

**A kosár- és kandelábersejtek anatómiai
tulajdonságainak összehasonlítása az egér
prefrontális agykérgében**

Doktori értekezés

Nagy-Pál Petra

Semmelweis Egyetem Doktori Iskola
Szentágothai János Idegtudományok tagozat



Témavezető: Hájos Norbert, Ph.D, D.Sc

Hivatalos bírálók: Ábrahám Hajnalka, MD, Ph.D, Habil
Adorján István, Ph.D

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Alpár Alán, Ph.D, Habil, D.Sc

Tagok: Wittner Lucia, Ph.D, D.Sc
Zachar Gergely, Ph.D

Budapest
2024

I. Bevezetés

Az agykérgi neuronális hálózatok működésének megértése szempontjából kiemelten fontos ismernünk a különböző típusú - gátló és serkentő - idegsejtek közötti kapcsolatokat és egymással való kommunikációjukat. Annak ellenére, hogy a gátló neuronok csak 10-15%-át teszik ki a teljes agykérgi populációnak, mégis kiemelt szerepet töltenek be a serkentő idegsejtek aktivitásának szinkronizálásában, ezáltal a különböző agyi oszcillációs mintázatok létrehozásában is. A gátlósejteket fontos szerepük és sokszínűségük miatt számos kutatás vizsgálta már, viszont az olyan asszociatív kéregi régiókban, mint a prefrontális kéreg, a gátló mechanizmus számos aspektusa még mindig kevésbé ismert. A prefrontális kéreg szerepet játszik többek között olyan kiemelten fontos agyi funkciókban, mint tanulás, figyelem, asszociáció és döntéshozatal. Az idegsejtek közötti megfelelő kommunikáció ezeket a folyamatokat is nagyban befolyásolhatja, így a kapcsolódásukban bekövetkező apró változások többek között olyan patológiás kórképek kialakulásához vezethetnek, mint a skizofrénia és epilepsziás rohamok. Feltételezhetjük tehát, hogy a gátló neuronális hálózatok működésének pontos megismerése segíthet megérteni a kórképek mögött húzódó pontos mechanizmusokat is.

A kérgi gátlósejteket a célsejtjeik innervációs mintázata alapján négy fő csoportba sorolhatjuk. Ezek közül a periszomatikus gátlósejtek az elmúlt évtizedekben már kiemelt figyelmet kaptak, mivel ezek a sejtek képesek a leghatékonyabban befolyásolni a posztszinaptikus sejtek aktivitását azáltal, hogy az akciós potenciál keletkezési helyéhez eső legközelebbi pontokon idegzik be a sejteket. Egy sejt periszomatikus régiója három jól elkülöníthető részből áll: megkülönböztetjük a sejt szómáját, proximális dendritjeit és axon iniciális szegmentumát. Korábbi tanulmányok megmutatták, hogy különböző kérgi régiókban a szomato-dendritikus régiókra két típusú, eltérő neurokémiai markert kifejező kosársejtől, egyrészt a parvalbumin (PV) kalcium kötő fehérjét kifejező (PVBC – parvalbumin containing basket cell), másrészt az 1-es típusú endocannabinoid receptort (CB1) expresszáló kosársejtektől (CB1/CCKBC – cholecystokinin expressing basket cell), míg az axon iniciális szegmentumra kandelábersejtektől érkezhetsz gátlás. Az egér prefrontális agykérgének területén ezen periszomatikus gátlósejtek pontos morfológiai tulajdonságai és hálózatban betöltött szerepük viszont még továbbra sem teljesen tisztázott.

II. Célkitűzés

Tézisem során a lokális GABAerg neuronok által biztosított periszomatikus gátlás tulajdonságainak vizsgálatával foglalkoztunk az egér prefrontális agykérgében. Kísérleteink során négy fő kérdéskört körbejárva megvizsgáltuk és összehasonlítottuk a periszomatikus gátlósejtek anatómiai tulajdonságait:

- Milyen típusú GABAerg neuronok biztosítják a periszomatikus gátlást az egér prefrontális agykérgében? Megfigyelhető-e a periszomatikus gátlásban réteg szerinti különbség, illetve különböznek-e a periszomatikus gátló neuronok morfológiai tulajdonságaikban és a célsejtek beidegzésében?
- Különböznek-e morfológiai tulajdonságaik tekintetében a kétféle genetikailag módosított egérvonalban vizsgált kandelábersejtek?
- Milyen típusú interneuronokat innerválnak a távoli agyterületekről érkező bemenetek és megfigyelhető-e különbség a rétegek közötti eloszlásban?
- Alkalmazható-e a széles körben használt CaMKII α promótert alkalmazó vírus jelölő technika arra, hogy szelektíven megjelöljük a kérgi piramissejteket?

III. Módszerek

1. Vírus és tracer injektálás

A vírus jelölő technikák fejlődése lehetővé tette az anatómiai vizsgálómódszerek szélesebb körű alkalmazását, a bizonyos típusú sejtek megjelölésétől kezdve a különböző agyterületek között működő idegpályák feltérképezéséig. Kísérleteink során retrográd jelölőanyagok, illetve retrográd terjedő vírusok különböző agyterületekre való injektálásával lehetőségünk nyílt megjelölni az ezekre a különböző agyterületekre vetítő piramissejteket a prefrontális agykéreg területén. Emellett anterográd vírusjelölő technika alkalmazásával a prefrontális agykéreg idegsejtjeinek távoli agyterületekről származó bemeneteit is vizsgálni tudtuk, így tehát a prefrontális kéreg efferens és afferens kapcsolatait is feltérképeztük.

2. Immunhisztokémiai jelölések

Az anatómiai vizsgálómódszerek fontos részét képezik továbbá az immunhisztokémiai jelölések, így kísérleteink során kivétel nélkül mindenhol alkalmaztuk. A fixált agyból, illetve agyszeletekből 30-100 um vastagságú metszeteket készítettünk Vibratome (Leica VT1000S) segítségével, majd alaposan kimostuk a metszeteket foszfát pufferben (4-5 alkalommal,

alkalmanként 10-15 percig). Ezután a fluoreszcens jelölés első lépéseként a prefrontális agykérget tartalmazó metszeteket 30-60 percen keresztül 10% normál szamar szérumot (NDS, Vector Laboratories), némely esetekben 10% normál kecske szérumot (NGS, Vector Laboratories) és 0,5% TritonX-100-at tartalmazó foszfát pufferben inkubáltuk, ezáltal blokkolva a nem specifikus kötőhelyeket a szövetben. Ezt követően különböző elsődleges antitestek kombinációját, 2% NDS-t vagy NGS-t, 0,5% vagy 2% TritonX-100-at és azidot tartalmazó foszfát pufferben inkubáltuk a metszeteket 1 éjszakán keresztül szobahőn, majd további 3-6 éjszakát 4°C-on. Az elsődleges antitestek alapos kimosása után (4-5 alkalom, alkalmanként 10-15 percig) a másodlagos antitestekkel történő kezelés következett 2-4 órán keresztül a metszet vastagságától függően 1% NDS-t vagy NGS-t tartalmazó foszfát pufferben. A másodlagos antitestek alapos lemosása (4-5 alkalom, alkalmanként 10-15 percig) után a metszeteket tárgylemezre szedtük és Vectashield-del fedtük le. A lefedett anyagról konfokális mikroszkóp segítségével készítettünk megfelelő nagyítású és felbontású képeket a további analízishez.

IV. Eredmények

1. Réteghatárok definiálása az egér prefrontális agykéregében

Mivel ismert, hogy a prefrontális agykéreg különböző rétegeibe más-más agyterületekről érkehetnek bemenetek, így feltételezhetjük, hogy ezek a bemenetek az egyes rétegekben elhelyezkedő sejteket másképp modulálják. Későbbi vizsgálataink során fontosnak tartottuk, hogy ezeket a réteghatárokat is figyelembe vegyünk, viszont az irodalom sajnos nem mutat egységes képet a réteghatárok definiálásáról, így első lépésként különböző transzkripciós faktorok és kalcium kötő fehérje segítségével definiáltuk a prefrontális agykéreg réteghatárait. Immunfestésekkel meghatároztuk, hogy a wolfram szindróma 1 (WFS1) fehérje kijelöli a 2/3-as réteget, a Ctip2 transzkripciós faktor az 5b és 6-os rétegbeli sejtekben fejeződik ki, míg a Forkhead box protein P2 (FoxP2) csak a 6-os rétegbeli sejtekben expresszálódik. Továbbá ismert tény, hogy a prefrontális agykéregben a 4-es réteg hiányzik, így ennek, továbbá az 5a rétegnek a meghatározásához nem volt szükség további markerek használatára, mivel a körülötte lévő rétegek meghatározásával egyértelműen definiálni lehetett az 5a réteget is.

2. A piramissejtekre érkező gátló bemenetek vizsgálata

Ezután kíváncsiak voltunk arra, hogy a piramissejtek periszomatikus régiójára milyen típusú gátló bemenetek érkeznek. Ehhez Kv2.1 kálium csatorna elleni antitesttel megjelöltük a piramissejtek periszomatikus régióit és megszámláltuk a különböző rétegekben elhelyezkedő szómákra érkező gátló vezikuláris GABA transzportert kifejező gátló bemeneteket. Számolásaink megmutatták, hogy a gátló bemenetek közel 90%-a kifejezte vagy a CB1 vagy a PV ellen használt antitestet, így feltételezhetjük, hogy más kérgi régiókhoz hasonlóan az egér prefrontális agykérgében is a kétféle kosársejttípus felelős a periszomatikus gátlásért. Észrevettük továbbá azt is, hogy a mély rétegekben (5b) a szómákra érkező PV/CB1 arány megváltozik a felszíni rétegekhez képest (2/3 és 5a), ezért alaposabban megvizsgáltuk a piramissejtekre érkező gátló bemeneteket a sejt rétegbeli lokalizációja és vetítési helye szerint is. Számolásaink során azt figyeltük meg, hogy a felszíni rétegekben (2/3 és 5a) lévő sejtekre a vetítési helyüktől függetlenül ugyanolyan arányú PV/CB1 bemenet érkezett, míg a mély rétegben (5b) a sejtek egy bizonyos csoportja, amely a periaqueductal gray-be (PAG) vetítettek szignifikánsan nagyobb arányú PV bemenetet kaptak, mint a vele azonos rétegben elhelyezkedő, de más helyre vetítő

sejtek. Így feltételezhetjük, hogy az 5b rétegben elhelyezkedő piramissejtek egy bizonyos csoportjára, amelyek a piramispálya sejtjeit alkotják, a periszomatikus gátlás jelentősebb része PV-s gátlósejtektől ered.

3. A kosársejtek morfológiai tulajdonságainak vizsgálata

A periszomatikus régiókra érkező gátló bemenetek tulajdonságainak alapján megvizsgáltuk a CB1/CCKBC-k és a PVBC-k morfológiáját két különböző transzgenikus egérvonalban. Ehhez elvégeztük a biocitinnel töltött kosársejtek axon- és dendritfájának teljes rekonstrukcióját, majd a réteghatárokat figyelembe véve elemeztük a tulajdonságaikat. A 13 rekonstruált CB1/CCKBC-t két csoportba – felszíni és mély rétegi – tudtuk osztani a szómájuk és dendritfájuk rétegbeli elhelyezkedése alapján. A két csoport axonfájának rétegbeli eloszlása nem mutatott különbséget, így feltételezhetjük, hogy habár a CB1/CCKBC-eket rétegek szerint eltérő bemenetek modulálják, mégis az ugyanabban a rétegben elhelyezkedő piramissejteket idegzik be. A megvizsgált 27 PVBC ezzel szemben nagyobb morfológiai variabilitást mutatott. Őket további három alcsoportra – 2/3-as, 5a és 5b rétegbeli sejtek – tudtunk osztani szómájuk, axonfájuk és dendritfájuk rétegbeli lokalizációja alapján. Megfigyeltük tehát,

hogy a PVBC-k főként azokban a rétegben elhelyezkedő piramis sejteket innerválják, amelyik rétegben a dendritjeik nagy része, így a bemeneteik nagy része is található, ezáltal ezek a sejteket sokkal inkább egy réteg specifikusság jellemzi, szemben a CB1/CCKBC-vel. Elmondható tehát, hogy morfológiailag sokszínű és egymástól jelentősen különböző kosársejt típus található az egér prefrontális agykérgében.

4. A kétféle kosársejt innervációs mintázatának tulajdonságai

Következő lépésként feltérképeztük a kosársejtek célsejtekre adott kontaktusainak számát és eloszlását. Ezen vizsgálat során kvantifikáltuk a Kv2.1 antitesttel kijelölt periszomatikus régiókra, így a szómákra és proximális dendritekre érkező biocitinnel töltött boutonok eloszlását. Mindkét sejt típus esetében közel 7000 boutonot megszámolva azt figyeltük meg, hogy populációs szinten a kosársejtek boutonjaik közel 55%-a a piramis sejtek periszomatikus régióját célozta. Habár az egyes sejtek innervációs mintázata jelentős varianciát mutatott a proximális dendritek beidegzésében, az alcsoportok tekintetében ez mégsem vezetett különbséghez, így feltételezhető, hogy a megfigyelhető variancia inkább az egyes sejtek gátlásának hatékonyságában játszik szerepet. Tovább vizsgálva és összehasonlítva a két különböző kosársejt típus

egysejt szinten azt figyeltük meg, hogy a PVBC-k szignifikánsan több kontaktust adtak az egyes célsejtekre, mint a CB1/CCKBC-k, amely különbség jellemző volt mind a kosársejt szómájának közelében, mind pedig attól távolabb elhelyezkedő piramissejtek tekintetében. Emellett kíváncsiak voltunk arra is, hogy a más-más agyterületre vetítő sejteket eltérő módon idegzik-e be a PVBC-k. Ehhez retrográd jelölő anyagot injektáltunk az agy különböző területire és megvizsgáltuk a prefrontális agykéregben visszajelölt sejtekre érkező biocitin töltött sejtek boutonjainak az eloszlását. Számolásaink során nem találtunk különbséget a más-más agyterületekre vetítő sejtek PVBC-k általi innervációjában. Összességében elmondhatjuk tehát, hogy a morfológiailag jelentősen különböző kosársejtek populációs szinten nem, egysejt szinten viszont jelentős különbségeket mutattak a célsejtek beidegzésében.

5. Különböző egérvonalakból származó kandelábersejtek morfológiai tulajdonságainak összehasonlítása

Transzgenikus technikákat vírusjelöléssel kombinálva lehetőségünk nyílt arra is, hogy genetikailag különböző egérvonalakban – PV-eGFP és Nkx2.1-Cre – vizsgáljuk meg a kandelábersejtek morfológiai tulajdonságait. A biocitinnel

töltött sejtek teljes rekonstrukciója után a kosársejtekhez hasonlóan összehasonlítottuk a sejtek dendrit- és axonfájának rétegek szerinti eloszlását és azt figyeltük meg, hogy a különböző egérvonalakból származó kandelábersejtek mind dendrit- mind az axonfájuk bizonyos tulajdonságaiban eltértek egymástól.

6. Különböző típusú kandelábersejtek innervációs mintázatának vizsgálata

Mivel a különböző egérvonalakban vizsgált kandelábersejtek morfológiai tulajdonságai kissé különböztek egymástól, ezért kíváncsiak voltunk arra is, hogy mutatnak-e ezek a sejtek különbséget a célsejteik beidegzésében. Megvizsgálva a piramissejtek axon iniciális szegmentumára érkező biocitinnel töltött boutonok számát és eloszlását azt figyeltük meg, hogy a PV-eGFP vonalból származó kandelábersejtek szignifikánsan több boutonnal idegezték be az axon iniciális szegmentumokat, mint az Nkx2.1-Cre vonalból származó kandelábersejtek, viszont az Nkx2.1-Cre boutonok a piramissejt szómájához közelebb innerválták az axon iniciális szegmentumokat, mint a PV-eGFP-s sejtek. Elmondható tehát, hogy mind morfológiai, mind az axon iniciális szegmentumra adott kontaktusok

számában különbözik a két különböző egérvonalból származó kandelábersejt.

7. Távoli agyterületekről érkező bemenetek célsejtjei

Ahhoz, hogy megértsük a különböző agyrégiók közötti információ áramlást, szükséges feltérképeznünk, hogy milyen típusú sejtekre érkeznek a bemenetek ezekről az agyterületekről. Korábbi tanulmányok megmutatták, hogy a prefrontális agykéreg bazális amigdalával való szoros kapcsolata kiemelt szerepet játszik a félelmi memórianyomok kialakulásában. Ezért első körben az amigdalából származó monoszintaptikus kapcsolatok célsejtjeit vizsgáltuk meg vírus jelölő technikák és immunhisztokémiai jelölések kombinációjával. Eredményeink megmutatták, hogy a jelölt GABAerg sejtek közül legnagyobb arányban a PV-s idegsejtek kapnak monoszintaptikus bemenetet a bazális amigdalából. Ezen eredmények alapján további két agyterületről származó bemeneteket vizsgáltunk még meg a PV-s sejtek esetében: a talamuszból érkező rostoknak fontos szerepre van a célirányos viselkedésmintázatok megvalósulásában, míg az entorhinális kéregből jövő információ az asszociatív tárgyfelismerésben játszik kiemelkedő szerepet. Összehasonlítva a különböző agyterületekről monoszintaptikus bemenetet kapó PV-s sejtek

rétegek közötti eloszlását a rétegek között megtalálható össze PV-s sejt eloszlásával azt figyeltük meg, hogy a talamuszból és amigdalából származó rostok előszeretettel idegzik be az 5a, illetve 5b rétegekben elhelyezkedő PV-s idegsejteket.

8. A CaMKII α promóter kontrollált víruskonstrukció specifikussága

Végül azért, hogy a periszomatikus gátlóneuronok lokális bemeneteit is feltérképezhessük megvizsgáltuk a széles körben alkalmazott CaMKII α promótert használó vírus jelölő technika specifikusságát a lokális piramissejtekre nézve. Eredményeink megmutatták, hogy a használt víruskonstrukció képes volt a különböző interneuronokat is megfertőzni a prefrontális agykéreg területén, így ezt az eszközt nem találtuk alkalmasnak a periszomatikus gátlóneuronok lokális bemeneteinek a vizsgálatára.

V. Következtetések

A piramissejtekre érkező serkentés-gátlás egyensúlyának szabályozása kiemelkedően fontos a prefrontális agykéreg precíz működése szempontjából, amely szabályozásban a periszomatikus gátlás jelentős szerepet játszik. Kísérleteink során megfigyeltük, hogy az egér prefrontális agykérgében elsősorban két fő típusú gátlósejt, a kosár- és kandelábersejtek felelősek a piramissejtek periszomatikus régiójának beidegzéséért. A CCK-t vagy PV-t kifejező kosársejtek jelentős morfológiai diverzitást mutattak a prefrontális agykérgen belül, így mindkét sejtípust további alcsoportokra tudtuk bontani számájuk, dendritfájuk, illetve a PV-s sejtek esetében axonfájuk rétegbeli elhelyezkedése alapján. Emellett azt is megfigyeltük, hogy populációs szinten nem, egysejt szinten viszont különbözött a két kosársejtípus a posztszinaptikus sejtek innervációjában. Számolásaink megmutatták, hogy egysejt szinten a PVBC-k szignifikánsan több boutonnal innerválták a posztszinaptikus partnereiket, mint a CCKBC-k, ezáltal feltehetőleg erősebb gátlást biztosítanak a prefrontális agykéreg területén. Sikeresen meghatároztuk ezen felül azt is, hogy a különböző agyterületekről származó bemenetek előszeretettel idegzik be a különböző rétegekben elhelyezkedő PV-t kifejező idegsejteket, ezáltal lehetővé téve a PV-s sejtek által biztosított

réteg specifikus előreccatoló gátlást is a prefrontális agykéregben. Eredményeink megmutatták továbbá azt is, hogy a piramis sejtek axon iniciális szegmentumát különböző kandelábersejtek idegzik be. Megvizsgálva az eltérő genetikailag módosított egérvonalból származó kandelábersejtek tulajdonságait azt figyeltük meg, hogy mind morfológiai tulajdonságaikban, mind az axon iniciális szegmentumra adott bemeneteinek számában és eloszlásában is különbözött a két típusú kandelábersejt. Eredményeink megmutatták tehát, hogy a periszomatikus gátlásért morfológiailag jelentősen különböző interneuronok felelősek a prefrontális agykéreg területén, amely különbség feltételezi, hogy ezek a sejtek más-más módokon járulhatnak hozzá a prefrontális agykéreg hálózatának szerveződéséhez és működéséhez.

VI. Saját publikációk jegyzéke

A disszertáció témájához kapcsolódó közlemények:

Nagy-Pal P., Veres J. M., Fekete Zs., Karlocai M. R., Weisz F.,
Barabas B., Reeb Zs., Hajos N.

Structural organisation of perisomatic inhibition in the mouse
medial prefrontal cortex.

JOURNAL OF NEUROSCIENCE (0270-6474 1529-2401):
(2023)

Veres J.M., Andrasi T., Nagy-Pal P., Hajos N.

CaMKII α Promoter-Controlled Circuit Manipulations Target
Both Pyramidal Cells and Inhibitory Interneurons in Cortical
Networks

ENEURO 10 : 4 Paper: 0070-23.2023 , 11 p. (2023)

Egyéb közlemények:

Rhomberg Thomas, Rovira-Esteban Laura, Viktor Attila, Paradiso
Enrica, Kremser Christian, Nagy-Pal Petra, Papp Orsolya I, Tasan
Ramon, Erdelyi Ferenc, Szabo Gabor, Ferraguti Francesco, Hajos
Norbert

Vasoactive Intestinal Polypeptide-Immunoreactive Interneurons
within Circuits of the Mouse Basolateral Amygdala

JOURNAL OF NEUROSCIENCE 38 : 31 pp. 6983-7003. , 21 p.
(2018)