Térfüggő mechanizmusok szerepe a hippocampalis szemcsesejtek dendritikus információfeldolgozásában

Doktori tézisek

Brunner János

Semmelweis Egyetem
Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola

Témavezető:
Szabadics János, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók:
Dr. Szücs Péter, Ph.D., tudományos főmunkatárs
Dr. Petheő Gábor, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke:
Dr. Enyedi Péter, DSc., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai:
Dr. Halasy Katalin, DSc., egyetemi tanár
Dr. Gerber Gábor, CSc., egyetemi docens

Budapest
2017

1. BEVEZETÉS

A gyrus dentatus agyterület szemcsesejtei aktív résztvevői a hippocampus-ban zajló információ feldolgozási és tanulási folyamatoknak. Egy ilyen összetett feladatkör ellátása sokrétű jelfeldolgozást feltételez a szemcsesejtek dendritjeiben, ezért az ezekben rendelkezésre álló biológiai eszköztár megismerése megkerülhetetlen a szemcsesejtek működésének és a hippocampus által végzett idegi folyamatok megértéséhez. A doktori értekezésemben két olyan tanulmányomat mutatom be, melyek ilyen elemi dendritikus folyamatokat vizsgáltak.

A disszertációm első felében bemutatott kutatás a metabotróp glutamát receptorok 2. csoportjának (mGluII receptoroknak) dendritikus szerepét vizsgálta hippocampalis szemcsesejtekben. A szemcsesejtekben korábban a preszinaptikus folyamatokhoz kapcsolták az mGluII receptorok működését, ahol a szinapszis erősségének rövid és hosszú távú szabályozásában vesznek részt. Bizonyos sejttípusok esetén azonban a szomato-dendritikus régióban is kimutatták az mGluII receptorokat, bár az itt elhelyezkedő – vagyis

posztszinaptikus – receptorok szerepe sokkal kevésbé tisztázott, mint a preszinaptikus hatások. Mivel az anatómiai bizonyítékok arra utaltak, hogy a szemcsesejtek dendritfáján is jelen vannak az mGluII receptorok, első vizsgálataink célja ezek hatásának a megértése volt.

A doktori munkám második részében azt vizsgáltuk meg, hogy a dendritfába visszaterjedő akciós potenciál (vAP) közvetít-e a sejttest általános állapotáról analóg információt a szemcsesejtekben. A klasszikus álláspont szerint az akciós potenciál (AP) tisztán digitális jel, mert a kialakult AP a mindent-vagy-semmit elvnek megfelelően mindig egyforma erősségű. Nemrégiben azonban felfedezték, hogy az axonális AP feszültségjele bizonyos mértékű analóg információt is hordozhat, ami módosítja az AP által közvetített digitális információ tartalmat. Ebben az esetben az axonban terjedő AP nemcsak a sejt aktivitását közvetíti, hanem arról is információt nyújt, hogy milyen általános állapotban volt a sejt az AP keletkezésekor. Ily módon az axonális AP egy analóg és digitális információt egyaránt hordozó hibrid jelnek tekinthető. A vAP más biológiai szerepet tölt be, mint az axonális AP, hiszen nem a többi idegsejt felé

közvetíti az információt, hanem a sejt saját dendritjei számára nyújt visszajelzést a sejt aktivitásáról. Korábban nem volt ismert, hogy a vAP az axonális AP-hoz hasonló hibrid feszültségjelként működik-e, ezért megvizsgáltuk, hogy a vAP képes-e analóg információt is hordozni a szemcsesejtekben.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A doktori munkám első célja az volt, hogy feltárjuk a dendritikus mGluII receptorok élettani szerepét a szemcsesejtekben. Ennek érdekében az alábbi lényegi kérdéseket vizsgáltuk meg:

I/1: Milyen celluláris hatást váltanak ki az mGluII receptorok a szemcsesejtek dendritjein?

I/2: Mi a funkcionális szerepe a dendritikus mGluII hatásoknak a szemcsesejtekre érkező szinaptikus információ feldolgozásában?

I/3: A dendritikus mGluII hatások mennyire tekinthetők általánosnak a hippocampalis sejttípusok között?

Az értekezés második felében bemutatott munkámban azt vizsgáltuk, hogy a szemcsesejtekben képesek-e a

dendritikus vAP-k analóg információtartalom hordozására is, azaz hibrid jelként működnek-e. A kutatás során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

II/1: Függ-e a dendritikus vAP alakja sejttest membránpotenciáljától?

II/2: Tükrözik-e a vAP-k által kiváltott dendritikus kalciumjelek a vAP alakjában kódolt analóg információtartalmat, és ha igen, akkor milyen mechanizmusok biztosítják a kapcsolatot a szemcsesejtek szomatikus membránpotenciálja és a vAP-hoz köthető kalcium jelek között?

II/3: Milyen funkcionális szerepet játszik a vAP által hordozott analóg információ a szemcsesejt dendritekre érkező szinapszisok szabályozásában?

3. MÓDSZEREK

3.1 Szelet készítés és az elektrofiziológiai mérések

A vizsgálatokat 23-36 napos Wistar patkányok hippocampusából készült 350 µm vastag túlélő agyszelet preparátumon végeztük. A kísérleteket az állatok élettani testhőmérsékletéhez közeli hőmérsékleten (35 C°-on, értekezés első részéhez kapcsolódó mérések) vagy

szobahőmérsékleten (23-28 C°-on, második rész mérései) végeztük. A célzott idegsejt elvezetésekhez infravörös differenciál interferencia kontraszt videó-mikroszkópiát használtunk. A kiválasztott sejt vagy sejt nyúlvány (axon terminális, dendrit) elektromos viselkedését patch-clamp technikával vizsgáltuk. Az elvezető pipettákat K-glükonát alapú intracelluláris oldattal töltöttük fel. Ha szükség volt a sejtek morfológiai tulajdonságainak és sejt-típus specifikus markerfehérjék jelenlétének a vizsgálatára is, akkor az elvezetést követően 2 %-os paraformaldehid oldatban fixáltuk a szeleteket az utólagos anatómiai feldolgozáshoz.

3.2 Számítógépes modellezés

A modellezést NEURON 7.2 szimulációs környezetben végeztük. A dendritikus mGluII receptor hatás tanulmányozása során három, a ModelDb adatbázisában elérhető, részletesen rekonstruált passzív szemcsesejt modellt használtunk (#95960). Az mGluR2 aktivált konduktancia modellje reprodukálta a kísérletesen mért feszültségfüggést. A dendritikus vAP ionáramainak viselkedését egykompartmentes szimulációk segítségével vizsgáltuk meg. Az inaktivációt nem mutató kalciumáram tulajdonságai az N-típusú áramok aktivációs profilján,

míg az inaktiválódó modell viselkedése az R-típusú kalciumáramok tulajdonságain alapult. A két modelláram kombinációja jól közelítette a kísérletesen mért kalciumáramok viselkedését.

3.3 Fluoreszcens kalciumjel mérések

A vAP-k terjedéséhez köthető fluoreszcens kalciumjelek méréséhez Fluo-5F (183 μM) festéket használtunk. A képalkotó eljárástól függően az AP kiváltásával időben összerendezve mértük a kalcium beáramláshoz kötődő fluoreszcens intenzitásváltozást a kiválasztott dendritikus ponton (hagyományos konfokális mérőrendszerrel egy vonal mentén leképezve, 610 vonal/s sebességgel), vagy egyidejűleg a dendritfa nagy részén (spinning disc konfokális mérőrendszer, 93,75 kép/s sebességgel).

3.4 Kételektródás dinamikus-clamp mérések

A kísérletben egy mesterséges konduktanciának megfelelő ionáram segítségével felgyorsítottuk a vAP repolarizációját úgy, hogy egy elektródával mértük a membránpotenciált, és egy másik elektróda segítségével a sejtbe juttattuk a konduktanciának megfelelő áramot. Ezzel egyidejűleg konfokális mérőrendszerrel mértük a vAP-hoz köthető kalciumjeleket a proximális dendritekben. A mesterséges konduktancia modelljét

nukleált patch preparátumon mért inaktiválódó káliumáram alapján hoztuk létre.

3.5 MNI-glutamát fénybontása

MNI-glutamát fénybontásán alapuló technikát használtunk a szinaptikus receptorok működéséből eredő potenciálváltozásokat méréséhez. A térben és időben jól kontrollált glutamát felszabadításhoz egy hagyományos konfokális mérőrendszer 405 nm-es lézer forrását használtuk. A lézer intenzitását úgy állítottuk be, hogy a kiváltott potenciálválaszok nagysága néhány szinapszis egyidejű aktivitásának megfelelő tartományban maradjon.

3.6 A szinaptikus plaszticitás vizsgálata

Szinaptikus jellegű, MNI-glutamát fénybontással kiváltott eseményeket (uEPSP-t) használtunk a plaszticitási folyamatok vizsgálatához. A szinaptikus potencírozódás kiváltásához öt percen keresztül minden másodpercben kiváltottunk egy időben összehangolt AP/uEPSP párt mialatt a kérdésnek megfelelően vagy depolarizált, vagy pedig hiperpolarizált állapotban tartottuk a sejtet membránpotenciálját.

4. EREDMÉNYEK I

4.1 A dendritikus mGluR2 aktivitása G fehérjék közvetítésével hiperpolarizáló hatású GIRK csatornák nyitásához vezet a szemcsesejtekben (I/1. kérdés)

Elsőként megmértük az mGluII receptorok aktivációjának hatását a szemcsesejtek elektromos viselkedésére. Kísérleteinkben az mGluII receptorok specifikus farmakológiai aktiválása voltage-clamp módban kimenő áramot, current-clamp módban hiperpolarizációt eredményezett. Tehát az mGluII receptorok gátló hatást csökkentik a szemcsesejtek ingerelhetőségét. További kísérletekkel bizonyítottuk, hogy az mGluII receptorcsoport két receptora közül csak a 2. típusú metabotróp receptor (mGluR2) felel a mért gátló hatásért. Az mGluR2 által kiváltott ionáram feszültségfüggése és farmakológiai érzékenysége arra utalt, hogy a receptorok G-fehérjéken keresztül GIRK csatornákat nyitnak ki. A különböző sejtalkotók izolált membránjából - szemcsesejtek axon terminális, szomatikus membrán és dendrit - végzett közvetlen elektrofiziológiai méréseink megmutatták, hogy a

mGluR2-aktivált, GIRK-közvetített gátlás a szemcsesejtek dendritjeiről ered.

4.2. mGluR2 aktiválás hatására a GIRK csatornák egy rövid, proximális dendritszakaszon nyílnak ki, amely lehetővé teheti az egyes dendritágak szelektív és egyenletes szabályozását (I/2. kérdés)

A dendriten kinyíló káliumcsatornák térbeli helyzete meghatározhatja a gátlás szinaptikus jelfeldolgozásban betöltött szerepét, ezért megvizsgáltuk, hogy az mGluR2 hol nyitja ki a GIRK csatornákat a dendriteken belül. Kidolgoztunk egy funkcionális vizsgálatot, melyben glutamát fénybontásával szinaptikus válaszokat generáltunk a dendrit egy jól meghatározott pontján, és a sejttestben mérhető válaszokra kifejtett mGluR2 hatás alapján megbecsültük a gátlás dendritikus pozícióját. Számítógépes modellezéssel igazoltuk, hogy a módszerünk valóban alkalmas a konduktancia nyitás helyének azonosítására. Ezek az eredmények azt mutatták, hogy az mGluR2-aktivált GIRK csatornák a dendritfa egy rövid szakaszán találhatóak a sejttesttől 100-130 μm-re. Végezetül, kimutattuk, hogy ezen stratégiai elhelyezkedésből fakadóan, a dendritikus mGluR2 gátlás lehetővé teszi az egyes szemcsesejt

dendritágak funkcionális szerepének szelektív és egyenletes szabályozását.

4.3. A megvizsgált hippocampális sejttípusok közül, az mGluR2 hiperpolarizáló hatása csak a szemcsesejteken figyelhető meg (I/3. kérdés)

Az mGluR2-mediált gátló hatás esetleges szemcsesejt-specifikus hatásának vizsgálatáért, megmértük mGluII agonisták hatását a CA1, CA2 és CA3 piramissejtjeken és a három leggyakoribb DG interneuron típuson: a parvalbumint kifejező, gyorstüzelésű kosársejtekon, a periszomatikus régiót beidegző, szabályosan tüzelő interneuronokon, és a neurogliaform sejteken. Mivel egyik sejttípus sem mutatott a szemcsesejtekben megfigyelthez hasonló mGluR2-mediált gátló hatást, elmondhatjuk, hogy a dendritikus mGluR2 aktiváció hatása nem egy általános sejtes mechanizmus a hippocampus sejtjeiben.

5. EREDMÉNYEK II

5.1 A sejttest membránpotenciálja távolságfüggő módon befolyásolja a vAP alakját (II/1. kérdés)

Tükrözi-e a vAP-k alakja a sejttest általános állapotát? Egyidejű páros méréseket végeztünk a szemcsesejtek sejttestéből és dendritjéből a kérdés megválaszolásához. Eredményeink szerint a sejttest membránpotenciálja távolságfüggő módon hat a vAP alakjára. A sejttest közelében a repolarizáció sebessége, míg a távoli dendritszakaszokon a vAP csúcsa változik a sejttest membránpotenciáljának függvényében.

5.2 A sejttest membránpotenciáljának távolságfüggő hatása megmutatkozik a vAP-hoz köthető dendritikus kalciumjelekben is (II/2. kérdés)

Fluoreszcens kalcium jelek mérésével megvizsgáltuk, hogy a vAP alakjában tárolt analóg információ megjelenik-e a vAP-hoz kötött kalcium beáramlásban a dendriteken. A kísérletek során azt tapasztaltuk, hogy a sejttest membránpotenciálja távolságfüggő módon befolyásolta a dendritikus kalcium jeleket. A hiperpolarizáltabb szomatikus membránpotenciálról kiváltott AP-k kalciumjelei a közeli dendriteken

nagyobbak voltak, mint a depolarizált esetben mérhető jelek. Ezzel szemben a távoli dendritszakaszokon a hiperpolarizáció éppen ellentétes hatást fejtett ki, vagyis a sejttest hiperpolarizációja a kalciumjelek csökkenéséhez vezetett. A kísérleteink azt megmutatták, hogy a sejttest közelében a gyors inaktivációt mutató R-típusú kalciumáramok kulcsszerepet játszanak a vAP alak és a kalcium beáramlás közötti kapcsolat kialakításában.

Ugyanakkor az is bemutattuk számítógépes modellezés használatával, hogy a távoli dendritekben a hiperpolarizáltabb szomatikus membránpotenciálhoz társuló negatívabb vAP csúcs okozza a kalciumjelek csökkenését.

Bizonyítottuk továbbá, hogy a hibrid dendritikus jelátadás képes követni a sejttest feszültségváltozásait fiziológiásan releváns időtartományokban is, például theta oszcilláció alatt.

5.3. A vAP-k analóg információtartalma befolyásolja a szinaptikus plaszticitási folyamatokat a dendritben (II/3. kérdés)

Megvizsgáltuk, hogy a dendritikus szinapszisok képesek-e hasznosítani a vAP hibrid információtartalmát. Az akciós potenciálok egyidejű párosítása MNI-glutamát

fénybontással kiváltott szinaptikus jellegű eseményekkel, az események hosszútávú erősödését eredményezte. Az erősödés mértéke azonban eltért az AP-t megelőző szomatikus membránpotenciáltól függően. Tehát a sejttest membránpotenciálja hatással volt a szinapszisok erősségét szabályozó hosszú távú folyamatokra. Ezen eredményeink azt mutatják, hogy a dendritek képesek hasznosítani a hibrid vAP-ban kódolt analóg információtartalmat.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

Az értekezés fő eredményei a következő pontokban foglalhatók össze:

- A szemcsesejt dendriteken az mGluR2 aktiválása G-fehérjék közvetítésével GIRK csatornák nyitásához vezet.
- Az mGluR2 hatása egy térben körülhatárolt dendritszakaszról ered A dendritikus mGluR2 gátlás stratégiai térbeli elhelyezkedése lehetőséget ad az egyes dendritágak szerepének különálló szabályozására.

- A dendritikus mGluR2 hatást nem általános mechanizmus a hippocampus-ban, a vizsgált sejtek közül csak a szemcsesejteken van jelen.

- A vAP alakja és a hozzá kötődő kalciumjelek képesek analóg információt továbbítani a sejttest állapotáról a dendritek irányába.
- Összetett mechanizmusok térben koordinált működése felelős a dendritikus hibrid jelátadásért.
- A vAP-ban kódolt analóg információtartalom hasznosulhat a disztális dendritek szinapszisaiban, például a plaszticitási folyamatok során.

7. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

I. Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények:

Brunner J , Szabadics J
Analogue modulation of back-propagating action potentials enables dendritic hybrid signalling
NATURE COMMUNICATIONS 7: Paper 13033. 13 p. (2016)

Brunner J , Ster J , Van-Weert S , Andrási T , Neubrandt M , Corti C , Corsi M , Ferraguti F , Gerber U , Szabadics J
Selective Silencing of Individual Dendritic Branches by an mGlu2-Activated Potassium Conductance in Dentate Gyrus Granule Cells
JOURNAL OF NEUROSCIENCE 33:(17) pp. 7285-7298. (2013)

II. Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – eredeti közlemények:

Brunner J , Neubrandt M , Van-Weert S , Andrasi T , Kleine Borgmann FB , Jessberger S , Szabadics J
Adult-born granule cells mature through two functionally distinct states.
ELIFE 3: Paper e03104. 12 p. (2014)

Szabadics J , Varga C , **Brunner J** , Chen K , Soltesz I
Granule cells in the CA3 area
JOURNAL OF NEUROSCIENCE 30:(24) pp. 8296-8307. (2010)