

# A tónusos endokannabinoid jelpálya szabályozásának vizsgálata hippokampális gátló sejteken

Doktori tézisek

**Barti Benjámín**

Semmelweis Egyetem Doktori Iskola  
Szentágothai János Idegtudományi Tagozat



Témavezető:

Dr. Katona István, D.Sc, tudományos tanácsadó

Hivatalos bírálók:

Dr. Schlett Katalin, Ph.D, egyetemi docens  
Dr. Varga Zoltán, Ph.D, egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Gerber Gábor, D.M.D, Ph.D, egyetemi docens

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Kozsurek Márk, M.D, Ph.D, egyetemi tanársegéd  
Dr. Wittner Lucia, D.Sc, tudományos főmunkatárs

Budapest

2024

## 1. Bevezetés

Az idegsejtek között végbemenő neurotranszmisszió egy precíz és összetett molekuláris szerveződés eredménye. A folyamatot szabályozó különböző fehérjék térben és időben is nanoskálán mérhető összehangolt munkával képesek kivitelezni az információtovábbítást serkentő és gátló szinapszisoknál egyaránt. Ennek a sokrétű összetettségnek köszönhető, hogy számos módon befolyásolható a neurotranszmitter felszabadulás valószínűsége, vagyis a szinapszisok erőssége. A molekuláris szerveződési logika kvantitatív megértése az utóbbi időben jelentősen előrehaladt az anterográd szinaptikus transzmisszió esetében. A neurotranszmitter felszabadulást azonban számottevően befolyásolják retrográd visszacsatolási szabályzó folyamatok is a posztzinaptikus célsejt felől, melynek a precíz szerveződési elveiről még keveset tudunk.

Az 1-es típusú kannabinoid receptor ( $CB_1$ ) az egyik legelterjedtebb G-fehérje kapcsolt receptor az agyban, melyen keresztül a retrográd endokannabinoid (eCB) jelátvitel kulcsfontosságú szerepet játszik a szinaptikus kommunikáció finomhangolásában, nem csupán fázisos, de tónusos formában is. A tónusos kannabinoid jelátvitel sejt-típus- és sejt-aktivitás specifikusan játszik jelentős szerepet a szinaptikus erősség beállításában. A jelpálya sérülése számos neurológiai betegséggel hozható összefüggésbe. Fontos szerepe ellenére azonban a pontos szerveződési logikája és molekuláris komponensek, melyek a

szinaptikus kannabinoid tónus működéséért felelősek, mindmáig ismeretlenek. Bizonytalan például, hogy az eCB ligandok közül a diacil-glicerin lipáz- $\alpha$  (DAGL $\alpha$ ) által szintetizált 2-arachidonoil-glicerin (2-AG), vagy a N-acil-foszfatidil-etanolamin-hidrolizáló foszfolipáz D (NAPE-PLD) által előállított anandamid (AEA) játszik-e szerepet a kannabinoid tónus kialakításában.

A CB<sub>1</sub> receptort kifejező kosársejtek idegvégződései, melyek a hippokampális CA1 régió piramissejtjeinek periszomatikus régióján végződnek olyan molekuláris útvonalakkal rendelkeznek, melyek lehetővé teszik mind a fázisos, mind a tónusos eCB jelátvitelt. Ezen kosársejtek fontos szerepet játszanak a memórianyomok kialakításában, ezért a kosársejtek és piramissejtek közötti szinaptikus transzmisszió folyamatos finomhangolása a kannabinoid tónus által jelentős következménnyel járhat ezen folyamatokra nézve sejt-, és hálózati szinten is. Ezen felül, a  $\Delta^9$ -tetrahydrokannabinol (THC) rövid- és hosszútávú alkalmazása is többek közt a CB<sub>1</sub> receptort kifejező gátló idegsejteken keresztül fejt ki negatív hatását a memóriafolyamatokra. Ebből kifolyólag a szinaptikus jelátvitelt célzó változatos kannabinoid-függő szabályozó folyamatok pontos feltárása ezen szinapszisoknál esszenciális a patofiziológia megértéséhez.

Ezek alapján, a tanulmányban sejt típus- sejt kompartment- és nanodomén-specifikus módon vizsgáltuk a tónusos kannabinoid jelátvitelben szerepet játszó molekulákat a CB<sub>1</sub> receptort kifejező kosársejtek és piramissejtek közti szinapszisokban.

## 2. Célkitűzések

Jelen tanulmányban a célkitűzéseink a következők:

**1)** A CB<sub>1</sub> receptort kifejező kosársejtek és CA1 piramis sejtek közt jelen lévő szinapszisok főbb meghatározó sajátosságainak anatómiai és fiziológiai vizsgálata.

- Kalcium-kötő fehérjék azonosítása, melyek a kosársejtek sajátosságos fiziológiájáért lehetnek felelősek.
- A szinaptikus variabilitás vizsgálata elektrofiziológiai és anatómiai módszerekkel.

**2)** A főbb endokannabinoid szintetizáló molekulák tónikus kannabinoid jelátvitelben betöltött szerepének vizsgálata a fent említett szinapszisok esetében.

- Transzgenikus állatorzsek (DAGL $\alpha$  és NAPE-PLD génkiütött egerek) alkalmazása és elektrofiziológiai vizsgálatok kivitelezése, hogy azonosítsuk a 2-AG és az AEA szerepét.

**3)** Egy olyan módszer kidolgozása, amely lehetővé teszi a fehérjék nanoskálájú eloszlásának vizsgálatát egyedileg azonosított szinapszisokban a komplex agyszöveten belül.

- *In vitro* páros patch-clamp elektrofiziológia alkalmazása és kombinálása egyedi molekula detekcióra alkalmas szuper-rezolúciós képalkotással egyedi szinapszisok vizsgálatához.
- CB<sub>1</sub> receptor perturbációs modellek vizsgálata

### 3. Módszerek

#### 3.1. Kísérleti állatok

Mind az elektrofiziológiai, anatómiai és mind az analitikai kísérletekhez hím posztnatális (27-45 nap közötti) C57Bl/6J egereket használtunk. Egyes kísérletekben genetikailag módosított egértörzsek kerültek felhasználásra: CB<sub>1</sub> KO (A. Zimmertől), DAGL $\alpha$  KO (K. Sakimuratól), NAPE-PLD KO (B. Cravatt-tól). Ezekben az esetekben a kontroll mintát mindig az adott törzsből születő vad-típusú alomtárs állatok szolgáltatták. A krónikus kezeléssel modellben hím (22-31 nap közötti) C57Bl/6J egerek napi kétszer lettek intraperitoneálisan injekciózva vagy hordozó anyaggal (1% etanol, 2% Tween 80, fiziológiás sóoldat) vagy THC-vel 6.5 napig.

#### 3.2. Elektrofiziológiai kísérletek

Minden elektrofiziológiai mérés az interneuronokról és a piramissejt párokról egy alámerített elektrofiziológiai kádban készültek, ahol a hőmérséklet 33°C volt, a mintákon pedig folyamatosan oxigéndús mesterséges cerebrospinális folyadék (ACSF) keringett. A patch-clamp elvezetésekhez 3-4 M $\Omega$  ellenállású üvegkapillárisokat használtunk. Az interneuronok elektrofiziológiai tulajdonságainak mérése, valamint a posztszinaptikus gátló áramok elvezetése a piramissejtekről *whole-cell* konfigurációban történt. Az elvezetések közben a gátló sejtek 0.2% biocytinnel lettek megjelölve, amellyel az üvegkapillárison keresztül

mostuk át a sejtet. Néhány kísérletben emellett a piramissejtek is meg lettek jelölve *Cascade Blue* jelölőanyaggal, melyet később fluoreszcensen láthatóvá tehattünk. A farmakológiai kísérletekben AM251-et használtunk a CB<sub>1</sub> receptorok blokkolására, hogy a tónusos kannabinoid jelet mérhessük. A hatás méréséhez az alapvonal 5-10 perces felvétele után az ACSF le lett cserélve AM251-et tartalmazó ACSF-re (10 μM AM251 koncentrációval), a hatást az oldatcserét követő 10-12. percben mértük.

### 3.3. Immunfestések

A tanulmány során végig immunfluoreszcens jelölést alkalmaztunk annak érdekében, hogy láthatóvá tegyük az egyedileg töltött sejteket és az egyes fehérjék eloszlását az agyban. A minták szabadon úszó technikával voltak festve 24 lyukú mintatartó lemezekben. A következő elsődleges antitesteket használtuk adott koncentrációkban: Bassoon (egér, 1:2000, Abcam), AF-405/Cascade Blue (nyúl, 1:1000, Thermo Fisher Scientific), CB<sub>1</sub> (tengerimalac, 1:2000, M. Watanabetól kapott ajándék), CB<sub>1</sub> (nyúl, 1:2000, ImmunoGenes), NECAB1 (nyúl, 1:300, Atlas Antibodies), NECAB2 (nyúl, 1:500, Atlas Antibodies), Parvalbumin (kecske, 1:4000, Swant). A fluoreszcens másodlagos ellenanyagok a Jackson ImmunoResearch cégtől kerültek megrendelésre. Az elektrofiziológiai elvezetést és a szeletek fixálását követően a mintákat háromszor 10 percig mostuk 0.1 M foszfát pufferben (PB), ezt követően pedig 30 percen át 0.5%-os Triton X-100 oldattal

permeabilizáltuk a szöveteket, melyek 0.1 M-os foszfát puffer és 10% normál szamar szérum oldatában (NDS) voltak elvegyítve. A minták ez után streptavidin-konjugált DyLight-488 komponenssel voltak inkubálva, hogy a biocytint láthatóvá tehesük. Három 10 perces 0.1 M PB mosást követően a szeletek üveg tárgylemezre lettek kirakva, majd Vectashield lefedő oldattal lettek lefedve. A fedőlemezt körömlakkal rögzítettük a mintákon. A sejtek morfológiájának konfokális vizsgálata után az agyszzeletek újra 0.1 M PB oldatba kerültek három 10 perces mosás erejéig. A mosások után a mintákat 2%-os agaróz gélbe ágyasztuk, majd a 300 µm vastag szeleteket Leica VT-1000S vibratómmal újrametszettük 10 – 20 µm-re. Az így kapott vékony szeleteken folytak a további immunjelölések. A szeleteket 5% NDS és 0.1%-os Triton X-100-at tartalmazó tris puffer-só oldatba (TBS) tettük 45 percre, majd az elsődleges ellenanyagot tartalmazó TBS oldatban a szeletek egy éjszakán keresztül inkubálódtak szobahőmérsékleten. A következő napon bő mosásokat követően a mintákat másodlagos ellenanyagokkal inkubáltuk TBS-ben szobahőmérsékleten 4 óra hosszan. Végül a minták először TBS-ben, majd PB-ben voltak mosva 3-3-szor 10 percig, majd lefedtük őket: konfokális képalkotás esetében tárgylemezre az előzőekben ismertetett módon Vectashieldben, vagy képalkotó médiumba (5% glükóz, 0.1 M 2-Merkaptoetilamin, 1 mg/ml glükóz oxidáz és 1500 U/ml kataláz Dulbecco-foszfát pufferben), hogy szuper-rezolúciós képalkotást végezzünk rajtuk.

### 3.4. Mikroszkópia

A sejtek morfológiai vizsgálatához a mintákról konfokális z-optikai sorozatfelvételeket készítettünk (1  $\mu\text{m}$ -es z-lépésközzel) 20x objektívvel (numerikus apertúra/ NA : 0.75) egy A1R típusú konfokális mikroszkóppal (Nikon). Azokban a kísérletekben, melyekben szükséges volt a sejt párok közötti anatómiai appozíciók beazonosítása és vizsgálata 60x objektívvel (CFI Plan Apo VC 60X Oil; NA: 1.4) készítettünk sorozatfelvételeket a piramissejtek periszomatikus régiójáról, majd Nyquist mintavételezés alkalmazásával (pixel méret = 0.14  $\mu\text{m}/\text{px}$ , z-irányú lépésköz = 0.125  $\mu\text{m}$ ) nagy felbontású felvételt készítettünk az anatómiai appozíciókról. A szuper rezolúciós sztochasztikus optikai rekonstrukció mikroszkópiához (STORM) Nikon Ti-E invertált mikroszkópot használtunk, amely egy Nikon N-STORM rendszerrel volt felszerelve, valamint egy C2 konfokális rendszerrel és egy a CFI Apo TIRF 100x objektívvel (NA 1.49). A képalkotás Andor iXon Ultra 897 EMCCD kamerával történt. STORM konfigurációban 7 db optikai szeletben 3D-STORM felvételt készítettünk, mely nagymértékben homogén mintagyűjtést tett lehetővé 1000 nm-es területen a metszetben. A korrelált konfokális és STORM képek minden axon terminális esetében a konfokális és a STORM jel először kézzel lett igazítva, majd az adott axon terminálishoz tartozó  $\text{CB}_1$  lokalizációk kerültek elemzésre VividSTORM szoftver segítségével.



### 3.5. Adatelemzés, statisztikai analízis és ábrakészítés

A kísérletekből kinyert adatokat statisztikai módszerekkel kiértékeltek, majd grafikusán ábrázoltuk, melyekhez a GraphPad Prism-10 szoftvert használtuk. A mintaszám a korábbi tapasztalataink és a tudományterületen korábban publikált munkák alapján lett megbecsülve. Az ábrák elkészítéséhez Adobe Photoshop és Illusztrátor programokat használtunk.

## 4. Eredmények

### 4.1. Célsejt függő variabilitás a kosársejt – piramissejt közti szinapszisok erősségében.

A kosársejtek és piramissejtek közti szinapszisok jelentős variabilitást mutatnak a kapcsolatok számában, a gátló áramok amplitúdójában (IPSC) és a sikeres posztszinaptikus gátló események számában is. A kapcsolatok száma a két sejt között átlagosan  $2.7 \pm 1.5$  volt, de előfordultak párok egy-, illetve kilenc összekötő szinapszissal is. Meglepő módon a kapcsolatok száma csupán kismértékben jósolta meg megbízhatóan az IPSC-k méretét vagy a sikeres események számát a párok között ( $n = 55$  pár, IPSC amplitúdó:  $r = 0.25$ ,  $p_{ns} = 0.06$ , sikeres események:  $r = 0.33$ ,  $*p = 0.01$ , Spearman korreláció). Ez a paraméterek olyan varianciából fakad, amely már azon párok között is megfigyelhető, akik azonos számú kapcsolattal vannak összekötve. Annak érdekében, hogy eldöntsük, hogy ezt a varianciát főként a pre- vagy a posztszinaptikus sejt állítja be, szekvenciális párelvezetéseket végeztünk, vagyis egy interneuronhoz tartozó több posztszinaptikus sejtpárból is vezettünk el gátló áramokat. Ezen mérések hasonló eredményt hoztak, mint a párelvezetések esetében ( $n = 22$  pár, IPSC amplitúdó:  $r = 0.002$ ,  $p_{ns} = 0.99$ , sikeres események:  $r = 0.02$ ,  $p_{ns} = 0.91$ , Spearman korreláció). Ezen eredmények rávilágítanak, hogy a vizsgált szinapszisok posztszinaptikus sejt-specifikus variabilitást mutatnak erősségükben.

Az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -puffer fehérjék szintén befolyásolhatják a sejtek elektrofiziológiai tulajdonságait. *In silico* adatbányászat során azonosítottuk az N-terminális EF-kéz kalcium-kötő fehérje 1 és 2 (NECAB1/2). fehérjéket, melyek erős expressziót mutattak a  $\text{CB}_1$  pozitív kosársejtekben. Ezt követően tanulmányoztuk a fehérjék sejten belüli eloszlását. Eredményeink alapján a két fehérje eltérő interneuron kompartmentekben fejeződik ki: míg a NECAB1 főként a szomatodendritikus régióban fordul elő, a NECAB2 előfordulása az axon terminálisokban is megfigyelhető volt. A két fehérje ezáltal kompartment-specifikusan befolyásolhatja a sejten belüli  $\text{Ca}^{2+}$ -jelátviteli dinamikát.

#### 4.2. A tónusos kannabinoid jelátvitel finomhangolja a periszomatikus gátló szinapszisokat.

Fiziológias körülmények között a tónusos kannabinoid jelátvitel folyamatosan szabályozza a kosársejt – piramisneuron kapcsolatokat, ami befolyásolhatja a neurotranszmitter felszabadulás valószínűségét. Ennek pontos vizsgálatára párelvezetések végeztünk  $\text{CB}_1$  vad típusú és géniütött (KO) egerekből származó mintákban, ahol a  $\text{CB}_1$  receptorok aktivitását AM251-el gátoltuk, hogy mérhessük a kannabinoid tónus mértékét. A várakozásoknak megfelelően a vad-típusú mintákban az AM251 alkalmazása növelte az IPSC amplitúdót és a sikeres események számát, míg a KO minták esetében nem változtatta meg a vizsgált

paramétereket (CB<sub>1</sub> vad-típus: n = 11 pár, amplitúdó: \*\*p = 0.006, sikeres események: \*\*\*p=0.0003, CB<sub>1</sub> KO: n = 12 pár, amplitúdó: p<sub>ns</sub> = 0.86; sikeres események: p<sub>ns</sub> = 0.25, Két-utas ANOVA). A KO mintákban emellett alapállapotban is megfigyelhető volt egy csökkenés az IPSC amplitúdók varianciájában (variációs együttható, CV) a vad-típushoz képest (\*p = 0.03), amely alapján feltételezhetjük, hogy a tónusos kannabinoid jelátvitel a szinaptikus variancia 33.6 ± 10.7%-ért felelős.

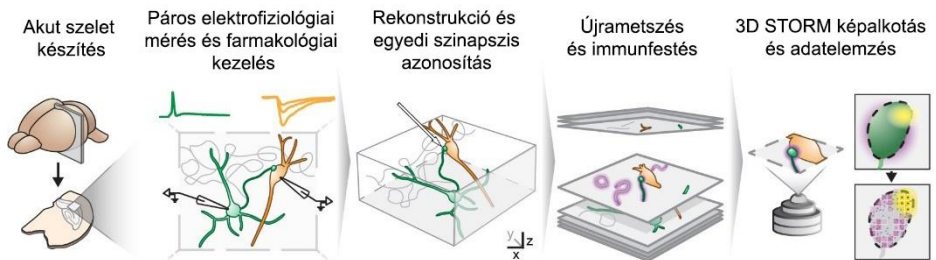
#### 4.3. DAGL $\alpha$ -, NAPE-PLD-független tónusos kannabinoid jelátvitel szabályozza a kosáresejt – piramissejt szinapszisokat.

Következő kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy a két fő eCB lipid közül melyik vesz részt a tónusos kannabinoid jelátvitel szabályozásában. Ennek eldöntésére genetikailag módosított egértörzseket használtunk fel, melyekben vagy a DAGL $\alpha$ , vagy a NAPE-PLD enzim volt kiütve, és így a 2-AG vagy az AEA szintézis volt gátolva. Érdekes módon, páros elvezetések mindkét egértörzsnél intakt tónusos kannabinoid jelátvitelt mutattak: az AM251 minden esetben a vad-típusú kontrollhoz hasonlóan növelte az IPSC amplitúdókat és a sikeres események számát (DAGL $\alpha$  KO: n = 12 pár, amplitúdó: \*p = 0.03, sikeres események: \*p = 0.004; NAPE-PLD KO: n = 7 pár, amplitúdó: \*p = 0.04, sikeres események: \*\*p = 0.003, Két-utas ANOVA). Ezen mérések alapján megállapíthatjuk, hogy a vizsgált

szinapszisokban DAGL $\alpha$ - és NAPE-PLD-független tónusos kannabinoid jelátvitel működik.

#### 4.4. A nanoskálájú CB<sub>1</sub> receptor/effektor sztöchiometria határozza meg a tónusos kannabinoid jelátvitel mértékét.

Mivel sem a 2-AG sem pedig az AEA depléciónak nem változtatta meg a kannabinoid tónus mértékét, a következőkben a CB<sub>1</sub> receptor eloszlását vizsgáltuk meg. A CB<sub>1</sub> receptorok ugyanis konstitutívan is aktívak lehetnek ligandok hiányában. Amennyiben pedig a konstitutív receptor aktivitás határozza meg a tónus mértékét, úgy a receptorok eloszlása a szinapszis területén meghatározónak kell lennie. Annak érdekében, hogy közvetlenül teszteljük ezt a hipotézist, kifejlesztettünk egy munkafolyamatot, melyekben amellet, hogy az egyedi szinapszisok elektrofiziológiai tulajdonságait mérhetjük, korrelált morfológiai, anatómiai és nanoskálájú molekuláris receptor eloszlások vizsgálatára is van lehetőség komplex agyszöveten belül (1. ábra).



**1. ábra:** Korrelált elektrofiziológiai, anatómiai és nanoskálájú molekuláris analízis egyedileg azonosított kosársejt – piramisajt szinapszisokban.

Először elektrofiziológiai elvezetéseket végeztünk kosársejt – piramisajt párokban, mely során rögzítettük a mért IPSC amplitúdók és sikeres események arányát AM251 alkalmazása előtt és után, hogy mérjük a kannabinoid tónus mértékét. Mindkét sejtet feltöltöttük fluoreszcens jelölőanyagokkal, melyek segítségével rekonstruálhattuk a morfológiájukat. Ezt követően nagy nagyításon meghatároztuk a sejtek között lévő anatómiai appozíciók számát, bassoon immunfestéssel (amely fehérje kijelölte a szinaptikus aktív zónát) pedig igazoltuk, hogy az appozíciók funkcionális szinapszisok. A továbbiakban szűrtük a mintáinkat azokra a párokra, melyek között csupán egy szinapszis volt, a szinapszison belül pedig egy konfokális mikroszkópiával feloldható aktív zóna, amely a posztszinaptikus sejt fele nézett. Ezek a megkötések lehetővé tették, hogy a szinapszisoknál megbecsüljük a vezikulafelszabadulási valószínűséget, valamint elvégezhető volt a szinapszisok STORM képalkotással történő vizsgálata is. Az újrametszett 10  $\mu\text{m}$  vastag agyszletekben 3-dimenziós z-optikai metszetet készítettünk az egész axon terminálisról és a rajta lévő  $\text{CB}_1$  receptorokról. A vezikulafelszabadulási valószínűség korrelatív mérése az aktív zóna méretével vagy az axon terminális egész felszínén lévő  $\text{CB}_1$  receptorszámmal nem mutatott összefüggést ( $n = 9$  pár, teljes terminális  $\text{CB}_1$  receptor szám:  $r = 0.05$ ,  $p_{\text{ns}} = 0.90$ , bassoon voxelek száma:  $r = 0.05$ ,  $p_{\text{ns}} = 0.90$ , Spearman korreláció). Azonban, amikor a nanoskálájú sztöchiometriai arányt számoltuk ki az intra/periszinaptikus  $\text{CB}_1$  receptorok számából, és a bassoon voxelek számából a becsült

vezikulafelszabadulási valószínűséggel egy szembetűnő negatív korrelációt tapasztaltunk. ( $r = -0.74$ ,  $*p = 0.03$ ). Ez az összefüggés  $CB_1$  függő volt, hiszen AM251 jelenlétében ugyanazok a szinapszisok már nem mutatták ezt a korrelációt ( $r = -0.05$   $p_{ns} = 0.90$ ). A becsült vezikulafelszabadulási valószínűség továbbá szoros összefüggést mutatott az AM251 hatás mértékével ( $r = -0.8$ ,  $*p = 0.01$ ). Ezekből az eredmények azt mutatják, hogy minél több intra/periszinaptikus  $CB_1$  receptor található az aktív zónához közel, a kannabinoid tónus annál nagyobb hatást fejt ki a szinaptikus transzmisszióra.

#### 4.5. Az extraszinaptikus $CB_1$ receptorok szelektív csökkenése nem befolyásolja a tónusos kannabinoid jelátvitelt.

Amennyiben valóban a receptorok nanodomén szintű eloszlása állítja be a kannabinoid tónust, úgy az intra/periszinaptikus és extraszinaptikus receptorok perturbációja máshogy kell, hogy hasson a jelenségre. Ezért a következőkben perturbációs modellekkel vizsgáltuk, hogyan befolyásolja a receptoreloszlás a kannabinoid tónust.  $CB_1$  heterozigóta (HET) mintákban a  $CB_1$  fehérje szintje felére csökken a kérgi régiókban western-blot kísérletek alapján ( $n = 3$  állat/genotípus,  $*p = 0.04$  egy-utas ANOVA). Ezzel párhuzamosan, a periszomatikus axon terminálisokon is jelentős csökkenést mutat a receptorszám szuperrezolúciós képalkotással vizsgálva ( $***p < 0.0001$ , Mann-Whitney U teszt). Azonban a receptorok mennyisége az aktív zóna közvetlen

közelében megegyezik a vad-típusú mintákkal (0-200 nm:  $p_{ns} = 0.08$ , Mann-Whitney U teszt). Páros elektrofiziológiai mérésekben szintén nem találtunk különbséget a vad-típusú és a CB<sub>1</sub> HET minták között a tónus mértékében, az AM251 kezelés ugyan úgy növelte az amplitúdók és a sikeres események arányát (HET: n = 9 pár, amplitúdók: \*\*p = 0.003, sikeres események: \*\*\* p < 0.0001, két-utas ANOVA). Tehát, az extraszinaptikus receptorok csökkenése nem befolyásolta a kannabinoid tónus mértékét.

#### 4.6. Az *in vivo* THC adminisztráció megrongálja az intra/periszinaptikus nanoskálájú receptor sztöchiometriát és tönkreteszi a kannabinoid tónust.

Korábbi tanulmányokból ismert, hogy a THC, a marihuána pszichoaktív hatóanyaga csökkenti a CB<sub>1</sub> receptorok számát a periszomatikus gátló axon terminálisokon. Eredményeink azonban rávilágítanak, hogy a mikrodomén szintű változásoknak nem feltétlenül van funkcionális következménye, hiszen a CB<sub>1</sub> HET mintákban a jelentős receptorszám csökkenés nem járt szinaptikus változásokkal. Ha viszont a THC adminisztráció nem csupán az extra- de az intra/periszinaptikus receptorok számát is megváltoztatja, az funkcionális következményeket is vonhat maga után a kannabinoid tónusra nézve. Ennek vizsgálata érdekében *in vivo* THC kezelést alkalmaztunk egereken, majd ezt követően akut szeletpreparátumokat készítettünk, melyekben anatómiai



méréseket és páros elektrofiziológiai elvezetéseket végeztünk korrelált szuper-rezolúciós képalkotással. Kísérleteink alapján a THC kezelés hatására az axon terminálisok és az aktív zónák mérete nem mutatott változást, azonban a CB<sub>1</sub> receptorok számának csökkenése kiterjedt az aktív zóna körüli intra/periszinaptikus receptorpopulációra is (0-200 nm: \*\*p = 0.002, Mann-Whitney U teszt). Ezzel párhuzamosan, páros patch-clamp elvezetések a kannabinoid tónus hiányát mutatták a THC kezelt állatokból származó mintákban a csak hordozóanyaggal injektált állatokhoz képest (hordozóanyag: n = 11 pár, amplitúdók: \*\*\*p = 0.0004, sikeres események: \*\*\*p < 0.0001; THC: n = 11 pár, amplitúdók: p<sub>ns</sub> = 0.18, sikeres események: p<sub>ns</sub> = 0.74, Két-utas ANOVA). Ezen felül a THC kezelés csökkentette az IPSC amplitúdók alapállapotú varianciáját is (\*\*p = 0.004). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a THC adminisztráció megzavarja a precíz nanodomén specifikus CB<sub>1</sub> receptor elrendeződést, ezáltal pedig csökkenti a kosársejtek szinaptikus varianciáját. Továbbá, méréseink arra is rámutatnak, hogy a gyógyszer hatásmechanizmusok fiziológiai és patofiziológiai megértéséhez elengedhetetlen a célfehérjék nanodomén specifikus vizsgálata.

## 5. Következtetések

Az alábbi tanulmányban megmutattuk, hogy a retrográd kannabinoid jelátvitel egy speciális formája nélkülözhetetlen a célsejt-specifikus szinaptikus variancia beállításáért a hippocampális gátló szinapszisokban. A tónusos kannabinoid jelátvitel ezen formája nem függ a DAGL $\alpha$  és a NAPE-PLD enzimek aktivitásától. Azáltal, hogy kifejlesztettünk egy kísérleti munkafolyamatot, melyben korrelált elektrofiziológiai, anatómiai és nanoskálájú molekuláris vizsgálatokat végezhattunk egyedi azonosított axon terminálisokon demonstráltuk, hogy a CB<sub>1</sub> receptorok aktív zóna közeli nanoskálájú sztöchiometriája a vezikulafelszabadulást szabályozó molekuláris masinériával közösen állítja be a vezikulafelszabadulás valószínűségét. Ezzel egybefüggően, a szelektív csökkenése az extraszinaptikus CB<sub>1</sub> receptoroknak nem befolyásolja a szinaptikus transzmissziót, míg az *in vivo* THC kezelés hatására megjelenő csökkenés a receptorszámban nem csupán megzavarja a receptorok nanoskálájú sztöchiometriáját, de tönkreteszi a szinapszis-specifikus tónusos kannabinoid szabályzást is. Eredményeink alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a szinapszisokon belül egyedileg állítódik be a szabályozó fehérjék és receptorok sztöchiometrikus aránya, mellyel szabályozható a neurotranszmitter felszabadulás. A feltárt mechanizmus részben magyarázhatja a molekuláris tolerancia jelenségét, mely a kannabisz használat következményeként alakulhat ki.

## 6. Saját publikációk jegyzéke

### A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

**Barti, B.**, Dudok, B., Kenesei, K., Zöldi, M., Miczán, V., Balla, G. Y., Zala, D., Tasso, M., Sagheddu, C., Kisfali, M., Tóth, B., Ledri, M., Vizi, E. S., Melis, M., Barna, L., Lenkei, Z., Soltész, I., and Katona, I. (2024). Presynaptic nanoscale components of retrograde synaptic signaling. *Sci. Adv.*, *10*(22). <https://doi.org/10.1126/sciadv.ado0077>

Miczán, V., Kelemen, K., Glavinics, J. R., László, Z. I., **Barti, B.**, Kenesei, K., Kisfali, M., and Katona, I. (2021). Necab1 and necab2 are prevalent calcium-binding proteins of cb1/cck-positive gabaergic interneurons. *Cereb. Cortex*, *31*(3), 1786–1806. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhaa326>

### Egyéb közlemények

Kis, V., **Barti, B.**, Lippai, M., & Sass, M. (2015). Specialized cortex glial cells accumulate lipid droplets in *Drosophila melanogaster*. *PloS one*, *10*(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131250>

Prokop, S., Ábrányi-Balogh, P., **Barti, B.**, Vámosi, M., Zöldi, M., Barna, L., Urbán, G. M., Tóth, A. D., Dudok, B., Egyed, A., Deng, H., Leggio, G. M., Hunyady, L., van der Stelt, M., Keserű, G. M., and Katona, I. (2021). PharmacOSTORM nanoscale pharmacology reveals cariprazine binding on Islands of Calleja granule cells. *Nat. Commun.*, *12*(1), 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26757-z>