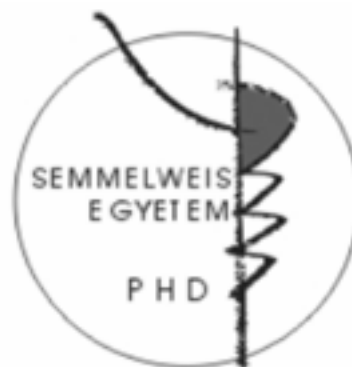


Noradrenerg hatások vizsgálata a prefrontális kéreg piramissejtjeiben két-foton pásztázó lézermikroszkóppal

Doktori tézisek

Dr. Barth Albert Miklós

Semmelweis Egyetem
Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Lendvai Balázs, tudományos főmunkatárs Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Köles László egyetemi adjunktus, Ph.D.
Dr. Tarnawa István osztályvezető, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Gyires Klára tan.vez. egyetemi tanár, D.Sc.
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Füst György egyetemi tanár, D.Sc.
Dr. Jurányi Zsolt, Ph.D.

Budapest
2007

BEVEZETÉS

A munkamemória az egyed számára átmenetileg fontos, hasznos információk rövid távú raktározását megvalósító memóriefajta, amely alapvető jelentőségű a megfelelő viselkedés, cselekvés, érzelmek kialakításában. Hátterében a prefrontális kéreg piramissejtjeinek rövid ideig tartó aktivitásnövekedése, az ún. fenntartott tüzelés áll. A munkamemória megfelelő működésében döntő szerepet játszik a neuromodulátoros környezet: a prefrontális kéregben a katekolaminok hiánya hasonló hatást eredményez, mint a prefrontális kéreg roncsolása. A noradrenalinak a munkamemóriára vonatkozó dózis hatásgörbéje haranggörbét mutat: mind az alacsony, mind a magas noradrenalin szint akadályozza megfelelő működését. A noradrenalin jótékony hatását a poszt-szinaptikus α_2 -, kedvezőtlen hatását az α_1 -, β_1 -adrenoceptorok közvetítik.

Irodalmi adatok szerint a hyperpolarizáció aktiválta kationcsatornák (HCN csatornák) szintén befolyással vannak a prefrontális kéreg működésére: gátlásuk segíti a munkamemória működését, és fokozza az ennek hátterében álló fenntartott tüzelést. A HCN csatornák az α_2 -adrenoceptorokhoz hasonlóan legnagyobb sűrűségben a prefrontális kéreg felszínes rétegeiben találhatóak, a piramissejtek csúcsdendritjein, valamint dendrittüskéin.

A munkamemória hátterében álló fenntartott tüzelés során szabálytalan, nagy frekvenciájú ún. burst tüzelést lehet megfigyelni. Az akciós potenciál burst-ök képesek nagy valószínűséggel transzmitter felszabadulást okozni a kevésbé hatékony gyenge szinapszisokban is, így a kérgi ideghálózatok aktiválódásához járulhatnak hozzá. Irodalmi adatok alapján a piramissejtek disztális dendritjének regeneratív jelei, az ún. dendritikus akciós potenciálok kulcsfontosságúak az akciós potenciál burst-ök kialakulásában.

CÉLKITŰZÉSEK

A munkamemória háttérében a prefrontális kéreg piramisestjeinek aktivitásnövekedése áll (fenntartott tüzelés), amely szabálytalan, nagy frekvenciájú burst tüzeléssel is társul. A noradrenalin az α_2 -, β -adrenoceptorokon keresztül nagymértékben képes befolyásolni a munkamemóriát. A prefrontális kéreg 5. rétegbeli piramisestjein végzett kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy vajon mi lehet az α_2 -, illetve a β -adrenoceptorok munkamemóriára gyakorolt hatásának *sejtszintű mechanizmusa*. Fő célkitűzéseink:

- Regeneratív jelenségek vizsgálata: A fenntartott tüzelés alapját adó regeneratív jelenségek jellemzőit vizsgáltuk: a visszaterjedő akciós potenciálokat (vAP), dendritikus akciós potenciálokat (dendritikus AP-okat).
- A HCN csatornák szerepének vizsgálata: befolyásuk a vAP-ok terjedésére, a dendritikus AP-ok keletkezésére.
- α_2 -Adrenoceptorok szerepének vizsgálata: hatásuk a dendritikus AP-ok kialakulására, kapcsolatuk a HCN csatornákkal.
- β -Adrenoceptorok szerepének vizsgálata: a piramisestek válaszkészségére gyakorolt hatásuk.

MÓDSZEREK

Akut szeletpreparátumok készítése

18-23 napos Wistar patkányok prefrontális kérgéből 300 μm vastagságú szeleteket készítettünk vibratóm segítségével (Vibratome 3000). Az agyszeleteket 30 percig 32 °C-os mesterséges agy-gerincvelői folyadékban (ACSF) inkubáltuk, majd a felhasználás előtt legalább 45 percig szobahőn tároltuk.

Elektrofiziológia

A prefrontális kéreg 5. rétegbeli piramisestjeit infravörös fáziskontraszt eljárással (Differential Interference Contrast) azonosítottuk. Az elektrofiziológiai

elvezetésekhez az elektródákat 1,2 mm külső átmérőjű boroszilikát alapú üvegből húztuk (1,2 mm OD, Harvard Instruments, Germany). Az áramzár (current clamp) felvételekhez a 2,5-4,5 M Ω ellenállású elektródákat 125 mM K-glukonát, 20 mM KCl, 10 mM HEPES, 10 mM foszfo kreatin (DiTris só), 0,3 mM Na-GTP, 4 mM Mg-ATP, 10 mM NaCl és 100 μ M Oregon Green BAPTA-1 tartalmú oldattal töltöttük meg. Az egészsejtes konfiguráció létrejöttét követően azon sejteken végeztünk méréseket, amelyek membránpotenciálja -60 mV-nál negatívabb volt. Az esetek nagy részében 5 vAP-t váltottunk ki szomatikus áraminjekcióval (5 stimulus, 1800 pA, 2-4 ms). A méréseket 32-34 °C-on végeztük.

Két-foton mérések

A kiválasztott sejteket a kalciumot jelölő indikátor (Oregon Green 488 BAPTA-1) membrán impermeabilis formájával töltöttük fel egy patch clamp elektródon keresztül. Az indikátornak megfelelő két-foton gerjesztéshez a lézerefény hullámhosszát 810 nm-re állítottuk. A gerjesztő lézer sugarát az Olympus cég Fluoview szkennere mozgatta a minta felett. A lézersugár okozta sejtkárosodás csökkentéséhez a lehető legkisebb lézer intenzitást használtuk, amely még megfelelő jel/zaj viszonyt biztosított. A nagy időbeli felbontású fluoreszcens képeket line-scan üzemmódban végeztük (2 ms-os maximális időbeli felbontással). A méréseket 40 perccel az egészsejtes konfiguráció létrejötte után kezdtük el. Minden egyes kísérlet végén térbeli sorozatfelvételeket készítettünk, melyből rekonstruálni tudtuk a sejtet. A mérési adatokat Matlabban írt program segítségével elemeztük ki.

Számítások

A kalcium változásokat a fluoreszcens intenzitás változásának ($F-F_0$) és az alapfluoreszcencia (F_0) hányadosaként számítottuk ($\Delta F/F=(F-F_0)/F_0$).

A patch pipettán keresztül a sejtbe juttatott fluoreszcens indikátor koncentrációja nagymértékben változik mind az idő, mind a bejutás helyétől, azaz a sejtesttől vett távolság függvényében. A fluoreszcens kalcium indikátorok pufferként is működnek, így fölvetődik a kérdés, hogy ez a „kívülről bevitt” puffer mennyiben változtatja meg a kalcium homeosztázist, illetve a fluoreszcens tranziensek amplitúdóit.

Matematikai modell alkotásával vizsgáltuk a növekvő indikátorkoncentráció hatását a fluoreszcens tranziensek amplitúdójára. A kísérleti mérések, és a matematikai modell azt mutatták, hogy alacsony indikátorkoncentráció esetén (amely a disztális dendritszakaszokon megfigyelhető) a tranziensek amplitúdói (i) a kiváltó stimulus nagyságától, (ii) az endogén pufferek paramétereitől, (iii) és a kezdeti kalciumkoncentráció változástól függően növekedhetnek, illetve csökkenhetnek is. Eredményeink segítenek elkülöníteni a kalcium dinamika vizsgálatában a biológiai hatásokat a változó indikátorkoncentráció hatásaitól.

EREDMÉNYEK

A vAP-ok által kiváltott kalcium tranziensek frekvencia-, és távolságfüggése

A prefrontális kéreg 5. rétegbeli piramissejtjeiben szomatikus áraminjekcióval különböző frekvenciájú (10-120 Hz), de mindig 5 AP-ból álló sorozatokat váltottunk ki, és a csúcscsodendrit különböző távolságban lévő szakaszain mértük a vAP-ok által kiváltott kalcium tranziensek amplitúdóit. A sejttesthez egészen közeli helyeken (0-50 μm) nem, vagy csak kismértékű frekvenciafüggést figyeltünk meg. A csúcscsodendriten disztális irányban haladva egy adott helyen mérve, a kalcium tranziensek amplitúdói növekedtek a frekvencia függvényében. A legtávolabbi dendritszakaszokon (sejttesttől 600-700 μm -re) az amplitúdók frekvenciafüggése „minden vagy semmi” jelleget mutatott: alacsonyabb frekvenciák nem adtak jelet, míg egy ún. kritikus frekvencián megjelent a kalcium tranziens, amelynek amplitúdója már nem növekedett tovább a frekvencia további növelésével. Ez a „minden vagy semmi” jellegű, frekvenciaküszöbvel rendelkező kalcium tranziens, irodalmi adatok alapján a dendritikus AP megjelenésére utal. Ez a kritikus frekvencia sejtről sejtre viszonylag széles határok között változott, ám az egyes piramissejtben a kísérlet ideje alatt állandónak mutatkozott.

A dendritikus AP-ok és a vAP-ok eltérő feszültségfüggő kalciumcsatornákat aktiválnak

A T/ R-típusú csatornákra szelektív alacsony koncentrációjú nikkell (100 μM) közel teljes mértékben gátolta a kritikus frekvencián megfigyelhető kalcium válaszokat. Ez arra utal, hogy a dendritikus AP-ok kialakulásában döntő szerepet játszanak a T/R-típusú feszültségfüggő kalcium csatornák. Proximálisan a nikkell kismértékben csökkentette a kalcium tranziensek amplitúdóit.

Az elhalás, illetve a dendritikus AP-ok keletkezési helyének kapcsolata a bifurkáció helyével

Az irodalmi adatokkal összhangban az alacsony frekvenciájú vAP sorozatokkal (kritikus frekvencia alatt, továbbiakban: szubkritikus frekvenciák) kiváltott kalcium tranziensek a távolság növekedésével fokozatosan elhaltak. A dendritikus AP megjelenését eredményező kritikus frekvencián, illetve az a fölötti frekvenciákon (továbbiakban: szuprakritikus frekvenciák) a kalcium tranziensek a csúcsdendrit teljes hosszán kimutathatóak voltak, és az amplitúdók eloszlása maximummal rendelkezett (szuprakritikus maximum), ami a dendritikus AP-ok keletkezési helyére utal.

Lineáris extrapoláció segítségével vizsgáltuk az egyes piramissejtekben a különböző szubkritikus frekvenciával kiváltott kalcium tranziensek elhalási helyeit a sejtesttől vett távolság függvényében. Az így kapott elhalási helyek az egyes sejtekben viszonylag rövid dendritszakaszon belül helyezkedtek el.

Mivel a dendritfa morfológiája befolyásolja elektromos tulajdonságait, ezért megvizsgáltuk, hogyan viszonyul egymáshoz az alacsony frekvencián kiváltott kalcium tranziensek elhalásának, a szuprakritikus maximumnak, azaz a dendritikus AP-ok keletkezésének, valamint a bifurkációnak a helye. Eredményeink alapján az elhalási hely 3 esetben közelebb, míg 7 esetben távolabb volt, mint a bifurkáció. A szuprakritikus maximum, azaz a dendritikus AP keletkezési helye az esetek felében a bifurkáció előtt, másik felében utána helyezkedett el, átlagos helye nagymértékben átfedett a bifurkáció átlagos helyével.

A dendritikus AP-ok dendrittűskékben való megjelenése

Megjelennek-e a dendritikus AP-ok ezekben az anatómiai kompartmentekben? A kérdés megválaszolásához egymással szomszédos dendrit-dendrittűske párokban mértük a dendritikus AP-ok megjelenéséhez kapcsolódó kalcium tranzienseket. Ezen mérések szoros korrelációt mutattak a dendrit, és a dendrittűske kalcium válaszok között. A vAP-ok által kiváltott dendritikus AP-ok tehát mind a dendrittörzsben, mind a dendrittűskékben megjelennek.

A hyperpolarizáció aktiválta kationcsatornák (HCN csatornák) gátlásának hatása a dendritikus AP-ok kialakulására

A továbbiakban vizsgáltuk, hogy a HCN csatornák, hogyan befolyásolják a vAP sorozat kiváltotta kalcium tranzienseket, valamint a dendritikus AP-ok keletkezését.

A HCN csatorna gátló ZD 7288-at adtuk a perfúziós oldathoz, és vizsgáltuk a kalcium tranziensekre gyakorolt hatását. Az irodalmi adatokkal összehangban 50 μM ZD 7288 hyperpolarizálta a sejteket. A disztális szakaszon a HCN csatornák gátlásának hatására csökkent a dendritikus AP-ok kiváltásához szükséges kritikus frekvencia, azaz azon frekvenciák is dendritikus AP-ok kialakulását eredményezték, amelyek kontroll körülmények között még küszöb alattinak bizonyultak. 50 μM ZD 7288 hatására a kritikus frekvencia nagymértékben csökkent, 20 μM ZD 7288 kisebb, de még szignifikáns változást okozott. A HCN csatornák gátlásának hatására a dendritikus AP-ok megjelenéséhez kapcsolódó kalcium tranziensek amplitúdói is növekedtek.

A HCN csatornák gátlása csökkentette a dendritikus AP kiváltásához szükséges vAP frekvenciát. Fölmerült a kérdés, hogy vajon elegendő-e kevesebb számú vAP a dendritikus AP megjelenéséhez. Kontroll körülmények között 1, illetve 2 vAP csak kismértékű kalcium szint emelkedést okozott disztálisan, függetlenül a 2 vAP frekvenciájától. 50 μM ZD 7288 jelenlétében azonban már 2, illetve 1 vAP is elegendőnek bizonyult a dendritikus AP kiváltásához.

ZD7288 alkalmazása megnövelte a szomatikus elvezetésben az egyes vAP-okat követő utódepolarizáció nagyságát, valamint több esetben nagyfrekvenciájú AP burst-ök kialakulásához vezetett a dendritikus AP-ok kialakulásával összefüggésben. Ez arra utal, hogy a HCN csatornák gátlása mellett a dendritikus AP-ok sejttestre való terjedése is hatékonyabbá válik.

Az α_2 -adrenoceptorok hatása a dendritikus AP-ok keletkezésére

A HCN csatornák 2-4-es altípusa a cAMP szintjének emelkedésére aktiválódik, így a cAMP útvonalat befolyásoló neurotranszmitterek potenciálisan képesek szabályozni a HCN csatornák működését. Az α_2 -adrenoceptorok és a HCN csatornák jelenlétét kimutatták a prefrontális kéreg 5. rétegbeli piramissejtjeinek csúcsdendritjein, és magatartási vizsgálatokban igazolták, hogy alapvető jelentőségűek a prefrontális kéreghez köthető munkamemória megfelelő működésében. Ezen eredményekre alapozva feltételeztük, hogy a csúcsdendriten elhelyezkedő α_2 -adrenoceptorok képesek a HCN csatornák szabályozásán keresztül a dendritikus AP-ok keletkezését befolyásolni. Az α_2 -agonista klonidint (100 μM) adtuk a perfúziós oldathoz, és mértük a különböző frekvenciájú vAP-ok által kiváltott kalcium tranzienseket. A klonidin, a HCN csatorna gátló ZD 7288-hoz hasonlóan csökkentette a dendritikus AP kiváltásához szükséges kritikus frekvenciát.

A következő lépésben vizsgáltuk, hogy a klonidin hatása α_2 -adrenoceptoron keresztül valósul-e meg. Az α_2 -antagonista RX 821002 (100 μM) megakadályozta a klonidinnak a dendritikus AP küszöbére, azaz a kritikus frekvenciára gyakorolt hatását.

Okklúziós kísérletek segítségével vizsgáltuk a klonidin és a HCN csatornák kapcsolatát. 50 μM ZD 7288 jelenlétében a klonidin már nem tudta tovább csökkenteni a kritikus frekvenciát. A HCN csatornákkal való kapcsolatot feszültségzár (voltage clamp) kísérletek segítségével vizsgáltuk tovább. Negatív parancsfeszültségek megnyitják a HCN csatornákat, és befelé irányuló áramot indítanak meg. Az ily módon aktivált áramot 100 μM klonidin csökkentette.

A fenti mérési eredmények tehát arra utalnak, hogy a klonidin dendritikus AP kialakulására gyakorolt hatását az α_2 -adrenoceptorokon keresztül, a HCN csatornák aktivitásának csökkentése révén fejtí ki.

A noradrenalin hatása a piramissejtek ingerelhetőségére

Más agyi területeken (hippokampusz) a β -adrenoceptorok fontos szerepet játszanak az idegsejtek ingerelhetőségének szabályozásában. Anatómiai vizsgálatokban kimutatták jelenlétüket a prefrontális kéreg 5. rétegbeli piramissejtjeinek sejttestén. A piramissejtek ingerelhetőségének vizsgálatához 650 ms hosszú, különböző amplitúdójú

szomatikus áraminjekcióval váltottunk ki AP sorozatokat, és mértük a sejttesthez közeli bazális dendritszakaszokon a létrejövő kalcium tranzienseket. 10 μM noradrenalin adva a perfúziós oldathoz növekedett a sorozatban az AP-ok száma, és ezzel összefüggően szintén növekedtek a kiváltott kalcium tranziensek amplitúdói.

A tüzelési mintázatuk alapján elkülönülő burst tüzelő, és szabályosan tüzelő sejtek adatait összevetve, nem mutatkozott szignifikáns különbség sem az AP szám, sem a kalcium tranziensek amplitúdójának növekedése mértékében.

A noradrenerg hatás receptorális összetevőjének vizsgálata

A továbbiakban kísérleteket végeztünk, amelyekben a noradrenalin előtt a β -antagonista propranolol (10 μM) adtuk a perfúziós oldathoz. Propranolol mellett a noradrenalin által létrehozott AP szám, és kalcium tranziens amplitúdó növekedés csökkent. A propranolol kimosását követően a noradrenalin ismét képes volt kifejteni hatását. Ezen eredmények arra utalnak, hogy a noradrenalin a prefrontális kéreg piramissejtjeinek válaszkészségét fokozza, és e hatását a β -adrenoceptorok közvetítik.

KÖVETKEZTETÉSEK

- Kísérleteinkben földerítettük a prefrontális kéreg 5. rétegbeli piramissejtjeinek csúcsdendritjében a vAP-ok által kiváltott kalcium tranziensek szómától vett távolság-, valamint a kiváltó vAP sorozat frekvenciájától való függését. Az alacsonyabb frekvenciával, az ún. szubkritikus frekvenciákkal kiváltott kalcium tranziensek fokozatosan elhaltak a dendriten kifelé haladva. Ennél magasabb frekvenciákon, a vAP-ok dendritikus AP-t váltottak ki, így a kalcium tranziensek a csúcsdendrit teljes hosszában megfigyelhetők voltak.
- A prefrontális kéreg 5. rétegbeli piramissejtjeiben a dendritikus AP-ok keletkezési helye a bifurkáció környezetében van.
- A csúcsdendrit disztális szakaszán dendrit-dendrittüske párokban mérve kimutattuk, hogy a dendritikus AP-ok megjelennek a dendrittüskékben is.
- Nikkel alkalmazásával kimutattuk, hogy a T- és/vagy R-típusú kalciumcsatornák trigger szerepet tölthetnek be a dendritikus AP-ok kialakulásában.
- A HCN csatornák gátlása csökkentette a dendritikus AP-ok kiváltásához szükséges kritikus frekvenciát, valamint a vAP-ok számát a sorozatban. A HCN csatornák gátlása növelte a dendritikus AP-ok amplitúdóját is.
- Kimutattuk, hogy az α_2 -adrenoceptorok aktiválása, a HCN csatornák gátlása révén csökkenteni képes a dendritikus AP-ok kiváltási küszöbét.
- A noradrenalin β -adrenoceptorokon keresztül fokozza az 5. rétegbeli piramissejtek ingerlékenységét.

Irodalmi, és saját adatok alapján a dendritikus AP-ok a számára terjedve AP burst-ök kialakulásához vezethetnek. Az AP burst-ök képesek aktiválni a gyenge szinapszisokat, amelyekben transzmitter felszabadulás csak igen alacsony valószínűséggel történik, így egyetlen AP-lal szemben a burst-ök sokkal hatékonyabb jelet képviselnek az idegsejthálózatok működésében. A gyenge szinapszisok átjárhatóvá válásával aktiválódhatnak a szinaptikus reverberációs körök, amelyek a munkamemória alapját adják a prefrontális kéregben. Méréseink így sejtszintű magyarázatát adhatják azoknak az irodalomban elfogadott vizsgálati eredményeknek, melyek szerint az α_2 -adrenoceptorok aktiválása, illetve a HCN csatornák gátlása javítja a munkamemóriát, és döntő szerepet játszanak a prefrontális kéreg megfelelő működésében.

A β -adrenoceptorokkal kapcsolatos eredményeink sejtszintű magyarázatát adhatják a magatartási vizsgálatokban találtaknak, mely szerint a stresszorok melletti magasabb noradrenalin szint hatására, amely már feltehetően aktiválja a β -adrenoceptorokat, megnövekedett az érdektelen, mellékingerekre adott válaszok mennyisége.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Disszertációhoz kapcsolódó közlemények:

Barth, A.M., Vizi, E.S., Zelles, T., & Lendvai, B. (2007)

α_2 -Adrenergic receptors modify dendritic spike generation via HCN channels in the prefrontal cortex. *J Neurophysiol*, (doi:10.1152/jn.00943.2007)

Barth, A.M., Vizi, E.S., & Lendvai, B. (2007)

Noradrenergic enhancement of Ca^{2+} responses of basal dendrites in layer5 pyramidal neurons of the prefrontal cortex. *Neurochem Int*, **51**, 323-7.

Lendvai, B., Szabo, S.I., **Barth, A.I.**, Zelles, T., & Vizi, E.S. (2006) Application of two-photon microscopy to the study of cellular pharmacology of central neurons. *Adv Drug Deliv Rev*, **58**, 841-9.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt köszönettel tartozom Vizi E Szilveszter Professzor Úrnak, hogy a nevével fémjelzett tudományos iskola keretein belül végezhettem PhD munkámat. Köszönöm témavezetőmnek, dr. Lendvai Baláznak, hogy a két-foton lézermikroszkópia technikájának elsajátításában segítségemre volt, köszönettel tartozom a témaválasztásához nyújtott javaslatáért, az eredmények értékelése, cikkek publikálása terén nyújtott segítségéért.

Tisztelettel és köszönettel tartozom mindazoknak, akik munkám során értékes kritikai vélemény nyilvánításukkal, a jobbítás szándékával az eredményesebb munka érdekében szóltak, és ösztönöztek a folytatásra.

Köszönet illeti dr. Zelles Tibort szakmai tanácsaiért, valamint az értekezés megírása, korrekciója terén nyújtott segítségéért.

Hálás vagyok dr. Mike Árpádnak az elektrofiziológiai mérések eredményeinek értékelésénél nyújtott segítségéért.

Köszönöm dr. Kiss Jánosnak a noradrenerg rendszerrel kapcsolatos szakmai tanácsait.

Köszönet illeti dr. Zsilla Gabriellát a PhD éveim alatt nyújtott mindennapos segítségéért.

Köszönöm PhD hallgató társaimnak dr. Fekete Ádámnak, és Szabó Szilárdnak, hogy a technikai problémák megoldásában segítségemre voltak.

Végül, de nem utolsó sorban hálával tartozom családom valamennyi tagjának megértésükért, támogatásukért.