

VÁLTOZATOS FEHÉRJE ELOSZLÁSI MINTÁZATOK ÉS FUNKCIONÁLIS KÖVETKEZMÉNYEIK KÜLÖNBÖZŐ TÉRBELI SKÁLÁKON

Doktori tézisek

Szoboszlay Miklós

Semmelweis Egyetem
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Nusser Zoltán, az MTA rendes tagja,
kutatóprofesszor

Hivatalos bírálók:

Dr. Orbán Gergő, PhD, tudományos tanácsadó

Dr. Petheő Gábor, PhD, egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Geiszt Miklós, az MTA doktora, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Barta Csaba, PhD, egyetemi docens

Dr. Borhegyi Zsolt, PhD, tudományos főmunkatárs

Budapest, 2018

Bevezetés

A központi idegrendszerben található idegsejtek változatossága köszönhető eltérő morfológiai felépítésüknek (a dendrit- és axonfa hossza valamint komplexitása), a sejtmembránjukban különböző szubcelluláris sejtfelszíni eloszlással expresszáldott ioncsatornák heterogenitásának (Golding és mtsai., 2005; Kerti és mtsai., 2012; Kirizs és mtsai., 2014; Hu és Jonas, 2014) és passzív elektromos tulajdonságaiknak. Ez a diverzitás képezi az alapját az különböző idegsejt populációk eltérő információ feldolgozó tulajdonságainak. A képet tovább árnyalja a szinaptikus plaszticitási mechanizmusok széles skálája. Nanoskálán a szinaptikus plaszticitás megnyilvánulhat a szinaptikus fehérjék térbeli átrendeződésében (Tang és mtsai., 2016; Pennacchietti és mtsai., 2017), például a feszültségfüggő kalcium csatornák – melyek preszinaptikusan a Ca^{2+} beáramlásért, ezen keresztül pedig a szinaptikus vezikulák fúziójáért felelősek – térbeli eloszlása, illetve a dokkolt vezikulákhoz viszonyított elrendeződésük a szinaptikus aktív zónán belül kritikusan befolyásolja a szinaptikus vezikulák ürülési valószínűségét (Eggermann és mtsai., 2012).

A központi idegrendszer ezen tulajdonságai inspirálták a doktori munkám és késztettek arra, hogy a különböző információ feldolgozó képességű idegsejtek változatos fehérje eloszlási mintázatait vizsgáljam szubcelluláris és szubszinaptikus térbeli skálákon, kísérletes és elméleti módszerek kombinálásával.

Célkitűzések

1 Kombinált módszer kifejlesztése és validálása ioncsatornák szubcelluláris sejtfelszíni eloszlásainak meghatározására. *In vitro* dendritikus patch-clamp elvezetések végzettem túlélő patkány agyszeletből, majd az elvezetett sejtek 3D morfológiai rekonstrukciója után *in silico* többrekeszes modellekkel illesztettem a kísérleti membránpotenciál változásokat. A módszer validálásához a már korábbi tanulmányokban ismertetett HCN csatornák szubcelluláris sejtfelszíni eloszlását kívántam meghatározni hippocampális CA1 piramis sejteken.

2 A dendritikus és elektromos szinapszisok által létrehozott jelsűrítés mértékének meghatározása elektromosan kapcsolt kisagyi Golgi sejtek hálózatában, továbbá azon tényezők vizsgálata, melyek az elektromos kapcsoltság mértékét befolyásolják.

3 Nanoskálájú fehérje eloszlási mintázatok objektív kvantifikációjára alkalmas módszerek felkutatása és alkalmazása.

Módszerek

Elektrofiziológia: 300 μm vastagságú horizontális agyszeleteket vágtam hím Wistar patkányokból (16 – 22 napos). A patkányokat izofluránnal (Abbott Laboratories) mélyaltatásban dekapitáltam a hatályos törvényi előírásoknak megfelelően. Az agyat a lehető leggyorsabban eltávolítottam a koponyából és egy jeges szacharóz oldatba helyeztem, melynek összetétele a következő

volt (a felsorolt mennyiségek mM-os koncentrációban): szacharóz, 205.2; KCl, 2.5; NaHCO₃, 26; CaCl₂, 0.5; MgCl₂, 5; NaH₂PO₄, 1.25; glukóz, 10; 95% O₂ és 5% CO₂ tartalmú karbogen gázzal telítve. A túlélő agyszeleteket Leica vibratómmal vágtam (VT1200, Leica Microsystems), majd egy merített, ACSF (melynek összetétele mM-os koncentrációban: NaCl, 126; KCl, 2.5; NaHCO₃, 26; CaCl₂, 2; MgCl₂, 2; NaH₂PO₄, 1.25; glukóz, 10; 95% O₂ és 5% CO₂ tartalmú karbogen gázzal telítve (pH = 7.2 – 7.4)) tartalmú kamrában tároltam őket 34 °C-on, melyet fokozatosan szobahőmérsékletre csökkentettem, közelítőleg 1 óra alatt. Az elvezetéseket megegyező összetételű ACSF-ben végeztem 24 °C-on, az agyszeleteket a vágástól számított 5 órában használtam fel.

Az idegsejteket egy Nikon Eclipse FN-1 mikroszkóp segítségével jelenítettem meg infravörös differenciál interferencia kontraszt optikával, valamint egy vízmerítéses objektívvel (40x, 0.8 NA, Nikon). Teljes sejt patch-clamp elvezetéseket végeztem hippocampális CA1 piramissejtek sejttestjéből és apikális dendritjéből Multiclamp 700B erősítő segítségével (Molecular Devices). A regisztrált jeleket 10 kHz-en szűrtem és 50 kHz-en digitalizáltam egy Digidata 1440A interfész segítségével (Molecular Devices). Patch pipettákat vastagfalú boroszilikát üvegapillárisokból készítettem (1.5 mm külső átmérő, 0.86 mm belső; Sutter Instruments; Zeitz Universal Puller; Zeitz-Instrumente Vertriebs vagy P-1000 Micropipette Puller, Sutter Instruments). Szomatikus pipetták esetén 4–7 M Ω , dendritikus pipettáknál 8–14

M Ω volt a csúcscellenállás, a következő intracelluláris oldattal feltöltve őket: 130 mM K-glukonát, 5 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.05 mM EGTA, 10 mM HEPES, 2mM NaATP, 1 mM NaGTP, 10 mM kreatin-foszfát pH = 7.3 titrálva KOH oldattal, továbbá 7 mM biocitin. Az access ellenállás értéke < 15 M Ω szomatikus és \leq 62 M Ω dendritikus (17 – 62 M Ω között, átlag: 37 ± 13 M Ω , n = 22) elvezetések esetén. CA1 piramissejteket -65 mV és -70 mV közötti membránpotenciálon tartottam mind a sejttestből történő, mind a dendritikus elvezetések esetén. Passzív dendritikus elvezetések során az alapértelmezett ASCF tartalmazta a további összetevőket is: 3 mM kinurénsav (Tocris), 20 μ M SR95531, 50 μ M Cd²⁺, 1 μ M TTX (Tocris), 5 mM 4-AP (Tocris) és 40 μ M ZD7288 (Tocris). Minden összetevő a Sigma-tól származik, ha nincs külön jelölve a beszállító.

Számítógépes szimulációk: az elektrofiziológiai elvezetések során a CA1 piramissejteket biocitinnel töltöttem, majd DAB reakciót követően a NeuroLucida szoftver segítségével rekonstruáltam a sejtek 3D morfológiáját. Többrekeszes modelleket a NEURON szimulációs környezetben hoztam létre (Carnevale és Hines, 2006), a szimulációkat szintén a NEURON környezetben futtattam (7.4-es verzió).

A CA1 piramissejtek apikális dendritjéből történő elvezetések egyedi illesztéséhez az R_a paraméter 150 Ω *cm volt (Golding és mtsai., 2005 alapján), míg az R_m és C_m paraméterek iteráltam, míg a NEURON környezet beépített Praxis illesztő

algoritmus megtalálta a legjobb illeszkedést a kísérleti adata. Populációs illesztés esetén szintén a NEURON környezet MulRunFitter platformját használtam, de a populációs illesztési hiba minimalizálásával találtam meg a legjobb illeszkedést a kísérleti adatokra. Az idegsejt modellek térbeli diszkretizációját a d_lambda szabály szerint végeztem (Carnevale és Hines, 2006), 0.1-es értékkel. A szimulációk egy asztali számítógépen futottak, Windows 10 operációs rendszer alatt, „CVMODE” integrációs módszerrel.

Szoftver fejlesztése térbeli pontmintázatok modellezésére és analizésére: A szoftvert (GoldExt) Python-ban fejlesztettem (2.7-es, 64 bites verzió). Ennek segítségével generáltam az egyenletes és csoportosult eloszlásokat, majd összehasonlítottam ezeket a megfelelő Poisson-eloszlásból származó mintázatokkal. A csoportosult eloszlásokban a csoportok számát meghatározó algoritmusokat szintén ezzel a szoftverrel végeztem. A GoldExt a következő kiegészítőket használja: numpy, scipy, matplotlib, scikit-learn (Pedregosa és mtsai., 2011), xlswriter, openpyxl and PyQt4 (utóbbi a grafikus kezelőfelület (GUI) miatt, melyet a Qt Designer segítségével rajzoltam). GoldExt fejlesztése, tesztelése és futtatása egyaránt 64 bites Windows környezetben történt (Windows 10). A szoftver elérhetősége: <https://github.com/nusserlab/GoldExt>.

Eredmények

Hippokampális CA1 piramissejteken a HCN és szivárgó konduktanciák szubcelluláris eloszlása: Hippokampális CA1 piramissejtek apikális dendritjéből végeztem *in vitro* teljes sejt dendritikus elvezetések. A kísérleti membránválaszok lehető legkevesebb változóval történő leírásának céljából az elvezetések során különböző ioncsatorna blokkolókat alkalmaztam az alapértelmezett ACSF oldatban, melyek passzívvá tették ezen idegsejtek sejtmembránját. A kontroll oldatból hiányzott a HCN csatorna blokkoló ZD7288, míg a passzív oldalt tartalmazta ezt az összetevőt is. Az elektrofiziológiai mérések után rekonstruáltam az idegsejtek kiterjedt 3D morfológiáját, majd utolsó lépésként meg kívántam határozni a HCN csatorna távolságfüggő eloszlását ezen idegsejtek apikális dendritje mentén *in silico* többrekeszes modellek segítségével. A sejtek 3D morfológiáját és a kísérleti membránválaszokat a NEURON szimulációs környezetbe importálva lehetőség nyílik azok számítógépes modellezésére, így meghatározva azok passzív elektromos tulajdonságait (R_m , C_m és R_a) egyedi idegsejtek esetén. Először a passzív membránválaszokat illesztettem a modellel, amelyben a szivárgó konduktancia eloszlása egyenletes volt. A lokális HCN konduktancia meghatározása végett a kontroll állapotban felvett kísérletes membránválaszokat is illesztettem. Egyedi sejtek illesztése esetén mind a szivárgó, mind a HCN konduktanciák távolságfüggő eloszlása összhangban volt korábbi publikációkkal (pl. Magee, 1998), ám populációs illesztés

esetén, feltehetően részben a hippocampális CA1 piramisajt populáció nagyfokú heterogenitása miatt, a kísérletes membránválaszokat csak bizonyos esetekben tudta maradéktalanul leírni a modell.

Kisagyi Golgi sejtek közötti elektromos szinapszisok funkcionális tulajdonságai: Célom a Golgi sejtek között megfigyelt, nagyfokú diverzitást mutató elektromos kapcsoltságot befolyásoló tényezők meghatározása volt. A Golgi sejtek passzív elektromos tulajdonságainak meghatározásához *in vitro* két-foton célzott kettős szoma-dendritikus patch-clamp elvezetésekéből származó adatot használtam. A kísérletek során biocitinnel jelölt sejteket morfológiailag rekonstruáltam, majd többrekeszes modelleket generálva ezekből a passzív elektromos paramétereket szabadon iterálva illesztettem a kísérleti adatot, amely a következő eredményt adta: R_m : $3.5 \pm 1.6 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$, C_m : $4.3 \pm 1 \text{ }\mu\text{F}/\text{cm}^2$ és R_a : $92 \pm 115 \text{ }\Omega \cdot \text{cm}$ ($n = 5$). Hogy közvetlenül meghatározzam az R_a és az elektromos szinapszisok konduktanciájának (G_{GJ}) hozzájárulását az elektromos jelek szűréséhez, többrekeszes modelleket készítettem elvezetett Golgi sejt párokból. Az R_m és G_{GJ} paramétereket szekvenciálisan illesztettem, amíg a változás mértéke 5%-nál kevesebb volt két futtatás között. Ez az illesztési protokoll a következő eredményt adta: R_m : $32 \pm 7 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$ és átlagos G_{GJ} : $0.94 \pm 0.35 \text{ nS}$ ($n = 4$ Golgi sejt pár). Végezetül a szimulációk azt mutatták, hogy az elektromos kapcsoltság legfőbb meghatározója a két sejt között található elektromos szinapszisok száma.

Nanoskálájú fehérje eloszlási mintázatok objektív kvantifikációja: Nagy fontossággal bír, hogy a fehérjék eloszlási mintázatait (azaz hogy véletlen, csoportosult vagy egyenletes eloszlásból származik-e az adott minta) objektív módon tudjuk kvantifikálni. Ennek érdekében öt módszer hatékonyságát tettem próbára, melyekkel azt vizsgáltam, hogy képesek-e véletlen pontfolyamatból származó pontthalmazokat elkülöníteni csoportosult eloszlásokból származóaktól. A legközelebbi szomszédtól való távolság illetve egy 2D autokorreláció függvény teljesített a legjobban ebben a tekintetben. Ez a két metrika képes különbséget tenni egyenletes eloszlásból származó pontthalmazok és véletlen folyamatból származó pontthalmazok között is, mind egyedi szinapszisok szintjén, mind populációs szinten. Azt követően, hogy egy adott pontthalmazról objektív módon meghatároztam, hogy csoportosult eloszlásból származik, a csoportok számát kívántam megállapítani. Négy csoportosító algoritmust vizsgáltam, melyek mindegyike olyan, hogy a detektálandó csoportok számát nem kell előre megadni. A négy tesztelt algoritmusból a DBSCAN (Ester és mtsai., 1996) bizonyult a legjobbnak az teljes vizsgált lokalizációs pont sűrűségi skálán.

Következtetések

Doktori munkám során három kutatási programba kapcsolódtam be. Mindhárom megegyezett abban, hogy multidiszciplináris megközelítést követeltek meg a felvetődő

kérdések megválaszolására. Elsőként egy módszert kívántam kifejleszteni, melynek alkalmazásával különböző ioncsatornák sejtfelszíni eloszlását lehet meghatározni. *In vitro* túlélő patkány agyszeletben végzett, dendritikus patch-clamp elektrofiziológiai elvezetések kombinálva a megfelelő farmakológiai ágensek alkalmazásával, az elvezetett idegsejtek háromdimenziós morfológiai rekonstrukciójával majd a kísérleti membránválaszok számítógépes modellezésével sikerült hippokampális CA1 piramisidősejtek HCN csatorna eloszlását meghatározni, amely összhangban volt korábban publikált eredményekkel (Magee, 1998; Lőrincz és mtsai., 2002). Egyedi sejtek esetén a modellek megfelelően leírták a kísérleti adatokat.

A második kutatási feladat során Dr Lőrincz Andrea és Dr Frederic Lanore munkatársaimmal sikerült meghatározunk kisagyi Golgi interneuronok közötti elektromos szinapszisok konduktanciáját (0.94 nS), ezen idegsejtek közötti elektromos szinapszisok csatornáinak nyitási valószínűségét (18%), valamint a Golgi sejtek közötti rendkívül változatos elektromos kapcsolati erősség elsődleges forrásaként azonosítottuk a kapcsolt idegsejtek között fellelhető elektromos szinapszisok számát. Az említett munkafolyamatok során élettani, anatómiai és számítógépes módszerek kombinált alkalmazásával nyertük eredményeinket.

A harmadik munkafázis során mintázatfelismerő algoritmusok kutatása és alkalmazása volt a feladatom abból a célból, hogy különböző szinaptikus fehérjék nanoskálájú

szerveződését objektív módon tudjuk jellemezni. Két egyszerű eljárás, egy térbeli autokorrelációs függvény illetve a legközelebbi szomszédtól való távolság eloszlása képes volt különbséget tenni véletlenszerű, egyenletes és csoportosult ponteloszlások között. Négy csoportosító algoritmussal további betekintést nyerhetünk a csoportosult eloszlást mutató fehérjék szerveződési elveibe. Az összes kipróbált algoritmus egy nyílt forráskodú, Python alapú program formájában került megvalósításra.

Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények:

- Szoboszlay M*, Kirizs T*, Nusser Z
Objective quantification of nanoscale protein distributions.
SCIENTIFIC REPORTS 7:(1) p. 15240. (2017)
*Osztott első szerzők

IF: 4.259 (2016)
- Szoboszlay M*, Lorincz A*, Lanore F*, Vervaeke K,
Silver RA, Nusser Z
Functional Properties of Dendritic Gap Junctions in
Cerebellar Golgi Cells.
NEURON 90:(5) pp. 1043-1056. (2016)
*Osztott első szerzők

IF: 14.024

Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – eredeti közlemények:

- Olah VJ, Szoboszlay M
CA2 Pyramidal Neurons: Biophysically and Anatomically
Predisposed Integrators of Cortical Sensory Information.
JOURNAL OF NEUROSCIENCE 37:(32) pp. 7564-
7566. (2017)
IF: 5.988 (2016)