neurotranszmitterek szintjének szabályozása. A szinapszisokban úgynevezett háromoldalú szinapszist („tripartite synapse”) képez a pre- és posztzinaptikus sejtekkel, melyekkel aktív feedback kapcsolatot tart. Kimutatták, hogy az asztrocitákon számos neurotransmitter receptor helyezkedik el, például ionotróp és metabotróp glutamát, CB1, GABA_B, és egyéb metabotróp neurotransmitter receptorok.

Az asztrociták elektromosan nem excitábilisak, nem képesek akciós potenciált létrehozni, de jellemző rájuk egy intrinsic celluláris ingerelhetőség, melyet a Ca²⁺ koncentráció intracelluláris változása jellemez (az ún. kalcium excitabilitás). A Ca²⁺ hullámok kialakulása gliotranszmitterek (pl. glutamát) felszabadulását teszik lehetővé, melyek különböző módon befolyásolhatják az asztrociták környezetében található szinapszisok működését.

Az asztrociták optogenetikai aktivációja

Az optogenetika új, gyorsan fejlődő kutatási technika, ami a távolabbi jövőben akár terápiás lehetőségként is szóba jöhet. A technika lényege, hogy fény által kapuzott, eredetileg algában vagy baktériumokban talált ioncsatornákat vagy –transzportereket egyes sejtvonalakkal szelektíven fejeztetnek ki és így fény által befolyásolhatóvá válik az ezt a proteint kifejező sejt ingerlékenysége. A legszélesebb körben használt ilyen ioncsatorna a channelrhodopsin-2 (ChR2), melyet az asztrociták fényaktivációjában alkalmaztunk. Ezt a csatornát a *Chlamydomonas reinhardtii* alga fejezi ki eredetileg, és 470 nm-es kék fénnel aktiválható. A ChR2 egy kationcsatorna, mely kék fény hatására nyílik, Na^+ , K^+ , Ca^{2+} és H^+ ionokra permeábilis. Ezt a kationcsatornát aktiválva a neuronok depolarizálódnak, ami akcióspotenciál-tüzeléshez vezet. Az asztrociták aktivációja részben a depolarizáció, részben a kalciumbeáramlás és az intracelluláris acidózis (valamint feltehetően az asztrociták duzzadása) révén valósul meg.

Az asztrociták által aktivált neuronális áramok

Az asztrociták az extraszinaptikus neurotranszmitterek koncentrációjának szabályozásával képesek befolyásolni a neuronok ingerlékenységét. Az asztrociták által keltett extraszinaptikus áramokat megfigyelték a központi idegrendszerben, melyek nagyságuk,

kinetikájuk, irányuk, az őket kiváltó neurotranszmitterek illetve gliotranszmitterek típusa és azok receptorai szerint csoportosíthatóak. Az extraszinaptikus áramokat irányuk és időtartamuk szerint csoportosítva elkülöníthetünk fázisos lassú kifelé és befelé irányuló, és tónusos serkentő és gátló áramokat.

A fázisos lassú befelé irányuló áramokat ("slow inward current", SIC) jól el tudjuk különíteni a serkentő posztszinaptikus áramoktól (EPSC), mert a SIC-ek különböznek az áram nagyságában és kinetikájában is. Nagyobb amplitúdóval, lassabb felszálló- és leszállószárral jellemezhetők. Kialakulásukban bizonyítottan részt vesz extraszinaptikus NMDA receptorok glutamát és az NMDA receptor koaktivátor D-szerin általi aktivációja.

A lassú kifelé irányuló áramok ("slow outward current", SOC) ritkább események a központi idegrendszerben, mint a SIC-ek. A gátló posztszinaptikus áramoktól (IPSC) nehezebben különíthető el. Kimutatták, hogy a SOC-okat a GABA_A receptorok aktivációja váltja ki.

Tónusos serkentő áramokat is kimutattak több agyi struktúrában is. Asztrocita eredetük nem olyan kizárólagos, mint a SIC-ek esetén, mivel a szinapszisokból szóródó vagy volumentranszmisszióval felszabadított neurotranszmitterek is részt vesznek kialakításukban. A

tónusos serkentő áramok az extraszinaptikus glutamát és az NMDA receptor koaktivátor glicin hatására alakulnak ki. A tónusos gátló áramok extraszinaptikusan elhelyezkedő GABA_A receptorok aktiváció eredményeképpen jönnek létre. A GABÁ-n kívül a glicin is létrehozhat tónusos gátló áramokat.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során kíváncsiak voltunk arra, hogy milyen mechanizmusok vesznek részt a PPN neuromodulációs szabályozásában; léteznek-e a közvetlenül neuronokat érintő szabályozó hatások mellett asztrocitán keresztül érvényesülő mechanizmusok is.

A következő kérdésekre kerestünk választ:

1. Van-e a PPN neuronokon M-típusú káliumáram? Függ-e az M-áram jelenléte sejttípusoktól?
2. Milyen hatást gyakorol az M-áram a neuronok elektrofiziológiai tulajdonságaira?
3. A PPN neuronok CB1 receptor stimuláció hatására bekövetkező tónusos serkentésében vagy gátlásában milyen szerep jut az asztrocitáknak és a metabotróp glutamátreceptoroknak?
4. A preszinaptikus CB1 receptor aktiváció kifejti-e gátló hatást a PPN szinaptikus neurotranszmissziójára? Módosítják-e asztrocita-függő hatások a preszinaptikus CB1 receptor aktivációjának hatását?

ESZKÖZÖK ÉS MÓDSZEREK

Oldatok

Kísérleteinkhez mesterséges agy-gerincvelői folyadékot (aCSF) használtunk. A preparáláshoz egy módosított összetételű (alacsony Na-tartalmú) agy-gerincvelői folyadékot használtunk, melyben a NaCl egy részét lecseréltük szacharózra és glicerolra.

Az elektrofiziológiai méréseknél K-glükonát tartalmú belső oldatot használtunk a pipettában, melynek ozmolaritása megegyezett a sejt belsejében lévő ozmolaritással. A belső oldat biocytint is tartalmazott, melyet közvetlenül a mérés előtt mértünk bele.

A kalcium koncentráció mérése Oregon Green 488 1,2-bis(o-aminofenoxi)etán-N,N,N',N'-tetraecetsav (BAPTA-1) acetoximetilészter (AM) formájának, ezáltal sejtbe bejutó fluoreszcens indikátorfesték használatával történt.

Állatok és preparálás

Kísérleteinkhez 9-16 napos egereket használtunk fel, mindkét nemből. Egyes kísérletekhez olyan törzseket alkalmaztunk, amelyek GAD2- (glutamát dekarboxiláz 2) vagy ChAT- (kolin acetil-transzferáz) függő módon fejeztek ki egy tdTomato nevű fluoreszcens fehérjét. Ezen

egerek tenyésztéséhez a cre-lox rendszert használtuk, ahol az egyik szülő promoter-specifikusan fejezi ki a cre rekombinázt, a másik szülő genomjában megtalálható a kifejeztetni kívánt fehérje génje, de annak átíródását egy lox-P site-okkal határolt stop kodon akadályozza meg. További kísérleteinkhez channelrhodopsin-2-t (ChR2) gliális fibrilláris savas fehérje („glial fibrillary acidic protein”; GFAP)-függő módon kifejező egérre volt szükségünk. Néhány kísérletben konstitucionális CB1 receptor knockout egereket is felhasználtunk. Bizonyos esetekben 9-16 napos C3H (n=7) és C57Bl6 (B6) egereket (n=5) is használtunk, melyek során mindkét nemből használtunk fel állatokat.

Az állatokat dekapitáltuk és a középagyát kipreparálva abból 200 mikrométeres szeleteket készítettünk vibratóm segítségével. A szeleteket 37 °C-on, normál aCSF-ben tartottuk 60 percen át a mérés kezdetéig, mindeközben folyamatosan karbogénnel buborékolattuk a szeleteket tartalmazó kamrát.

Elektrofiziológiai mérések

Mérőrendszerünk magába foglal egy Zeiss Axioskop mikroszkópot, melyhez egy fluoreszcens képalkotó rendszert kapcsoltunk, amely magában foglal egy xenonégő alapú Polychrome V-ös fényforrást, egy CCD kamerát, egy képalkotószabályozó egységet („imaging control unit”; ICU), és a Till Vision szoftvert (Till

Photonics). Ez a rendszer lehetővé teszi a fluoreszcencia intenzitás időben való változásának megfigyelését. A teljes sejtes elrendezésű patch-clamp mérésekhez Axopatch 200A erősítőt használtunk mind feszültség-clamp, mind áram-clamp üzemmódban. Az adatok felvételét, feldolgozását Clampex 10.0 szoftverrel végeztük (Axon Instruments).

A méréseket szobahőmérsékleten végeztük. A mérés során folyamatosan oxigenizáltuk a szeleteket. Az 5-6 M Ω ellenállású patch pipettákat boroszilikát üvegkapillárisokból készítettük Narishige PC-10 pipettahúzó segítségével. Az M-áram mérésekor a neuronokat 1 μ mol/l tetrodotoxinnal kezeltük, és -20 mV tartófeszültségen tartottuk, majd 1 másodperces repolarizáló lépcsőket alkalmaztunk -60-tól -30 mV-ig. Az M-áram farmakológiai elkülönítéséhez 20 μ mol/l XE991-et használtunk, ami az M-áram specifikus blokkolószere. Az áram-clamp méréseket 1 s hosszúságú, -30 - +120 pA nagyságú hiper- és depolarizáló lépcsők alkalmazásával végeztük, majd a kapott adatokból adaptációs indexet (AI) számoltunk. A membránpotenciál-oszcillációk mérésére egy 2 másodperc hosszú úgynevezett rámpa protokollt alkalmaztunk, mely egy lineárisan emelkedő nagyságú áraminjekciót jelent és melynek maximális áramértéke 800 pA volt. Ezeket a méréseket TTX jelenlétében végeztük. Tónusos áramok, spontán és miniatűr EPSC-k és IPSC-k mérésekor, feszültség-clamp üzemmódban a tartó potenciált -60 mV-ra állítottuk. Néhány kísérlet esetében

elektromosan stimuláltuk a vizsgált neuront beidegző preszinaptikus rostokat, melyhez monopoláris elektródot használtunk, amit a szómától 50-100 μm -re helyeztük el. A stimuláló elektródot BioStim STC-7a stimulátor készülékhez csatlakoztattuk (Supertech). Optogenetikai stimulációt végeztünk GFAP-ChR2 egérből származó mintákon, a teljes látótér epifluoreszcens stimulációjával ($480 \pm 5 \text{ nm}$), egy xenon égő alapú Polychrome V-ös fényforrást és a Till Vision szoftvert használva.

Egyes kísérleteknél CB1 receptor agonista WIN55,212-2-t 1 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban alkalmaztuk, míg a szintén CB1 receptor agonista ACEA-t 5 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban. Néhány kísérlethez 10 $\mu\text{mol/l}$ NBQX-et, 50 $\mu\text{mol/l}$ D-AP5-öt, 1 $\mu\text{mol/l}$ sztrichnint, és 10 $\mu\text{mol/l}$ bikukullint használtunk a gyors szinaptikus neurotranszmisszió gátlására. Metabotróp glutamát receptorok blokkolására CPCCOEt-et, MPEP-et és LY341495-et használtunk.

Intracelluláris kalciummérés

A mérés előtt a szeleteket 45 percig 33 $\mu\text{mol/l}$ Oregon Green 488 BAPTA-1 AM (OGB)-ben inkubáltuk, illetve 20 $\mu\text{mol/l}$ Rhod-2 AM-et is használtunk egyes kísérleteinkhez. A kalciumjeleket a kalcium indikátorral feltöltött sejt szómájáról vettük fel. A fluoreszcencia változását a CCD kamerával rögzítettük, majd a Till Vision szoftverrel elemeztük.

A biocitinnel jelölt sejtek láthatóvá tétele

A pipettaoldattal a sejtbe juttatott biocitinhez kapcsolódó streptavidin molekulát használtuk a sejtek láthatóvá tételéhez, mely Alexa488 fluoreszcens festékkel volt konjugálva. Paraformaldehides fixálást követően a feltárást Tris pufferelt sóoldatban végeztük 60 percre, melyet Triton-X-el és szarvasmarha szérummal egészítettünk ki, majd Streptavidin-Alexa 488-al inkubáltuk 90 percre keresztül.

Immunhisztokémia

Az immunhisztokémiai kísérletek az Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézettel kollaborációban készültek. A kísérletekhez három vad típusú B6 egeret használtunk fel. Az állatokat transzkardiális fixálással fixáltuk, majd ezután az agy eltávolítása következett, ezt utófixáltuk, majd szeleteket készítettünk belőle. A szeleteket először az elsődleges antitest oldatokkal inkubáltuk 2 napon keresztül 4 °C-on, majd ezt egy a megfelelő másodlagos antitestek keverékével való inkubálás követte.

EREDMÉNYEK

Csak a kolinerg neuronok rendelkeznek M-árammal

Kísérleteink első felében a PPN neuronjain érvényesülő direkt neuromodulációs hatások egyikét, az ún. M-áramot vizsgáltuk.

A PPN-ben az M-áram kimutatását célzó kísérleteinkhez egy tdTomato nevű fluoreszcens fehérjét GAD2- vagy ChAT-promóter-függő módon kifejező egértörzseket használtunk fel. Az M-áramot az ún. M-áram relaxációs protokoll segítségével mértük, illetve az áram specifikus blokkoló szerét, az XE991-et használva mutattuk ki az arra érzékeny áramot. Az M-áram relaxációs protokoll alkalmazásával -20 mV tartópotenciálról -60 és -30 mV közötti feszültségértékekre léptettük a membránpotenciált, és ennek hatására történt az M-áramért felelős csatornák lassú záródása. A kolinerg neuronokon való méréseknél, a -40 mV-os feszültséglépcső alkalmazásakor az M-áram átlagos amplitúdója $-53,9 \pm 4,8$ pA volt. Az M-áram egy másik módszerrel is meghatározható, mégpedig szelektív blokkolószere, az XE991 segítségével, amelyet 20 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban alkalmaztunk a mérések során. A kontroll és az XE991-rezisztens áramok különbségének meghatározásával látható az M-áram jelenléte. Ellentétben a kolinerg sejtekkel, a PPN GABAerg sejtei nem rendelkeztek az M-áramhoz hasonló árammal ($n = 36$).

Az M-áram meghatározza a kolinerg és a GABAerg neuronok közötti elektrofiziológiai különbségeket

Vizsgáltuk, hogy az M-áram jelenléte vagy hiánya okoz-e bármilyen elektrofiziológiai különbséget a nucleus pedunculopontinus kolinerg illetve a GABAerg sejtei között. Az áram-clamp mérések során 1 másodperces négyszög áramimpulzusokat alkalmaztunk 50 illetve 100 pA-es amplitúdóval, miközben a membránpotenciált manuálisan -60 mV-ra állítottuk. A két sejtípus között szignifikáns frekvenciakülönbséget figyeltünk meg a létrejött akcióspotenciál-sorozatban. Az adaptációs index (AI) egy olyan jellemző, melyből az derül ki, hogy milyen mértékben csökken az akciós potenciálok frekvenciája egy akcióspotenciál-sorozatban belül. A kolinerg neuronoknál nagy mértékű adaptációt láttunk, míg a GABAerg sejtek jóval kisebb AI értékkel rendelkeztek. Az utóhiperpolarizáció közepes és lassú szakaszairól úgy tartják, hogy az M-áram hatással van nagyságukra. Az utóhiperpolarizációk minden esetben szignifikánsan nagyobbak voltak a kolinerg sejteken, mint a GABAerg sejteken. Annak érdekében, hogy kiderítsük, hogy a szóban forgó sejtípusok közötti eltéréseknek az M-áram az okozója, az M-áram specifikus gátlószerét, az XE991-et alkalmaztuk. Ez a kolinerg neuronokon a tüzelési frekvencia, az AI és az utóhiperpolarizációk amplitúdójának a csökkenését okozta. A vizsgált elektrofiziológiai paramétereket tekintve

az XE991 alkalmazása nem okozott szignifikáns változást a GABAerg sejteken. A kapott adatok azt mutatják, hogy a kolinerg neuronok M-áramának jelenléte fontos szerepet játszik a kolinerg és GABAerg neuronok között a tüzelési frekvenciában illetve ennek adaptációjában.

A magas küszöbű membránpotenciál-oszcillációkat modulálja az M-áram

A következő kísérletsorozatban a magas küszöbű membránpotenciál-oszcillációkat vizsgáltuk. Irodalmi adatok alapján ezek a membránpotenciál változások TTX-rezisztensek, kialakulásukban P/Q- és N-típusú kalciumcsatornák és káliumcsatornák játszanak szerepet. 1 s hosszúságú rámpa áraminjekciót alkalmaztunk 800 pA-es áramerősség maximummal. A mérések során azt láttuk, hogy a kolinerg neuronok nagy része rendelkezett magas küszöbű membránpotenciál oszcillációkkal, míg a GABAerg neuronok esetében egyiknél sem tapasztaltunk nagy amplitúdójú oszcillációkat. Az XE991 hatására az oszcillációk power-je nagymértékben csökkent.

A PPN neuronjain lévő CB1 receptorok stimulációjának szinaptikus és extraszinaptikus hatásai

Kísérleteink második felében kimutattuk, hogy a direkt neuronális hatások mellett a neuromodulációs mechanizmusok egy asztrocita-függő komponenssel is rendelkeznek. Azt tapasztaltuk, hogy az asztrociták aktivációja képes a PPN neuronokon metabotróp glutamát-receptor (mGluR)-függő depolarizációt és hiperpolarizációt is kiváltani.

Munkacsoportunk egy korábbi munkában kimutatta, hogy az 1-es típusú kannabinoid (CB1) receptor agonisták hatására a neuronok többféle módon reagáltak: egyes neuronok depolarizálódtak, mások hiperpolarizálódtak, míg voltak, amelyek nem reagáltak. Jelen munkában célunk volt a kannabinoid receptor stimuláció posztszinaptikus áramokra és a tónusos áramokra kifejtett hatását is megfigyelni, hogy külön tudjuk választani a különböző kannabinoid hatásokat. Árammérést végeztünk feszültség-clamp üzemmódban, -60 mV-os tartó feszültségen. A CB1 agonista WIN55,212-2-t (1 $\mu\text{mol/l}$) adva a rendszerhez, tónusos áramok keletkeztek + 22 és - 22 pA közötti áramerősséggel ($n = 17$). Néhány esetben a CB1 receptor agonista hozzáadásával lassú befelé irányuló áramokat láttunk (SIC). A CB1 knockout mintákban minimális, a vad típusú mintákban mértnél szignifikánsan kisebb tartóáram-változást láttunk. A következő kísérletünkben megpróbáltuk elkülöníteni a CB1 receptor stimuláció által létrejött direkt neuronális hatásokat az indirekt, asztrocita-függő

mechanizmusoktól. A szeleteket előinkubáltuk 1 $\mu\text{mol/l}$ thapsigarginnal, hogy az asztrociták kalcium-excitabilitását gátoljuk. A thapsigargin kezelés után a tartóáram spontán fluktuációja szignifikánsan megnőtt a kezeletlen mintákhoz hasonlóan, de a CB1 receptor agonista nem váltott ki további tartóáram változásokat ($n = 8$). Kísérleteink további részében a posztszinaptikus áramokra gyakorolt kannabinoid hatásokat figyeltük meg. A tartópotenciált -60 mV -ra állítottuk be az áramok mérése közben. A mérés során mind spontán excitatórikus posztszinaptikus áramokat (sEPSC-eket), mind spontán inhibitórikus posztszinaptikus áramokat (sIPSC-eket) is láttunk. A WIN55,212-2 hozzáadására a sEPSC-k frekvenciája növekedést, a sIPSC-k frekvenciája csökkenést mutatott, míg amplitúdójuk nem változott. A thapsigarginnal való előinkubáció befolyásolta a sEPSC-k frekvenciájának változását kannabinoid agonisták hatására. A sEPSC-k frekvenciájának növekedése helyett szignifikáns csökkenést láttunk, a sIPSC-k pedig a thapsigargin nélküli CB1 receptor agonista hatására látottaktól nem mutattak eltérést. Feltételezhetjük, hogy a szinaptikus eseményeket érintő kannabinoid hatás egy CB1 receptoron keresztül létrejött direkt preszinaptikus gátló hatás és egy serkentő neurotranszmissziót fokozó indirekt asztrocita hatás keveréke.

Az asztrociták optogenetikai aktivációjának hatása a PPN neuronjain

Az asztrocita-függő hatásokat a direkt neuronális CB1 receptor stimulációtól való jobb elkülönítés érdekében optogenetikai eljárást alkalmaztunk, amellyel szelektíven tudtuk aktiválni a PPN asztrocitáit. Először is vad típusú és a channelrhodopsin-2 (ChR2) fényaktivált ioncsatornát asztrocita-függő módon kifejező GFAP-ChR2 egerekből készítettünk szeletpreparátumokat, aminek segítségével a neuronok asztrocita-stimulációra adott válaszát figyeltük meg. A látóteret megvilágítottuk és neuronokról teljes-sejtes elrendezésben áram-clamp módban felvételt készítettünk. A megvilágítás hatására a neuronok depolarizálódtak és növekedett a tüzelési frekvenciájuk; feszültség-clamp módban tónusos áramok alakultak ki. Kevés esetben hiperpolarizációt vagy válaszhiányt is láttunk. mGluR gátlószereket alkalmazva azt is megállapítottuk, hogy a II-es csoportú mGluR-ok blokkolása csökkentette a befelé irányuló áramok nagyságát és a tartóáramban bekövetkezett változás szignifikánsan különbözik a kontroll körülmények között látottaktól. A megvilágítás hatására az EPSC-k amplitúdója és frekvenciája is növekedett. II-es csoportú mGluR blokkoló használata majdnem teljesen kivédte a frekvencianövekedést ($n = 12$). A kontroll kísérleteket GFAP-cre állatokon végeztük el ugyanolyan körülmények között, mint a GFAP-ChR2 állatok esetében, viszont a megvilágítás ezekre a mintákra nem gyakorolt hatást.

A CB1 receptor stimuláció által kiváltott direkt szinaptikus hatások

A következő kísérletsorozatban a preszinaptikusan elhelyezkedő CB1 receptor aktiváció hatását vizsgáltuk a serkentő posztszinaptikus áramokra (EPSC). Ehhez páros pulzust 50 Hz-es frekvenciával alkalmazó stimulációval ingereltük a magon belüli preszinaptikus rostokat. A második és első kiváltott EPSC egymáshoz képest mért arányát figyeltük ("paired pulse ratio", PPR) a mérés alatt. Az EPSC-ket folyamatosan detektáltuk, hogy kiderítsük, létezik-e a PPN-ben az excitáció depolarizáció által kiváltott csökkentése ("depolarization-induced suppression of excitation"; DSE), miközben a posztszinaptikus neuront depolarizáltuk. A posztszinaptikus depolarizáció és a WIN55,212-2-t alkalmazása is hasonló változást okozott: az EPSC amplitúdó csökkenését, illetve a PPR növekedését. Ezek a kannabinoid hatások hiányoztak a CB1 knockout állatokban ($n = 17$). Az amplitúdó csökkenése a PPR növekedésével preszinaptikus gátlás létezését sejteti. Amikor a preszinaptikus rostok stimulációját az asztrociták optogenetikai aktivációjával együtt végeztük el, a kiváltott EPSC-ken nem figyeltünk meg szignifikáns változást ($n = 7$).

A kiváltott EPSC-k vizsgálata után, az IPSP-ken érvényesülő direkt és indirekt endokannabinoid hatásokra voltunk kíváncsiak: miniatűr IPSC-ket (mIPSC-ket) vizsgáltunk, KCl-tartalmú belső oldat,

tetrodotoxin (TTX), és ionotróp glutamát receptorok blokkolószerke (D-AP5 és NBQX) használatával. A posztszinaptikus sejt depolarizációja és a WIN alkalmazása is csökkentette a frekvenciát, de az amplitúdóra nem volt hatással (n = 5).

Az előbbi funkcionális kísérleteink szerint a CB1 receptoroknak van egy indirekt, asztrocitán keresztüli és egy direkt preszinaptikus hatása is. Ahhoz, hogy ezeket az eredményeket megerősítsük, a CB1 receptor elhelyezkedését asztrocitán illetve preszinaptikusan kollaborációs partnereink segítségével immunhisztokémiával derítettük fel. A CB1 receptor immunpozitivitás mutatott kolokalizációt a GFAP-val, VGLUT2-vel és VGAT-tal, de alig láttunk kolokalizációt a ChAT-tal.

MEGBESZÉLÉS

A nucleus pedunculo pontinuson -mint az alvás-ébrenlétet szabályozó agytörzsi magvak egyikén- jelentős neuromodulációs szabályozó mechanizmusok érvényesülnek. Ezek a mechanizmusok bizonyos esetekben jól ismertek, más esetekben valószínűsíthetően hozzájárulnak a homeosztatis alvásszabályozáshoz. A fenti eredményeink alapján valószínűnek látszik, hogy a neuromodulációs

mechanizmusok hatásainak csak egy része érvényesül közvetlenül a neuronokon, más részük asztrocita-aktiváción keresztül fejt ki hatását.

Az M-áram a PPN kolinerg neuronok egy funkcionális markere

Munkám első felében a neuronokon közvetlenül érvényesülő neuromodulációs mechanizmusok egyik célpontjával, az úgynevezett M-árammal foglalkoztam. A PPN kolinerg sejtjein kimutattuk az M-áram jelenlétét, míg a vizsgált GABAerg sejtekről hiányzott ez a káliumáram.

Bár a PPN a retikuláris aktivációs rendszer kolinerg ágaként ismert, de GABAerg és glutamaterg neuronok is alkotják a magot. A PPN neuronjai többféle szempontból is heterogenitást mutatnak, így csoportosíthatók morfológiai, neurokémiai tulajdonságaik szerint, a sejtekre jellemző elektrofiziológiai tulajdonságok és a kérgi oszcillációkban betöltött szerepük alapján. Kimutattuk, hogy a kolinerg sejtek az M-áram jelenléte vagy hiánya alapján nagy valószínűséggel azonosíthatók, mivel a kolinerg sejtek 91%-án sikerült mérni M-áramot. Ezzel szemben a GAD2-pozitív GABAerg neuronokon egyáltalán nem láttunk M-áramot. A több, mint $0,3 \text{ mV}^2/\text{Hz}$ power-rel rendelkező magas küszöbű oszcillációkról kísérleteink azt mutatták, hogy ez a tulajdonság szintén a kolinerg neuronok egyik funkcionális markerének

tekinthető, mivel a kolinerg neuronok 82%-ában sikerült kimutatnunk, míg ilyen amplitúdójú oszcillációkat nem láttunk GABAerg sejteken.

Az M-áramot az agy számos területén kimutatták, az agytörzsben is megtalálható. Az M-áramért felelős ioncsatorna egy lassan aktiválódó, nem inaktiválódó feszültségfüggő káliumcsatorna. A csatorna nyitását több metabotróp receptor is szabályozza. Az M-áram nyitásától vagy gátlásától a neuronok különböző elektrofiziológiai sajátságai megváltozhatnak: a bemenő ellenállás és a nyugalmi membránpotenciál változtatása miatt az M-áram képes jelentősen szabályozni az ingerelhetőséget. A neuronok depolarizáló impulzusok hatására kialakított tüzelési frekvenciáját is meghatározza, illetve hozzájárul az akcióspotenciál-tüzelési frekvencia adaptáció jelenségéhez, és az utóhiperpolarizáció közepes és késői szakaszának alakulásában is szerepe van. Kísérleteink során azt láttuk, hogy ugyanakkora amplitúdójú áraminjekció hatására különböző frekvenciával tüzeltek a GABAerg és a kolinerg neuronok. A mérésekből kiderült, hogy az M-áram valóban szerepet kap a tüzelési frekvencia csökkenésében és adaptációjában, valamint a közepes utóhiperpolarizáció amplitúdójának kialakításában. A GABAerg sejtek adatait és a kolinerg sejtekről XE991 alkalmazásával mért adatokat összehasonlítva azt kaptuk, hogy az adaptációs indexben, az alacsony frekvencián történő tüzelésben nem látható szignifikáns különbség,

viszont a magasabb depolarizáló feszültséglépcsők hatására létrejövő tüzelési frekvenciában és az utóhiperpolarizáció amplitúdójában szignifikáns különbséget találtunk. Ez az eredmény azt jelzi, hogy az M-áramnak a PPN kolinerg neuronjain a tüzelési frekvencia adaptációban fontos szerepe van, viszont a tüzelési frekvencia és az utóhiperpolarizáció alakulásának tekintetében csak részben járul hozzá ezek megváltozásához az M-áram megléte vagy hiánya.

A PPN egyes neuronjain fiziológiásan jelenlévő magas küszöbű membránpotenciál-oszcilláció mérhető. Egyes szerzők szerint ez az aktivitás béta-gamma tartományú frekvencián történik, míg az in vivo extracellulárisan mért humán adatok az alfa-béta frekvenciatartományt támasztották alá. A jelenségért kálium- és P/Q és N típusú kalciumcsatornák a felelősek. Kísérleteinkkel bemutattuk, hogy a magas küszöbű oszcillációk csak a kolinerg neuronokra jellemző sajátság, melyre nagy befolyással van az M-áram jelenléte. Az XE991-et, az M-áram blokkolószerét használva a kolinerg sejtek oszcillációinak amplitúdóját szignifikánsan csökkentette. Az eredményeink és a karbakol irodalomból ismert, oszcillációkat csak rövid távon gátló hatása megerősíti azt a megfigyelést, miszerint a muszkarinos neuromodulációnak több célpontja van, az M-áram csupán egy, bár fontos elemet alkot ezek közül.

Az endokannabinoid hatások preszinaptikus és asztrocita-függő komponenssel is rendelkeznek

Munkánk második felében a PPN neuronokon érvényesülő endokannabinoid hatások neuronális preszinaptikus és asztrocita-függő extraszinaptikus komponenseit választottuk ketté. A kannabinoid jelátvitel részben direkt preszinaptikus részben indirekt, asztrocitán keresztüli hatásokat közvetít a nucleus pedunculopontinus neuronjain. Az asztrociták specifikus optogenetikai aktivációjával laboratóriumunk korábbi eredményeit sikerült igazolni, miszerint az asztrocita aktiváció mGluR-függő, tónusos neuronális depolarizációt és hiperpolarizációt okoz. A CB1 receptor aktivációnak enyhe serkentő hatása van a serkentő neurotranszmisszióra, gátló hatása van a gátló neurotranszmisszióra. Ez utóbbi valószínűleg a preszinaptikusan elhelyezkedő CB1 receptorok aktivációja miatt történik, míg a serkentő neurotranszmisszióra történő hatásban két tényező szerepel: a serkentő axonvégződéseken elhelyezkedő CB1 receptorokon történő preszinaptikus gátlás és a neuronok aktivitásának növekedése az asztrociták glutamát felszabadításának serkentése.

Az asztrociták aktivációjának eredményeképpen tónusos neuronális befelé és kifelé irányuló áramokat figyeltünk meg. A munkacsoportunk korábbi eredményei szerint, a CB1 receptoron

keresztüli asztrocita aktiváció által kiváltott depolarizáció a II-es csoportú mGluR receptorok blokkolásával gátolható, míg a hiperpolarizációt az I-es csoportú mGluR receptorok blokkolásával lehet gátolni. Ismert, hogy az asztrociták vezikuláris exocitózissal, különböző csatornák és transzporterek segítségével szabadítják fel a glutamátot, és képesek szabályozni az extraszinaptikus glutamát szintjét. Az asztrociták által felszabadított glutamát a környező neuronokon, azok különböző mGluR, AMPA vagy NMDA receptorain képes hatni. Az irodalomban leírták, hogy az extraszinaptikusan található mGluR-k képesek a neuronok membránpotenciálját és tónusos áramaik megváltozását előidézni. Munkacsoportunk korábbi eredményeit sikerült megerősítenünk a tónusos depolarizációval és hiperpolarizációval kapcsolatban, mégpedig azzal, hogy kimutattunk kannabinoid hatásokat a tónusos befelé irányuló és kifelé irányuló áramokra.

Az optogenetika használata lehetővé teszi, hogy szelektív módon aktiváljunk vagy gátoljunk bizonyos sejtpopulációkat. Az asztrociták szelektíven aktiválhatóak GFAP-függő ChR2 expresszió és a ChR2-aktiváció segítségével. Az asztrociták optogenetikai aktivációjával kapcsolatos kísérletek alátámasztották azt az elméletünket, miszerint a PPN neuronok ingerlékenységének tónusos változásai nagyrészt asztrocita eredetű folyamat következményei. Az

asztrociták optogenetikai aktivációja neuronális struktúrák stimulációjához vezet; az optogenetikai aktiváció által kiváltott hatások és az endokannabinoid hatások hasonlóságot mutatnak. Adataink azt az elméletet erősítették meg, miszerint az endokannabinoid hatásoknak a PPN-ben van egy indirekt, asztrocita-függő összetevője is. A depolarizációt és a neuronális tónusos befelé irányuló áramot kiváltja mind a CB1 receptor agonisták alkalmazása, mind az asztrociták optogenetikai aktivációja, és a hatás kivédhető a II-es csoportú mGluR receptorok blokkolásával.

Azon túl, hogy előzetes adatainkat alátámasztottuk az asztrocita-függő tónusos aktivációval és gátlással kapcsolatban a PPN sejtjein többféle módszerrel, azt is megmutattuk, hogy a szinaptikus neurotranszmissziót is direkt és indirekt endokannabinoid hatások modulálják a PPN-ben. Jól ismert, hogy a CB1 receptorok túlnyomórészt preszinaptikusan helyezkednek el mind serkentő, mind gátló szinapszisokban. Egyre több a bizonyíték arra is, hogy a CB1 receptor preszinaptikus elhelyezkedése mellett az asztrocitákon szintén megtalálható a receptor a különböző agyterületeken. Kimutattuk, hogy a PPN-ben is előfordul preszinaptikus és asztrocita- CB1 receptor. A gátló és a serkentő neurotranszmisszió CB1 receptor által történő preszinaptikus gátlása egy régóta ismert jelenség, amit először a kisagyban és a hippocampusban írtak le. Jelen munkában elsőként

mutattuk be, hogy a PPN-ben létezik a DSE és a DSI jelensége. A CB1 receptor agonistái minden esetben csökkentették a sIPSC-k és mIPSC-k frekvenciáját, de nem változtatták meg a amplitúdójukat. Ezzel szemben, a sEPSC-k frekvenciája növekedett a CB1 receptor agonista WIN55,212-2 alkalmazására. A preszinaptikus rostok stimulációja által kiváltott EPSC-k esetén, mind a posztszinaptikus depolarizáció, mind a CB1 receptor agonisták preszinaptikus gátlást okoztak az esetek többségében. Irodalmi adatokból ismert, hogy a fokozott neuronális aktivitás, mely endokannabinoid termelődést eredményez, asztrocita eredetű glutamátfelszabadulást okoz. Ez a glutamát a glutamaterg szinapszisokat képes facilitálni vagy NMDA receptoron keresztül hosszú távú depressziót okozni. Megfigyeltük, hogy a PPN-ben létezik egy asztrocita-függő, EPSC-k frekvenciáját növelő hatás, és ez képes elfedni a preszinaptikus CB1 receptorok gátló hatását. Továbbá, az asztrociták optogenetikai aktivációja növelte az sEPSC-k frekvenciáját II-es csoportú mGluR receptorokon keresztül. Ezzel szemben, az asztrociták optogenetikai aktivációja nem gyakorolt érdemi hatást a kiváltott EPSC-kre. Ezek a megfigyelések felvetették annak a lehetőségét, hogy a direkt preszinaptikus asztrocita-függő hatások helyett a glutamaterg neuronok asztrociták által, II-es csoportú mGluR receptorokon keresztül fokozott ingerlékenysége fedi el a CB1 receptoron érvényesülő preszinaptikus gátlást. Az, hogy a gátló neurotranszmissziót nem serkentik az indirekt kannabinoid hatások,

felveti a lehetőségét annak, hogy egy coronalis szeletpreparátumban a helyi GABAerg kollaterálisokból kevesebb van, mint a glutamaterg kollaterálisokból.

ÖSSZEFOGLALÁS

A nucleus pedunculopontinus (PPN) a retikuláris aktivációs rendszer egyik kolinerg magja, ami a mezopontin régióban helyezkedik el, és főbb élettani funkciói közé az alvás-ébrenlét és a mozgás szabályozása tartozik. Az alvásszabályozás homeosztatis és cirkadián komponenseiként többféle neuromodulációs hatás érvényesül a PPN neuronjain; ismertek a kolinerg, szerotoninerg, endokannabinoid, orexin- és ghrelin-mediált hatások. Bár az *in vivo* és az *ex vivo*, neuronokon érvényesülő hatások ismertek a PPN neuronokon, a részletes hatásmechanizmusaik nincsenek teljesen feltérképezve. Vizsgálataink célja az volt, hogy a PPN neuronokon érvényesülő kolinerg és endokannabinoid hatások közvetlenül neuronokon vagy közvetve, asztrocita-aktiváción keresztül megvalósuló komponenseit egymástól szétválasszuk.

Megállapítottuk, hogy a kolinerg hatások egyik fontos, közvetlenül a neuronokon érvényesülő hatása az M-áram gátlásán keresztül

érvényesül. Ezt az alacsony küszöbű, lassan aktiválódó káliumáramot csak a kolinerg neuronokon találtuk meg, és a nem-kolinerg vagy az azonosított GABAerg neuronok nem rendelkeztek vele. Az M-áram felelősnek bizonyult a tüzelési frekvencia adaptáció és a közepes utóhiperpolarizáció kialakításáért, valamint effektíven modulálta a kalciumáram-függő magas küszöbű membránpotenciál-oszcillációkat.

Az endokannabinoid szignalizáció PPN-en érvényesülő direkt neuronális és indirekt, asztrocita-függő komponenseit is vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a CB1 receptor aktiváció során létrejövő tónusos serkentő vagy gátló neuronális áramokat asztrocita-aktiváció váltja ki, metabotróp glutamátreceptor-függő módon. A CB1 receptor aktiváció hatásához hasonló neuronális hatásokat láttunk az asztrociták optogenetikai aktivációjával. Az asztrocita-aktiváción keresztül érvényesülő, indirekt hatás mellett közvetlenül a serkentő és gátló szinapszisokon megvalósuló preszinaptikus gátlást is láttunk, amit az asztrocita-függő mechanizmus csak közvetve, a glutamaterg neuronok általános serkentésén keresztül módosít.



Nyilvántartási szám: DEENK/172/2017.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Bordás Csilla
Neptun kód: DRV36B
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Kovács, A., **Bordás, C.**, Blró, T., Hegyi, Z., Antal, M., Szűcs, P., Pál, B.: Direct presynaptic and indirect astrocyte-mediated mechanisms both contribute to endocannabinoid signaling in the pedunculopontine nucleus of mice.
Brain Struct. Funct. 222 (1), 247-266, 2017.
IF: 5.811 (2015)
2. **Bordás, C.**, Kovács, A., Pál, B.: The M-current contributes to high threshold membrane potential oscillations in a cell type-specific way in the pedunculopontine nucleus of mice.
Front. Cell. Neurosci. 9, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fncel.2015.00121>
IF: 4.609





További közlemények

3. Kovács, A., **Bordás, C.**, Pál, B.: Cholinergic and endocannabinoid neuromodulatory effects overlap on neurons of the pedunculo pontine nucleus of mice.
Neuroreport. 26 (5), 273-278, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/doi: 10.1097/WMR.0000000000000342>
IF: 1.343
4. Simándi, Z., Czipa, E., Horváth, A., Kőszeghy, Á., **Bordás, C.**, Pólska, S., Juhász, I., Imre, L., Szabó, G., Dezső, B., Barta, E., Sauer, S., Károlyi, K., Kovács, I., Hutóczki, G., Bognár, L., Klekner, Á., Szűcs, P., Bálint, B. L., Nagy, L.: PRMT1 and PRMT8 regulate retinoic acid-dependent neuronal differentiation with implications to neuropathology.
Stem Cells. 33 (3), 726-741, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/stem.1894>
IF: 5.902

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 17,665

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
10,42

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2017.06.07.

