

Az agyi inzulin helyi forrásai és hatása

Rózsa Márton

Biológus MSc, II

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatika Kar

Témavezetők:

Molnár Gábor PhD

MTA, SZTE, tudományos munkatárs

Tamás Gábor PhD, DSc

MTA, SZTE, egyetemi tanár

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	3
1.1. A neocortex neuronjai	3
1.2. GABAerg interneuronok szerepe	5
1.3. Kérgi interneuron típusok	6
1.4. Az inzulin és az inzulin receptor	8
1.5. Az inzulin hatása	8
1.6. Az agyi inzulin forrása	10
2. Célkitűzés	11
3. Anyag és módszer	12
3.1. Agyszelet készítése	12
3.2. Elektrofiziológia és Ca^{2+} imaging	13
3.3. Hisztológia	14
3.4. Azonosított neuron citoplazmájának legyűjtése	14
3.5. First-strand cDNS szintézis	15
3.6. Egysejt kvantitatív valósidejű polimeráz láncreakció (QRT-PCR)	15
3.7. Digitális polimeráz láncreakció	16
3.8. Radioimmuno-vizsgálat (RIA)	17
4. Eredmények és értékelésük	18
4.1. Az inzulin sejtspecifikus expressziója mRNS szinten	18
4.2. Az inzulin mRNS de novo szintézisének indukciója	21
4.3. Az inzulin peptid szintézisének és felszabadulásának indukciója	21

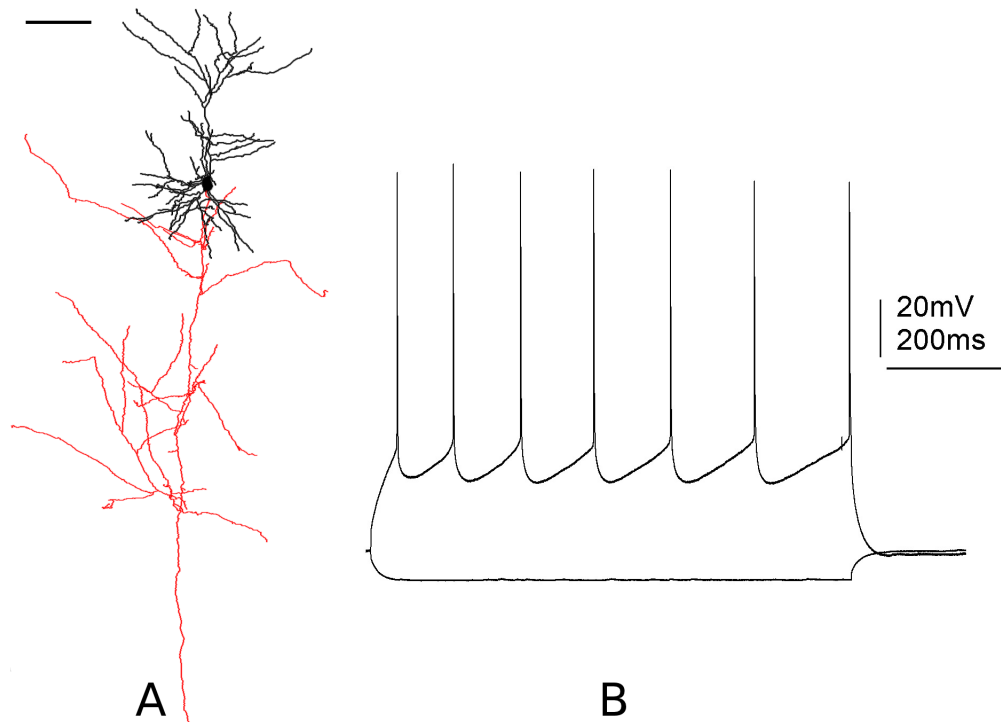
4.4. Insulin hatása azonosított neuronhálózatokra	22
4.5. A neurogliaform sejtekből felszabaduló insulin és annak hatása	23
4.6. Az insulin mRNS szintézise indukálható agykérgi neurogliaform sejtekben, amit insulin fehérje szintézis követ	26
4.7. Az insulin csökkenti a sEPSC frekvenciát	27
4.8. A neurogliaform sejtekből insulin szabadítható fel	28
4.9. Az insulin szerepe az agyban	29
5. Összefoglalás	31
6. Köszönetnyilvánítás	38
7. Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez	39

1. fejezet

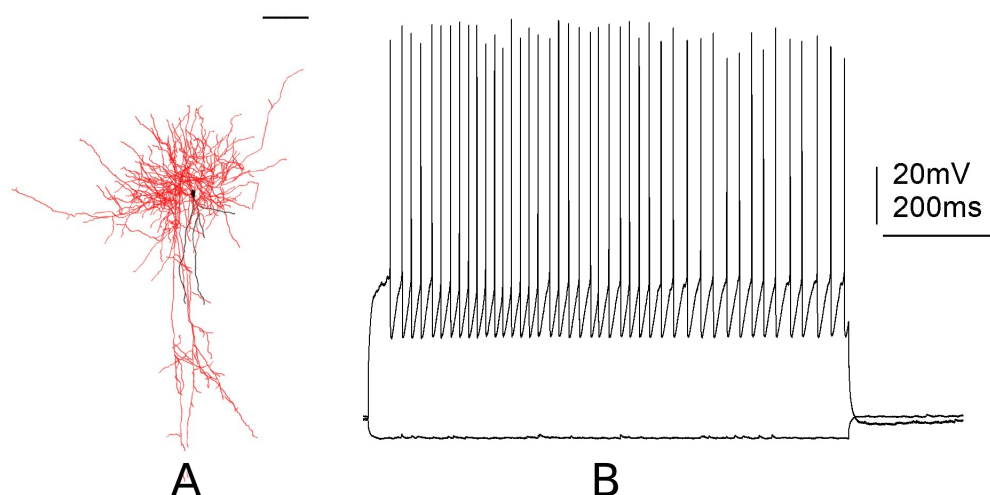
Bevezetés

1.1. A neocortex neuronjai

Az emlős neocortex az agykéreg fejlődéstanilag legfiatalabb, és egyben legkomplexebb része. A kérgi sejtek két fő osztálya, a serkentő aminosavakat felszabadító principális piramissejtek (McCormick et al., 1985), valamint a gátló neurotranszmittert felszabadító interneuronok csoportja (Peters and Jones, 1984). Az agykérgen belül a piramis sejtek képezik az idegsejtek körülbelül négyötöd részét. Jellemző tulajdonságuk, hogy az axonális kimenetüknek megfelelően rétegekbe szerveződnek. Bár projekciójuk alapján elkülöníthetők, morfológiájukra jellemző a dendritjeiken található sűrű tüskézettség, a vastag, felsőbb rétegek felé irányuló apikális dendrit, a sejt alapi részén eredő bazális dendritek, valamint a fehérállomány irányába projektáló axon (1.1 ábra). A kérgi idegsejtek kisebb hányadát teszik ki a gátló GABAerg interneuronok, melyek dendrit- és axonarborizációjukat tekintve nagyfokú morfológiai diverzitást mutatnak (1.2 1.3 1.4 ábrák) – ahogy ezt a korai agykéreg-vizsgálatok is kimutatták (Ramon y Cajal, 1911; Freund and Buzsaki, 1996; Somogyi et al., 1998). A GABAerg interneuronokat csoportosíthatjuk tüzelési mintázatuk, valamint axonterminálisaik posztszinaptikus sejtfelszíni eloszlása alapján, és az így képzett csoportok viszonylag jól korrelálnak a morfológiai csoportokkal (McCormick et al., 1985; Kawaguchi and Kubota, 1996, 1997), valamint a bennük megtalálható immunhisztokémiai marker molekulákkal (Kawaguchi and Kubota, 1997, 1998; Cauli et al., 2000; Markram et al., 2004).



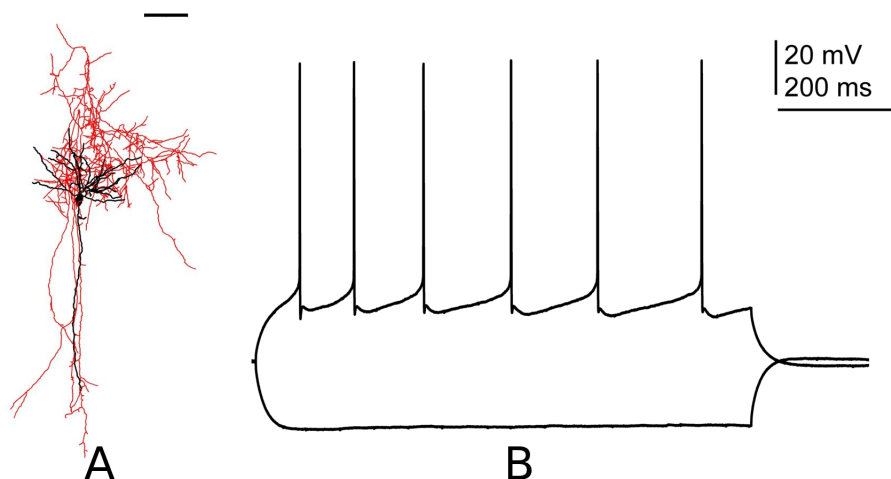
1.1. ábra. *II. rétegi piramissejt anatómiai és elektrofiziológiai jellemzői.* **A** A piramissejt három dimenziós anatómiai rekonstrukciója. Fekete szín a sejttestet és a dendritet, piros szín az axont jelöli. Jellemző a sejttestből felfele kiinduló apikális dendrit, és a sejttest bazális részén eredő axon. A lépték $100\ \mu\text{m}$. **B** A piramissejt negatív és pozitív áramimpulzusokra adott hiperpolarizáló és depolarizáló membránpotenciál válasza. Megfigyelhető a piramissejt viszonylag lassú időállandója és a depolarizáló áramimpulzus alatt a tüzelési frekvencia akkomodáció.



1.2. ábra. *A gyorsan tüzelő interneuron anatómiai és elektrofiziológiai jellemzői* **A** Egy gyorsan tüzelő interneuron három dimenziós rekonstrukciója. Fekete szín a sejttestet és a dendritet, piros szín az axont jelöli. A lépték 100 μm . **B** A gyorsan tüzelő interneuron negatív és pozitív áramimpulzusokra adott hiperpolarizáló és depolarizáló membránpotenciál válasza. A küszöb alatti ingerlésnél megfigyelhető a gyorsan tüzelő interneuronokra jellemző kis bemenő ellenállás, valamint a rendkívül gyors időállandó. A depolarizáló áramimpulzusnál látható, hogy a gyorsan tüzelő interneuronok akciós potenciálja nagy frekvenciával, akkomodáció nélkül jelentkezik.

1.2. GABAerg interneuronok szerepe

Az agykéregben és hippokampuszban az egyes GABAerg sejttípusok meghatározott sejterületen szinaptizálnak a posztszinaptikus célsejtjeikkel (Freund and Buzsaki, 1996; Somogyi et al., 1998). Így megkülönböztethetjük a gátló sejteket aszerint, hogy a posztszinaptikus sejtek szómáját, dendritjeit, dendrittüskéit, vagy az axon kezdeti szakaszát innerválják be. A GABAerg sejtek hatással lehetnek a posztszinaptikus sejtek akciós potenciáljának keletkezésére, időzítésére és a dendritikus visszaterjedésére (Miles et al., 1996; Tamas and Szabadics, 2004), valamint szerepet játszanak a populációs aktivitás sejtszintű szinkronizálásában (Cobb et al., 1995). Néhány hippokampális gátló interneuronról kimutatták, hogy azok az egyes szinkron agyi hullámtevékenységek alatt jól meghatározott időpontokban, sejttípus-függően váltanak ki akciós potenciálokat (Klausberger et al., 2003; Hajos et al., 2004; Klausberger et al., 2004).

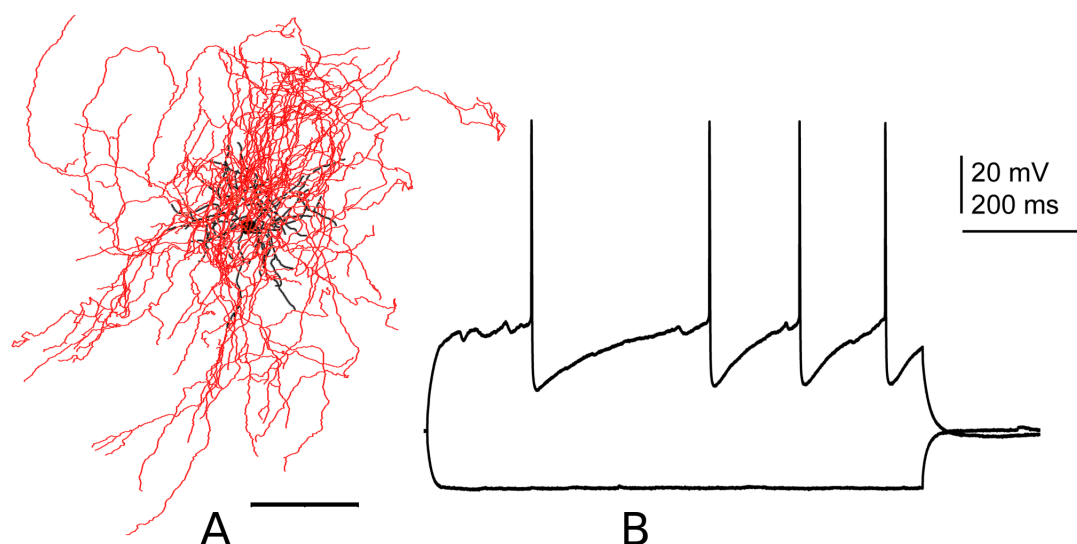


1.3. ábra. *A szabályosan tüzelő nem-piramissejt anatómiai és elektrofiziológiai jellemzői* **A** Egy szabályosan tüzelő nem-piramissejt három dimenziós rekonstrukciója. Fekete szín a sejttestet és a dendritet, piros szín az axont jelöli. A lépték 100 μm . **B** A szabályosan tüzelő nem-piramissejt hiperpolarizáló és depolarizáló áramimpulzusokra adott membránpotenciál-válasza. Az akciós potenciálok erősen akkomodálnak.

1.3. Kérgi interneuron típusok

A kosársejtek axonterminálisai a posztszinaptikus sejtek sejttestén és proximális dendritjein szinaptizálnak, és GABA_A receptorokon keresztül gyors, nagy amplitúdójú gátló posztszinaptikus potenciált (IPSP) váltanak ki (Buhl et al., 1994). A kosársejt kifejezést először Ramón y Cajal használta a kisagyban lévő neuronokra, melyek axonjai a Purkinje sejtek szómáit mintegy kosarat képezve vették körül (Ramon y Cajal, 1911). Ez az elnevezés azonban heterogén sejtpopulációt jelöl, tagjait különböző neurokémiai tulajdonságok és eltérő eloszlású axon arborizáció jellemzi. A két alapvető típus jól elkülöníthető a bennük együtt soha elő nem forduló Ca²⁺ ion kötő fehérje, a parvalbumin és a kolecisztokinin eloszlása alapján (Kawaguchi és Kubota, 1997; Somogyi és mtsai., 1998). A rövid, főleg a sejt közelében elágazó kollaterálisokat magába foglaló, sűrű axon arborizációjú sejtek macska látókérgében sejtoszlopok között is közvetíthetnek GABAerg hatást (Tamas és mtsai., 1997), míg a ritkább axon arborizációjú, hosszú, tangenciálisan futó axon jellemezte neuronok alkalmasak a vizuális kéreg különböző orientációs preferenciájú oszlopainak összekapcsolására (Kisvarday és mtsai., 1993). A kosársejtek fiziológiai jellemzője a depolarizáló bemenetre adott nagy frekvenciájú akciós potenciál sorozat, az ún. gyorstüzelés (1.2 ábra).

A dendritcélzó sejtek axonterminálisainak nagy része a posztszinaptikus sejtek



1.4. ábra. *A neurogliaform sejt anatómiai és elektrofiziológiai jellemzői* **A** Egy neurogliaform sejt három dimenziós rekonstrukciója. Fekete szín a sejttestet és a dendritet, piros szín az axont jelöli. A lépték 100 μm . **B** Egy neurogliaform sejt hiperpolarizáló és depolarizáló áramimpulzusokra adott membránpotenciál-válasza. Megfigyelhető az akciós potenciálok növekvő frekvenciája.

dendrittörzsén (Tamas et al., 1997), míg a kettős csokor sejtek főként a dendrittűskéken szinaptizálnak. A dendritikus membránt beidegző kérgi neuronok tüzelési mintázatuk, neurokémiai és morfológiai tulajdonságaik alapján tovább osztályozhatóak (Kawaguchi and Kubota, 1998). A hippocampusban a dendritikus GABAerg bemenetek a dendritikus akciós potenciálok Ca^{2+} komponensét gátolják (Miles et al., 1996), illetve a dendritek elágazási pontjaihoz közel eső terminálisok a visszaterjedő akciós potenciálokat gátolhatják folyamatosan tüzelő piramis sejtekben (Spruston et al., 1995; Tamas et al., 1997). Az agykérgi dendritikus gátló sejtekről kimutatták, hogy képesek befolyásolni a szomatikus akciós potenciálok időzítését (Szabadics et al., 2001; Tamas and Szabadics, 2004). (1.3 ábra)

A neurogliaform sejteket szintén Ramon y Cajal írta le először. Alakjuk után pókháló, illetve törpe sejteknek nevezte őket, hiszen axonarborizációjuk rendkívül sűrű, nagyon vékony ágakból áll, szómájuk viszonylag kicsi, kerekded (Ramon y Cajal, 1911) (1.4 ábra). A kisméretű szómából igen sok, vékony, esetenként gyöngyözött dendrit ered. Az idegrendszer több területéről is azonosították a neurogliaform sejteket: az agykéregben (Marin-Padilla, 1985; Hedlich and Werner, 1986; Kisvárdy et al., 1990; Hestrin and Armstrong, 1996), a striátumban (Fox and Rafols, 1971; Sancesario et al., 1998), és az amygdalában (McDonald and Culberson, 1981). Kutatócsoportunk kimutatta, hogy ezen sejtekben keltett egyetlen akciós potenciál képes lassú gátló posztszi-

naptikus potenciált (IPSP) kiváltani a posztzinaptikus piramissejtekben. Ez a válasz lassabb lefutású más interneuronok által kiváltott IPSP-khez képest, aminek hátterében az összetett $GABA_A$ és $GABA_B$ receptor-mediált ionáramok állnak (Tamas et al., 2003). A neurogliaform sejtek mindezidáig az agykérgi hálózatok lassú gátlásának egyetlen ismert képviselője. Ezek mellett egy újabb publikációnk beszámol arról, hogy e sejtek képesek nemszinaptikus, térfogati transzmisszióval aktiválni az axonfelhőjükbe eső $GABA$ receptorok nagy részét. Egyetlen neurogliaform sejt által felszabadított $GABA$ képes elérni a posztzinaptikus $GABA_B$, a preszinaptikus $GABA_B$ és az extraszinaptikus delta alegységet tartalmazó $GABA_A$ ($GABA_{A\delta}$) receptorokat egyaránt, amelyen keresztül erőteljesen képes modulálni a kérgi hálózatok aktivitását (Oláh et al., 2009).

1.4. Az inzulin és az inzulin receptor

Az inzulin a hasnyálmirigy Langerhans szigeteinek béta sejtjeiben termelődő peptid hormon, neve a termelődési helyére utal (insula=sziget latinul). Pleiotróp hatású, az anyagcsere-szabályzás elsőként felfedezett hormonja. A béta sejtekben a riboszómákon szintetizálódott preproinzulin proteolitikus hasítást követve proinzulinná bomlik, mely szekréciós vezikulákba kerül. Itt a proinzulin proteolitikus hasítása inzulint és C-peptidet eredményez, melyek a szekréciós granulumokban így egyenlő arányban találhatóak meg. A béta sejtekből az inzulin és a C-peptid exocitózissal a szövetközi folyadékba, majd a véráramba kerül. Az inzulin receptor a tirozin kináz receptorok csoportjába tartozik. Amint az inzulin receptor inzulint köt, egyes alegységei transzfoszforilálják egymást, így a receptor kináz aktivitása megnövekszik, és képes lesz aktiválni a szignalizációs út következő tagját (Schlessinger, 2010). Az inzulin receptor mai tudásunk szerint legalább 9 féle fehérjét képes foszforilálni tirozin oldalláncán, ezzel elindítva egy-egy adott intracelluláris szignalizációs utat (Saltiel and Kahn, 2001). A másodlagos hírvivők divergenciája az inzulin pleiotróp hatásának molekuláris alapja.

1.5. Az inzulin hatása

Az inzulin szignalizáció hatását legegyszerűbb vizsgálni az inzulin receptor kiiktatásával. Az inzulin receptor knockout (KO) egerek embrionális fejlődése során enyhé visszamaradás figyelhető meg a kontroll csoporthoz képest, jelezve azt, hogy az embrió fejlődésében lehet szerepe. Az inzulin receptor KO egerek metabolikus homeosztázisa születés után összeesik, és pár nap elteltével diabéteszes ketoacidózisban elpusztulnak

(Accili et al., 1996). Az inzulin receptor gén izom-, zsír-, máj-, vagy idegsejtekben való specifikus kiütésével az adott mutáns sejttypusra jellemző fenotípus érhető el, melyből következtetni lehet az inzulinnak az adott szövetben való funkciójára (Kitamura et al., 2003). Legjobban tanulmányozott az izom- és zsírsejtek inzulin szignalizációja. Ezen sejtekben inzulin hatására az intracelluláris kompartmentekből a GLUT4 glükóz transzporter kihelyeződik a sejtek membránjába (Mueckler, 1994), így azok glükózt vesznek fel, ezzel csökkentve a vér glükóz koncentrációját.

Az idegszövetet sokáig inzulin inszenzitívnek tartották, azonban a későbbiekben felfedezték, hogy az inzulin az agy különböző területein differenciáltan és koncentráltan van jelen. Ebből egyes kutatócsoportok arra következtettek, hogy az inzulinak a központi idegrendszerben a perifériától eltérő funkciója is van (Havrankova and Schmechel, 1978). Az inzulin receptor idegsejtekből való kiütése nőstény egereknél hiperfágiát, minden egérnél pedig obezitást idézett elő. Megfigyelhető volt továbbá a luteinizáló hormon szint csökkenése és a gonádok alulműködése mindkét nem esetében (Frölich et al., 1998). Az inzulin receptor KO egereken végzett kísérletekkel összhangban a krónikusan intracerebroventrikuláris inzulinnal kezelt páviánok esetében a táplálékfelvétel és a testsúly csökkenését mutatták ki (Woods et al., 1979). Az inzulin a táplálékfelvétel szabályzásában a hipotalamuszban található nucleus arcuatus neuropeptid Y-erg és agouti related peptid-erg (NPY/AgRP) neuronjain, valamint proopiomelanokortin (POMC) tartalmú neuronjain hat (Morton et al., 2006). Az NPY/AgRP neuronok stimulációja a táplálékfelvételt serkenti, a POMC neuronok stimulációja a táplálékfelvételt gátolja. Az inzulin a NPY/AgRP neuronokat gátolja K_{ATP} csatornák nyitásán keresztül (Spanswick et al., 2000), a POMC neuronokat pedig serkenti, azonban ennek mechanizmusa jelenleg ismeretlen.

Az inzulin kognitív hatását különböző viselkedési tesztekben vizsgálták, különböző dózissal, különböző helyre (intracerebroventrikulárisan vagy intravénásan) adagolt inzulinnal, különböző fajokon. Talán a sokféle kísérleti paradigma miatt, de a kísérletek gyakran ellentmondásosak egymással (Park, 2001). A streptozotocin -ami a hasnyálmirigy béta sejtjeit pusztítja el, ezzel csökkentve a plazma inzulin koncentrációt- alkalmazásánál minden viselkedési tesztben a teljesítmény romlását figyelték meg, amivel egybeesik a hippocampális LTP kialakítására való képesség romlása is (Biessels et al., 1998). Ezekben a streptozotocint alkalmazó kísérletekben azonban nem lehet kizárni, hogy a kognitív defekt az inzulin metabolikus hatásának kiesése miatt következett be. Az inzulin kognitív funkciókra tett hatását eddig nem sikerült egyértelműen igazolni a viselkedési tesztekkel, holott az Alzheimer kór és a diabétesz során kialakuló demencia kialakulásának valószínűsége erősen korrelál az agyi inzulin koncentráció megváltozásával (Gasparini et al., 2002). A viselkedési kísérletek ellentmondásossága,

és inzulin agyban található differenciált megjelenése arra utal, hogy az inzulin kognitív hatását finomabb, egyes agyterületekre/sejtcsoportokra szorítkozó kutatásokkal lehet pontosabban jellemezni.

1.6. Az agyi inzulin forrása

Már a hetvenes években ismert volt, hogy a központi idegrendszerben mind az inzulin, mind az inzulin receptora megtalálható (Havrankova et al., 1978; Havrankova and Schmechel, 1978). Kromatográfiás és radioimmun vizsgálatokkal kimutatták továbbá, hogy az agy inzulin szintje átlagosan huszonötszöröse a vérplazma inzulinszintjének, néhány területen százszorosán, de minden agyi területen legalább tízszeresen meghaladja a vérplazmában mérhető inzulin koncentrációt (Havrankova and Schmechel, 1978).

Kézenfekvő feltételezés, hogy az agyi inzulin forrása a hasnyálmirigy. Több csoport kimutatta vérbe adagolt radioaktívan jelölt inzulinnal, hogy a vér-agy gáton átjut az inzulin egy telíthető transzport rendszeren keresztül (Banks et al., 1997), azonban ez a mechanizmus önmagában nem képes a különböző diabétesz modellekben az agy és vér inzulin koncentrációjának különbségét megmagyarázni (Havrankova et al., 1979; Baskin et al., 1985).

A diabétesz modellekben tapasztalt plazma-cerebrospinális folyadék inzulin koncentráció hányadost a központi idegrendszerben végbemenő inzulin szintézissel lehetne magyarázni. Ezt a hipotézist alátámasztja, hogy idegsejt kultúrákban kimutatható az inzulin mRNS (Clarke et al., 1986) és az inzulin fehérje jelenléte (Schechter et al., 1990), valamint idegsejt (de nem gliasejt) kultúrákból az inzulin fehérje felszabadulása (Devaskar et al., 1994). Kimutatható továbbá egész agy szinaptoszóma preparátumokon az inzulin depolarizáció függő (Wei et al., 1990) és glükóz koncentrációfüggő felszabadulása (Santos et al., 1999). Az inzulin mRNS az agy legkülönbözőbb területein található meg (Devaskar et al., 1994), azonban a sejttípus specificitása, valamint a neuronokból in vivo felszabaduló inzulin fiziológiai hatása még nem ismert.

2. fejezet

Célkitűzés

Célul tűztük ki inzulin jelenlétének, felszabadulásának, és esetleges hatásának vizsgálatát patkány agykérgi szelet modellen.

Kísérleteink megtervezésekor arra szerettünk volna választ kapni, hogy kimutatható-e:

- agykérgi inzulin szintézis.
- agykérgi inzulin felszabadulás.
- elektrofiziológiai módszerekkel a fiziológiás koncentrációjú inzulin neuronális hatása.
- a lokálisan felszabaduló inzulin hatása a környező neuronokra.

3. fejezet

Anyag és módszer

3.1. Agyszelet készítése

A kísérlethez fiatal (22 -35 napos) Wistar patkányokat használtunk. Az állatokat inhalált halotán (2-bróm,2-klór,1,1,1-trifluoretán) anesztézia alatt dekapitáltuk, az agy kipreparálását hűtött Mesterséges CerebroSpinális Folyadékban végeztük (MCSF), melynek összetétele a következő volt: 130 mM NaCl; 3,5 mM KCl; 1 mM NaH_2PO_4 ; 24 mM NaHCO_3 ; 1 mM CaCl_2 ; 3 mM MgSO_4 ; 10 mM D(+) glükóz. A CaCl_2 hozzáadása előtt 10-20 percig jégen karbogénnel (95% O_2 , 5% CO_2) buborékoltattuk, hogy a CO_2 beoldódásával, ezzel a pH csökkentésével elkerüljük a CaCO_3 és kalcium-foszfátok kicsapódását. Szikével szagittális bemetszést ejtettünk a fejtetőn, majd a foramen magnumtól kétoldali vágással átvágtuk a rágóizmokat. A foramen magnumból kiindulva a szagittális varrat menti apró vágásokkal haladva felnyitottuk a koponyatetőt. A kisagy eltávolítását követően az agyféltekéket óvatosan átemeltük egy MCSF-fel töltött edénybe, és 5-7 percig hűtöttük, így az rigidebbé, ezáltal jobban vághatóvá vált. Az alacsony hőmérséklettel csökkenthető a sérülés okozta excitotoxikus akciós potenciálok keletkezése, amelyek egyébként az intracelluláris Ca^{2+} szint növelésén keresztül sejtpusztuláshoz vezetnének. Microm HM650 V mikrotómmal 320 μm vastag koronális metszeteket készítettünk a vizuális, vagy szomatoszenzoros kéregből. A szeleteket 1 órán át inkubáltuk 35°C-os oxigenált MCSF-ben, majd a később felhasználásra kerülő szeleteket 17°C-on tartottuk. Az elektrofiziológiai vizsgálatokhoz a szeleteket 37°C-os elvezető kamrába helyeztük, melyen MCSF-et áramoltattunk át. Ez a preparálás során alkalmazottól eltérően 3 mM CaCl_2 -ot, és 1,5 mM MgSO_4 -ot, valamint 0,5 mM vagy 10 mM D(+) glükózt tartalmazott.

3.2. Elektrofiziológia és Ca^{2+} imaging

Whole cell patch clamp technikával végeztünk páros elvezetéseket I, valamint II/III rétegbeli neuronokból. A sejteket sejttestjük alakja (bipoláris, multipoláris) szerint választottuk ki infravörös DIC (differenciál interferencia kontraszt) videomikroszkópia (Zeiss Axioskop FS mikroszkóp, Hamamatsu CCD kamera, Luigs & Neumann Infrapatch manipulátor rendszer) segítségével. A mikropipettákat (4-6 MOhm) intacelluláris oldattal töltöttük meg (pH 7,25; 275mOsm): 126 mM K-glükonát, 4 mM KCl, 10 mM HEPES, 10 mM kreatin-foszfát és a sejtek töltéséhez 8 mM biocytin (N-biotinilált lizin). A jeleket HEKA EPC10 erősítővel rögzítettük, 5 kHz-en szűrtük, 10 kHz-en digitalizáltuk PatchMaster nevű programmal és FitMaster nevű programmal analizáltuk (HEKA, Lambrech/Pfalz, Németország). A mért értékek átlagait és szórásait (S.D.) adtuk meg.

Kísérleteink során a vizsgált sejteket morfológiai sajátásaik és tüzelési mintázataik alapján különítettük el. A tüzelési mintázatokat a bevett gyakorlat szerint current clamp üzemmódban először negatív (-100 pA), majd egyre pozitívabb (+20 pA lépésként) áramimpulzusok sejtbe injektálásával regisztráltuk. A piramissejtekre jellemző klasszikus morfológia a vastag apikális dendrit, bazális dendritok, és a viszonylag széles sejttest. Tüzelési mintázatukat frekvencia adaptáció és széles akciós potenciálok jellemzik, nagy időállandóval, és lassú utóhiperpolarizációval. (1.1 ábra) Jellemző még, hogy a piramissejtek nyugalmi membránpotenciálja hiperpolarizáltabb, mint az interneuronoké. A gyorsan tüzelő interneuronokra (FS) jellemző a többi interneuronhoz képest kicsi bemenő ellenállás. Depolarizáló áramimpulzusra nagy frekvenciájú, nem adaptálódó, kis félszélességű akciós potenciálokkal, vagy akciós potenciál csoportokkal válaszolnak (1.2 ábra). Morfológiájuk lehet bipoláris, vagy multipoláris. A szabályosan tüzelő nem piramissejtek tüzelési mintázatát a piramisokhoz hasonlóan frekvencia adaptáció jellemzi, tüzelésük elején gyakran burst-öt figyelhetünk meg, mely legalább két akciós potenciálból áll, melyek között az inter-spike intrvallum kicsi a többi akciós potenciálnál tapasztaltakhoz képest. Időállandójuk lassú, ebben a tekintetben is a piramissejtekhez állnak közelebb (1.3 ábra). A Martinotti sejtekre jellemző, hogy jelentős a hiperpolarizáló áramimpulzusra adott válaszaikban az úgynevezett sag, ami hiperpolarizáció aktivált kation konduktanciák által okozott depolarizáció. Depolarizáló áramimpulzusokra adott válaszaikban a Martinotti sejtek akciós potenciáljai akkomodálnak, és folyamatos amplitúdó-csökkenést mutatnak. A neurogliaform sejtekre hiperpolarizáló pulzusnál jellemző a sag hiánya, depolarizáló pulzusnál a késői tüzelés, valamint az akciós potenciálok növekvő frekvenciája (1.4 ábra).

A glibenclamid neuronokra való hatását vizsgáló kísérletekben a vizsgált sejtet

feszültségzár módban -70 mV-on tartottuk 200 ms ideig, majd -80 mV, -70 mV, -60 mV-os feszültségen egyenként 100 ms-ig, majd -70 mV-on 200 ms-ig, 1 Hz vagy 0,25 Hz frekvenciával ismételve. A különböző feszültségértékekhez tartozó beinjektált áramok különbségét használtuk fel az analízisben (4.4 ábra). A spontán EPSC-k rögzítését feszültségzár módban, -70 mV-os feszültségen végeztük. A spontán EPSC-k detekcióját az Igor Pro nevű programmal (Wavemetrics, Lake Oswego, OR, USA), és az ehhez írt NeuroMatic nevű függvénycsomaggal (www.neuromatic.thinkrandom.com) végeztük (4.3 ábra).

A fluoreszcens képalkotó kísérletek lebonyolításához a neurogliaform sejteket olyan intracelluláris oldattal szűrtük meg, mely a fent említett összetevőkön kívül még 10 μ M Alexa594-et és 120 μ M OGB-1-et tartalmaztak (Invitrogen) (4.4 ábra). A megvilágítás 488 nm-es folytonos üzemű lézerrel történt, a jelek rögzítése Revolution XD Spinning Disc Konfokális Mikroszkóprendszerrel történt, Andor iXon EMCCD kamerával, Andor IQ programmal. A kapott képsorok kiértékelése ImageJ nevű programmal történtek.

3.3. Hisztológia

Az anatómiai vizsgálatokat Tóth Éva végezte. Az elvezetések alatt az elvezető pipettából a biocytin a sejtekbe diffundált, ami megfelelő töltést eredményezett. A fixáláshoz a szeleteket -az esetleges deformálódásokat elkerülendő- két szűrőpapírdarab közé helyeztük, majd 4% paraformaldehid, 1,25% glutáraldehid, 0,2% pikrinsav tartalmú, 0,1M foszfát-pufferoldatban fixáltuk a feldolgozás megkezdéséig (minimum 36 óráig). A szeletek processzálását leírt protokoll (Buhl et al., 1994; Tamas et al., 1997, 2000) alapján végeztük. Röviden: a zselatinba ágyazott szeleteket vibratómmal (Leica VT 1000S) 70 μ m vastagságú sorozatmetszetekre szeltük. A biocytinnel feltöltött sejteket az avidin-biotinilált tormaperoxidáz módszerrel tettük láthatóvá, kromogénként diaminobenzidint használunk. A metszeteket 1%-os ozmium tetroxidban utólagosan rögzítettük, 1%-os uranil-acetát oldattal festettük, felszálló alkoholsorban dehidráltuk, végül epoxigyantában infiltráltuk, és polimerizáltattuk.

3.4. Azonosított neuron citoplazmájának legyűjtése

A citoplazma legyűjtéséhez használt intracelluláris oldat a fent említetteken túl 500 μ l végtérfogatban 5 μ l RNáz inhibítort (Life Technologies) is tartalmazott. Az intracelluláris oldatot a felhasználásig jégen tartottuk az RNáz inhibitor aktivitásának

megőrzése érdekében. A fent említett módon (3.2 szekció) azonosított neuronok citoplazmáját az elektrofiziológiai elvezetés után az elvezető mikroelektródába szívjuk úgy, hogy a pipettában gyenge vákuumot hozunk létre. Eközben folyamatosan figyeljük a sejt morfológiáját és elektrofiziológiai tulajdonságait, valamint a pipettával való kapcsolat intaktságát. A citoplazma leszívását akkor fejezzük be, mikor a sejt citoplazmájának jelentős része az elvezető elektródába került. Ezután az elektródát úgy húzzuk vissza a sejtről, hogy az elektróda végén található pórust a sejtmag eltömítse, vagy outside out konformáció alakuljon ki. Ezután az elektróda tartalmát egy steril PCR csőbe (Axygen) juttatjuk magas nyomás segítségével. A citoplazmát tartalmazó PCR csövet ezután hirtelen lehűtjük folyékony nitrogénben, és további felhasználásig -80°C hőmérsékleten tároljuk.

3.5. First-strand cDNS szintézis

A molekuláris biológiai kísérleteket Dr. Kocsis Ágnes Katalin és Faragó Nóra végezte Dr. Puskás László Géza laborjában. A reverz transzkripció (RT) két lépésben zajlott le, $5\text{ }\mu\text{l}$ végtérfogatban. A reakcióelegy $2\text{ }\mu\text{l}$ intracelluláris oldaból állt, mely tartalmazta egy azonosított sejt legyűjtött citoplazmáját, $0,3\text{ }\mu\text{l}$ reverz transzkripcióhoz való primert (Bioneer, Daedong, Korea), $0,3\text{ }\mu\text{l}$ 10 mM koncentrációjú dNTP elegyet (Life Technologies, Foster City, CA), $1\text{ }\mu\text{l}$ 5X first-strand puffert, $0,3\text{ }\mu\text{l}$ $0,1\text{M}$ -os 1,4-ditiotreitol oldatot, $0,3\text{ }\mu\text{l}$ RNáz inhibítort (Life Technologies), valamint 100U reverz transzkriptázt (Superscript III; Invitrogen Incorporation). A reverz transzkripcióhoz használt primereket a CLC Main Workbench (CLC Bio, Aarhus, Denmark) program segítségével terveztük, szekvenciájuk a következő: rps18: $5'\text{-ATTAACAGCAAAGGCCCA-3'}$; ins2: $5'\text{-TTTATTCATTGCAGAGGGG-3'}$. A reakció első lépésében a mintát $5\text{ percig } 65^{\circ}\text{C}$ inkubáltuk. Az átírás 50°C hőmérsékleten zajlott 1 órán keresztül , amit egy $15\text{ percgig tartó } 70^{\circ}\text{C}$ -os inaktiválás követett. Ezután a keletkezett RT mixet PCR reakcióban használtuk fel.

3.6. Egysejt kvantitatív valósidejű polimeráz láncreakció (QRT-PCR)

A QRT-PCR-t megelőzte a cDNS preamplifikációja, mely $20\text{ }\mu\text{l}$ végtérfogatban zajlott. A reakcióelegy $5\text{ }\mu\text{l}$ RT mix-et, mely a first-strand cDNS szintézis végterméke, $1\text{ }\mu\text{l}$ Taqman® primert (rps18: Rn01428913_gH; ins2: Rn01774648_g1), $10\text{ }\mu\text{l}$ Taq-

Man® PreAmp Master Mix-et (Life Technologies) és 4, 5 µl nukleázmentes desztillált vizet tartalmazott. A PCR reakciót MyGenie 32 Thermal Block (Bioneer Corporation, Daejeon, South Korea) készüléken végeztük, a következő programmal: 10 perc 95°C (hot start), 2 perc 55°C, 2 perc 72°C, majd 15 cikluson keresztül amplifikáltuk a következők szerint: 95°C 15 mp és 60°C 4 perc, végül a reakciót 10 perces inaktivációval zártuk 99°C-on. Az előamplifikáció után a QRT-PCR reakciót az Exicycler™ 96 (Bioneer) készülékben végeztük, 20 µl végtérfogatban. A reakcióelegy összetétele 1, 5 µl előamplifikált PCR termék, 1 µl Taqman primer, 10 µl FastStart TaqMan® Probe Master (Roche). A kezdeti 3 perces 95°C-on végzett denaturációt követően, a templátot 45 cikluson (95°C 40 mp, 56°C 40 mp és 72°C 1 perc) keresztül amplifikáltuk. A kapott eredmények kiértékelését az Exicycler™ 96 Analysis programmal (Bioneer) végeztük. Ekkor határoztuk meg a ciklus köszöbértékét (cycle threshold, Ct), ami az a pont, amelynél a háttér-fluoreszcencia fölötti jel mérhető (4.1 ábra).

3.7. Digitális polimeráz láncreakció

A digitális polimeráz láncreakció (dPCR) a hagyományos PCR technika egy továbbfejlesztett formája, amely alkalmas a nagyon kis mennyiségű minta előamplifikáció nélküli kvantitálására (Vogelstein and Kinzler, 1999; Pohl and Shih, 2004). A hagyományos eljárással szemben itt az egyes reakciók egymástól elszeparálva, külön reakcióterben zajlanak, ami sokkal érzékenyebbé teszi a mérést. A dPCR során minden egyes minta egy külön reakcióterbe kerül, ami még további alcellákra osztható, melyekben így pontonként meghatározható a vizsgált nukleinsav mennyisége (4.2 ábra).

A digitális PCR reakciók 20 µl végkoncentrációban zajlottak. A reakcióelegy összetétele rps18 gén esetén 2, 5 µl RT mix, 2 µl Taqman® primer (rps18: Rn01428913_gH; ins2: Rn01774648_g1), 10 µl OpenArray® Digitális PCR Master Mix (Life Technologies), valamint 4, 5 µl nukleázmentes víz. Az ins2 gén esetén a fentiekől eltérően 5 µl RT mixet és 2 µl nukleázmentes vizet tartalmazott az elegy. Ezt az elegyet minden sejt esetében 4 subarraybe osztottuk szét, ami 256 reakciót jelentett sejtenként. A nanokapilláris chip reakciótereit OpenArray™ Autoloader használatával precízen töltöttük fel. Az OpenArray™ chipet egy olajat tartalmazó üvegtartóba helyeztük, melyet UV fénnel szilárdított ragasztóval rögzítettünk, majd a chipet az BioTrove OpenArray™ NT Cyclor készülékbe helyeztük. A reakcióelegyet első lépésben 15 mp-ig 50°C-on tartottuk majd 91°C -on 10 percen keresztül inkubáltuk. Ezt követte a 40 ciklusos reakció (54°C 170mp és 92°C 45mp) ami után az eredményeket OpenArray Digital PCR Software (1.0-ás verzió) segítségével értékeltük ki. A készülék

automatikusan detektálta a fluoreszcencia intenzitást minden pontban, mely adatokat a program futása végén egy összefoglaló táblázatban tudtuk menteni, majd értékelni. A program olyan saját algoritmussal rendelkezik, mely minden egyes Ct értékének a minőségét megbecsüli, és PCR reakciónként ad egy megbízhatósági értéket. A kísérletek során a 100-as megbízhatósági értéknél kevesebbel rendelkező PCR reakciókat elvetettük. Elvetettük továbbá a 23 alatti és 33 feletti Ct értékkel rendelkező PCR reakciókat is, mivel azokban a reakciókban valószínűleg primer dimer képződésének, vagy a háttérfluoreszcenciának tudható be a jel.

3.8. Radioimmuno-vizsgálat (RIA)

Az inzulin sejtekből való feltárása savas-etanolos technikával, jégen történt. RIA készlet (Sensitive Rat Insulin RIA kit, Millipore, St. Charles, MO, USA) segítségével határoztuk meg az inzulintartalmat 2pg-os csövenkénti érzékenységgel. A teljes fehérjemennyiséget BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA) segítségével határoztuk meg.

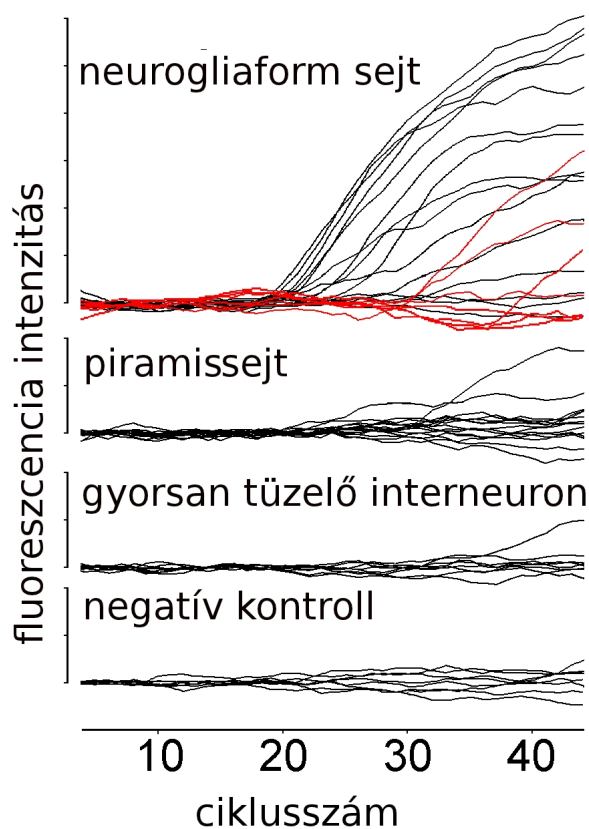
4. fejezet

Eredmények és értékelésük

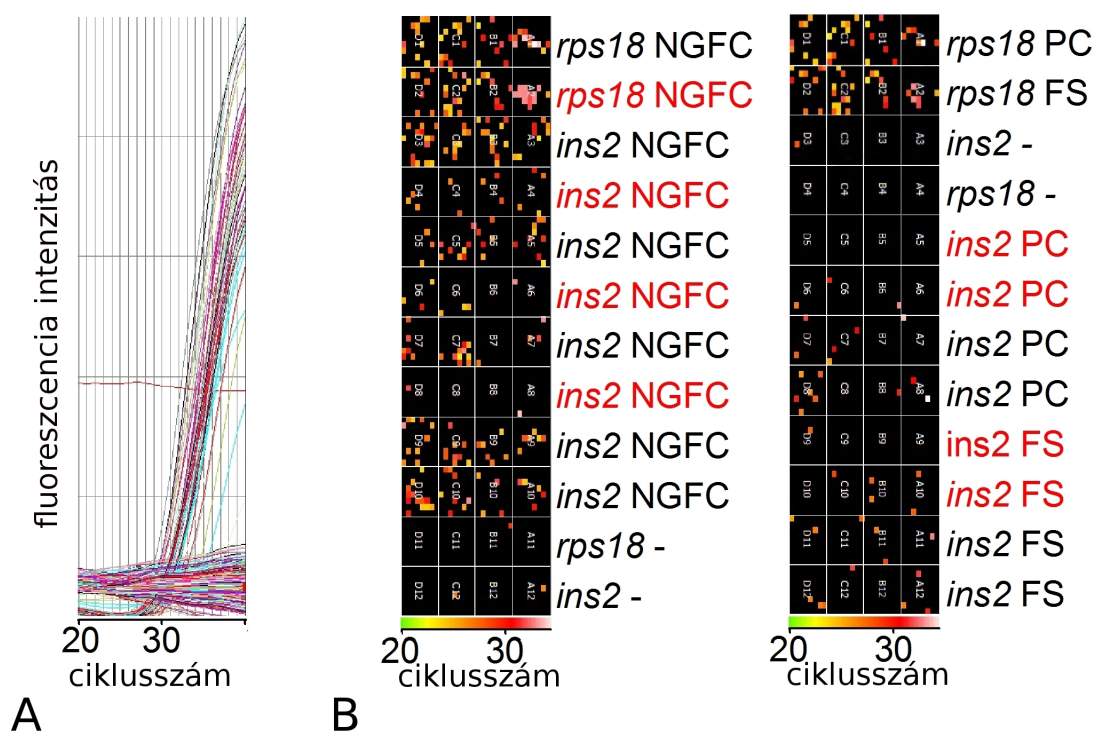
4.1. Az inzulin sejtspecifikus expressziója mRNS szinten

A kutatás első fázisában I és II/III rétegi neuronokon végeztünk elektrofiziológiai elvezetéseket whole cell patch clamp módszerrel. Az egyes sejtek elektrofiziológiai jellemzése (küszöb alatti membrántulajdonságok, valamint akciós potenciáljainak paraméterei) után az elvezetett sejtek citoplazmáját legyűjtöttük. A kutatás során három sejtsoportot különítettünk el elektrofiziológiai és morfológiai paramétereik alapján: neurogliaform sejtek (1.4 ábra), piramissejtek (1.1 ábra), valamint gyorsan tüzelő interneuronok (1.2 ábra).

Az azonosított sejtekből származó citoplazma oldatokban előamplifikálás után az inzulin fehérjét kódoló ins2 mRNS jelenlétét vizsgáltuk egysejt kvantitatív valósidejű polimeráz láncreakció (QRT-PCR) felhasználásával. A 15 vizsgált neurogliaform sejt közül 12 esetben kimutattuk az ins2 mRNS jelenlétét (22.1 ± 2.6 Ct, $n=12$). A 14 vizsgált piramissejt közül 10 esetben nem volt kimutatható az ins2 mRNS jelenléte. A pozitív próbák Ct értéke (küszöbciklusa) is szignifikánsan magasabb volt, mint a pozitív neurogliaform sejtek esetében (39.2 ± 5.3 Ct, $n=4$, $p < 0.001$). A 8 vizsgált gyorsan tüzelő interneuron közül 7 esetben nem volt kimutatható az ins2 mRNS jelenléte (37.8 Ct, $n=1$) (4.1 ábra). Az egy-egy sejtől legyűjtött citoplazmákban található inzulin mRNS kvantitatív meghatározásához digitális polimeráz láncreakciót (dPCR) alkalmaztuk. A dPCR lemez minden egyes almátrixában 0 vagy 1 molekula helyezkedik el, azaz a detektált fluoreszcencia mindig pozitív vagy negatív választ ad, így a dPCR amplifikációt követően ezek a pozitív találatok könnyen összeszámolhatóak (4.2 ábra). A PCR után a pozitív reakciók számából meghatározható volt a begyűjtött sejtek citoplazmájában ta-



4.1. ábra. Az *ins2* mRNS vizsgálata különböző típusú sejtek citoplazmájában egysejt kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakcióval (QRT-PCR). Magas (10mM - fekete), és alacsony (0,5mM - piros) extracelluláris glükóz koncentrációban legyűjtött citoplazmát jelöl. Az egyes vonalak egy-egy sejtől legyűjtött citoplazmából elkészített PCR reakciónak az *ins2* génre specifikus Taqman® próbával adott fluoreszcencia intenzitását mutatják a PCR ciklusszámok függvényében. A megnövekvő fluoreszcencia intenzitás a növekvő *ins2* PCR termékre utal. Minél korábbi ciklusnál válik el a fluoreszcencia intenzitása a háttérfluoreszcencia intenzitásától, annál több *ins2* mRNS-t tartalmazott az adott citoplazma oldat. Látható, hogy a piramis sejtekhez és a gyorsan tüzelő interneuronokhoz tartozó grafikonok alig térnek el a negatív kontrolltól, miközben a neurogliaform sejteknél erős fluoreszcencia intenzitás növekedést láthatunk magas extracelluláris glükóz koncentráció esetén, ami nagy citoplazmatikus *ins2* mRNS tartalmat jelent. Alacsony extracelluláris glükóz koncentráció esetén a küszöb ciklus (Ct) pozitív irányba tolódik el, ami alacsonyabb intracelluláris *ins2* mRNS tartalmat jelent.



sejttest és dendritok sötétkékek, axon világoskék

4.2. ábra. Egy sejt digitális polimeráz láncreakció (dPCR) eredménye különböző sejt-típusok és különböző extracelluláris glükóz koncentrációk esetén az *rps18* háztartási mRNS-re, és az *ins2* mRNS-re. A fekete színű kiírások magas (10mM), a pirosak alacsony (0,5mM) extracelluláris glükóz koncentrációban legyűjtött citoplazmát jelölnek. **A** dPCR reakciók fluoreszcencia intenzitása a ciklusszám függvényében a 4.1 ábrához hasonlóan. **B** Az OpenArray™ chip eredménye: egy sejt citoplazmája négy egymás mellett lévő subarray-be, összesen 256 reakciótérbe lett egyenletesen elosztva úgy, hogy minden helyre legfeljebb egy kópia mRNS kerüljön. Minden egyes pont egy függetlenül végbemenő PCR reakció, színe az adott reakcióhoz tartozó küszöbciklust jelöli. A piros/sárga színű pontok esetén az adott reakciótérben sikeresen lezajlott a PCR reakció, tehát ott jelen volt a vizsgált mRNS, így az egy-egy legyűjtött citoplazmában lévő mRNS kópiaszámok meghatározhatóak. Látható, hogy az *rps18* háztartási mRNS minden sejttypusban azonos mennyiségben fordul elő, függetlenül az extracelluláris tér glükóz koncentrációjától. Magas extracelluláris glükóz koncentráció alkalmazása esetén az *ins2* mRNS nagyobb kópiaszámmal fordul elő neurogliaform sejtekben, mint piramis sejtekben, vagy gyorsan tüzelő interneuronokban, azonban ez a megnövekedett expresszió lecsökken alacsony glükóz koncentrációjú extracelluláris oldatban. (PC – piramis sejt; FS – gyorsan tüzelő interneuron; NGFC – neurogliaform sejt)

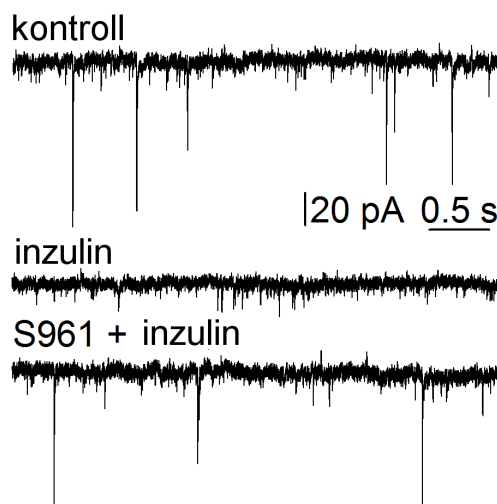
lálható ins2 mRNS-ek száma. Összhangban a QRT-PCR eredményével, a neurogliaform sejtekből legyűjtött citoplazmákban nagyobb ins2 mRNS kópiaszámot (30 ± 13 , $n=10$) detektáltunk, mint a piramissejtekből (7 ± 2 , $n=6$), vagy a gyorsan tüzelő interneuronokból (5 ± 3 , $n=5$, $p < 0.002$, Kruskal-Wallis teszt) legyűjtöttekben. Az egysejt dPCR módszer megbízhatóságának ellenőrzése érdekében megismételtük a dPCR kísérleteket az S18 riboszómális proteint kódoló rps18 mRNS esetében is. Az S18 riboszómális protein egy háztartási fehérje, így mRNS-ének kifejeződése konstitutív, vagyis a körülményektől, sejtípustól függetlenül nagyjából azonos szinten expresszálódik. Az rps18 mRNS mennyisége nem különbözött a vizsgált neurogliaform (63 ± 19 , $n=6$), piramis (62 ± 24 , $n=7$), és gyorsan tüzelő sejtekben (59 ± 24 , $n=4$).

4.2. Az inzulin mRNS de novo szintézisének indukciója

A hasnyálmirigy béta sejtjeiben az inzulin felszabadulását és szintézisét a vércukorszint befolyásolja. Megvizsgáltuk az extracelluláris térben jelenlévő glükóz koncentráció összefüggését az azonosított sejtekben megfigyelhető ins2 mRNS kópiaszámmal. Azt találtuk, hogy a csökkentett (5 mM) glükóz koncentrációjú, hipoglikémiás mesterséges cerebrospinális folyadék (ACSF) alkalmazása esetén a dPCR által meghatározott ins2 mRNS kópiaszám neurogliaform sejtek esetében szignifikánsan lecsökkent (7 ± 4 , $n=5$, $p < 0.002$), piramissejtek (2 ± 1 , $n=5$) és gyorsan tüzelő interneuronok (4 ± 3 , $n=5$) esetében nem változott a hiperglikémiás (10 mM) glükózt tartalmazó ACSF-et alkalmazó méréseinkhez képest. Hipoglikémiás körülmények között továbbá 7 neurogliaform sejt közül 4 esetben nem tudtuk az ins2 mRNS jelenlétét kimutatni QRT-PCR segítségével, és a pozitív esetekben is a Ct értéke jelentősen nagyobb volt, mint a magas glükóztartalmú ACSF-ben inkubált neurogliaform sejtek esetében (35.9 ± 3.9 Ct, $n=3$, $p < 0.001$, Mann-Whitney teszt) (4.1 4.2 ábrák).

4.3. Az inzulin peptid szintézisének és felszabadulásának indukciója

Radioimmuno-vizsgálat során igazoltuk, hogy alacsony glükóztartalmú ACSF-ben inkubált agyszeletből készült homogenizátumban kimutatható az inzulin fehérje (60.4 ± 21.7 pg/mg fehérje, $n=10$). De novo inzulin fehérje szintézis ellenőrzésére alacsony glükóztartalmú ACSF-ben inkubált agyszeleteket ATP szenzitív káliumcsatorna (K_{ATP}) blokkoló, antidiabetikus gyógyszerként használt glibenclamiddal (20 μ M) ke-



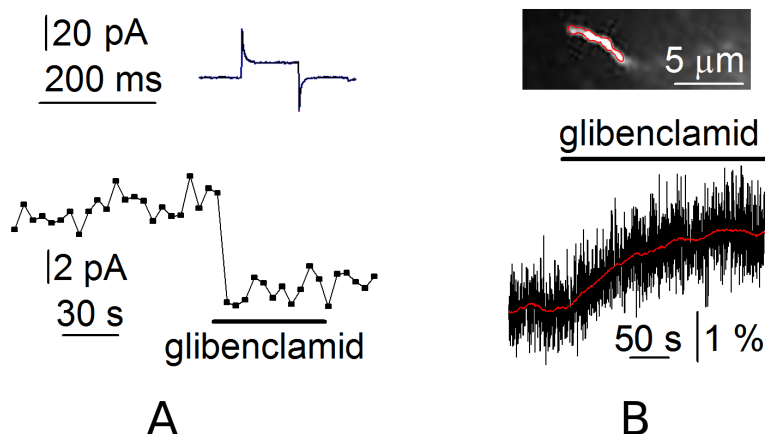
4.3. ábra. *Az inzulin hatása az agykérgi neuronokra.* Az ábrán egy feszültség zár módban elvégzett kísérletből látható három reprezentatív részlet. A neuron sejttestén mérhető spontán serkentő posztszinaptikus áramok frekvenciája lecsökken, mikor 100 nM koncentrációban alkalmazunk inzulint az agyszeletre. Inzulin és S961 specifikus inzulin receptor antagonistá (20 nM) együttes alkalmazásával nem látható sEPSC frekvencia csökkenés.

zeltük. Azt találtuk, hogy a glibenclamiddal kezelt agyszeletekből készült homogenizátumokban szignifikánsan, átlagosan 33,8%-kal magasabb az inzulin koncentrációja, mint a glibenclamiddal nem kezelt agyszeletek esetében ($80.8 \pm 17.5 \text{ pg/mg}$ fehérje $n=10$, $p<0.04$, Mann-Whitney teszt).

4.4. Inzulin hatása azonosított neuronhálózatokra

Az inzulin neuronokra gyakorolt hatását keresve első lépésként II/III rétegi sejteket szűrtünk meg, és elektrofiziológiai jellemzésük után membrántulajdonságaik változását vizsgáltuk 100 nM inzulin bemosásának hatására. Inzulin hatására nem találtunk szignifikáns eltérést a neuronok bemenő ellenállásában, membránpotenciáljában és a membrán időállandójában. Szignifikáns reverzibilis csökkenést találtunk a sejtekre érkező spontán serkentő posztszinaptikus áramok (sEPSC) frekvenciájában, 13.0 ± 9.4 Hz-ről 7.3 ± 5.5 Hz-re ($n=16$, $p<0.001$, Wilcoxon-teszt). Inzulin és a specifikus inzulin receptor antagonistá S961 (20 nM) együttes alkalmazásakor szignifikáns változást nem találtunk az sEPSC frekvenciában (6.2 ± 7.8 Hz, 5.4 ± 4.9 Hz, $n=12$, $p=0.51$) (4.3 ábra).

Az inzulin hatásmechanizmusa után kutatva próbáltuk GABA_A receptorok blok-



4.4. ábra. *A glibenclamid hatása a neurogliaform sejtre.* **A** A neurogliaform sejt -70 mV-os membránpotenciálját -60 mV-ra, majd -70 mV-ra változtattuk, és közben a membránon átfolyó áramokat mértük (bal felső ábra). A bal alsó ábrán a -70 mV-os és -60 mV-os membránpotenciál eléréséhez szükséges tartóáramok különbsége látható az idő függvényében. Csökkenését a glibenclamid hatására bezáródott ioncsatornák okozzák. **B** Ca^{2+} imaging kísérlet látható. Felül egy neurogliaform sejt disztális dendritje, alatta az intracellulárisan töltött OGB-1 fluoreszcenciájának változása az idő függvényében, ami az intracelluláris Ca^{2+} ion koncentrációval arányos. Glibenclamid hatására a neurogliaform sejteken a K_{ATP} csatornák zárulnak, majd ezt intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedés követi.

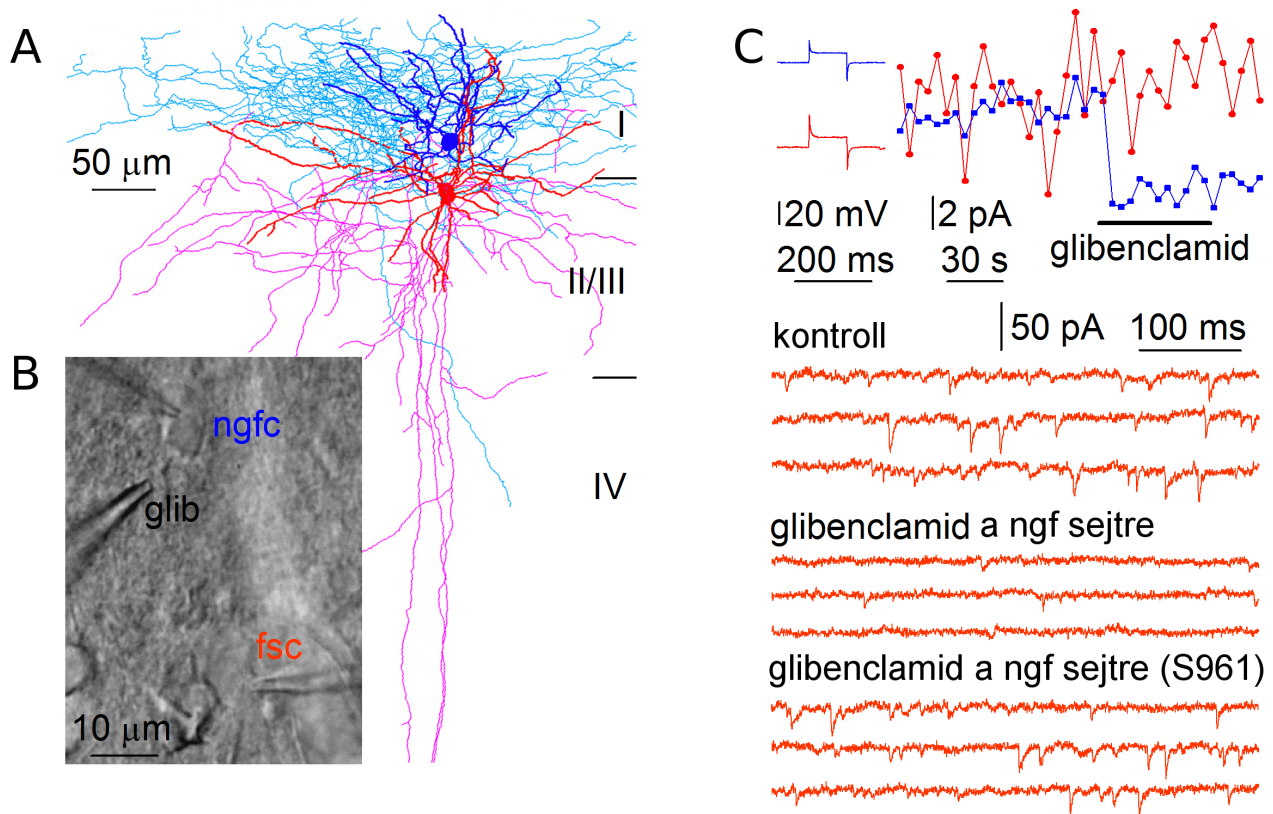
kolásával megakadályozni az inzulin hatását. A GABA_A receptor antagonistá gabazine ($5 \mu\text{M}$) és inzulin (100 nM) együttes bemosása esetén a vizsgált sejtekre érkező EPSC-k frekvenciája $10,94 \pm 6,75 \text{ Hz}$ -ről $7,91 \pm 5,31 \text{ Hz}$ -re csökkent ($n=5$, $p<0.05$, Wilcoxon próba).

4.5. A neurogliaform sejtekből felszabaduló inzulin és annak hatása

Már több mint tíz éve ismert, hogy agykérgi sejtek, első sorban GABAerg inter-neuronok kifejeznek funkcionális K_{ATP} csatornákat (Zawar et al., 1999). Az irodalmi forrásban is alkalmazott protokollal funkcionálisan igazoltuk a K_{ATP} csatornák jelenlétét neurogliaform sejtekben. ATP mentes intracelluláris oldattal megszűrt, alacsony glükóz koncentrációjú oldatban a neurogliaform sejtek esetében a -70mV és -60mV feszültséglépcsőre kapott áramok különbsége glibenclamid ($20 \mu\text{M}$) neurogliaform sejt

sejttestén való lokális alkalmazására szignifikánsan lecsökkent 14.1 ± 4.3 pA-rel ($n=12$, $p<0.03$, Wilcoxon-test), ami a K_{ATP} csatornák bezáródását mutatja. Ugyan ezekben a kísérletekben a neurogliaform sejttel szomszédos piramissejteken és gyorsan tüzelő interneuronok nem tudtunk szignifikáns csökkenést kimutatni a tartóáramok különbségében (2.3 ± 4.8 pA, $n=12$, $p=0.36$). A glibenclamid ($20 \mu\text{M}$) árasztásos alkalmazásánál, neurogliaform sejtek esetén küszöb alatti 4.2 ± 1.4 mV amplitúdójú szomatikus depolarizációt tudtunk kimutatni ($n=5$, $p<0.02$), továbbá OGB-1 kalciumfesték és Alexa-594 struktúrfesték együttes alkalmazásával detektálható, lassú, egy perc alatt kiépülő Ca^{2+} ion koncentráció emelkedést tudtunk kimutatni proximális és disztális neurogliaform sejt dendritekben ($1.6 \pm 0.4\%$ dF/F0, $n=3$) (4.4 ábra).

Következő kísérleteinkben az inzulin szintézisét az idegszövetben is serkentő glibenclamidot $20 \mu\text{M}$ koncentrációban fokálisan alkalmaztuk agyszelet preparátumon egyetlen azonosított sejten, és más $20 - 70 \mu\text{m}$ távolságban lévő idegsejtből whole cell patch clamp üzemmódban elvezettünk (4.5 ábra). A méréseket szintén alacsony glükóz koncentrációjú ($0,5 \text{ mM}$) oldatban végeztük. Ha azonosított neurogliaform sejt szómájára puffoltuk a glibenclamid-ot, a szomszédos sejten a detektált sEPSC-k frekvenciájában szignifikáns csökkenést találtunk, ami specifikus inzulin receptor blokkolóval (S960, 20 nM) visszafordítható volt (kontroll: $11.3 \pm 7.3 \text{ Hz}$, glibenclamid: $6.1 \pm 5.3 \text{ Hz}$, S961: $9.2 \pm 6.2 \text{ Hz}$, $n=11$, $p<0.001$). Ha az S961 inzulin antagonistát a glibenclamid puffolása előtt alkalmaztuk, a szomszédos neuronon nem találtunk szignifikáns sEPSC frekvencia csökkenést (S961: $8.5 \pm 7.8 \text{ Hz}$, S961 és glibenclamid: $9.7 \pm 10.0 \text{ Hz}$, $n=9$, $p=0.47$). Összhangban a molekuláris biológiai kísérletek eredményeivel, a piramissejtekre és gyorsan tüzelő interneuronokra fokálisan alkalmazott glibenclamid a szomszédos sejtekben szignifikáns sEPSC csökkenést nem idézett elő. Piramis sejteken az sEPSC frekvencia $9.5 \pm 4.5 \text{ Hz}$ -ről $9.1 \pm 3.8 \text{ Hz}$ -re változott ($n=11$, $p=0.38$), gyorsan tüzelő interneuronok esetén $7.6 \pm 3.9 \text{ Hz}$ -ről $7.1 \pm 4.0 \text{ Hz}$ -re csökkent ($n=5$, $p=0.40$). Megvizsgáltuk, hogy a neurogliaform sejtek fokális glibenclamid adása okozhat-e GABA felszabadulást. A glibenclamid fokális applikációjakor a neurogliaform sejtekkel szomszédos sejten a sEPSC frekvencia szignifikánsan csökkent szelektív GABA_B receptor blokkoló CGP35348 ($40 \mu\text{M}$) jelenlétében (CGP35348: $10.4 \pm 2.8 \text{ Hz}$, CGP35348 + glibenclamid: $8.5 \pm 3.4 \text{ Hz}$, $n=5$, $p<0.01$).



4.5. ábra. A neurogliaform sejtől felszabaduló inzulin csökkenti a környező neuronokra érkező sEPSC frekvenciát. **A** Háromdimenziós rekonstrukció egy reprezentatív kísérletről. A kísérleti elrendezésben két neuronból vezettünk el whole cell patch clamp módszerrel, egy neurogliaform sejtől, valamint egy gyorsan tüzelő interneuronból. A glibenclamidot neurogliaform (sejttest és dendritek sötétkékek, axon világoskék) sejttestére juttattuk, és ennek hatását figyeltük a szomszédos gyorsan tüzelő interneuronon (sejttest és dendritek pirosak, axon rózsaszín). **B** DIC felvétel a harmadik elektródával glibenclamid (glib) neurogliaform sejtire történő lokális applikációja. (fsc - gyorsan tüzelő interneuron; ngfc - neurogliaform sejt) **C** A sejtek membránján 10 mV amplitúdójú feszültséglépcső hatására mért áram. Glibenclamid hatására a neurogliaform sejt membránján átfolyó áram lecsökken a K_{ATP} csatornák bezárása miatt, míg a szomszédos gyorsan tüzelő interneuronon nincs szignifikáns változás. Az ábra alsó részén a gyorsan tüzelő interneuron sejt szómáján elvezetett sEPSC-k láthatóak a kísérlet kezdetén, a neurogliaform sejtire való glibenclamid puffolás után, valamint a glibenclamid és S961 együttes alkalmazásakor.

4.6. Az inzulin mRNS szintézise indukálható agykérgi neurogliaform sejtekben, amit inzulin fehérje szintézis követ

Az inzulin felszabadulása a hasnyálmirigy béta sejtjeiből a környéki idegrendszer és az extracelluláris tér glükóz koncentrációja szabályozza. Ha növekszik az extracelluláris tér glükóz koncentrációja, megnövekszik a glükóz bejutása a béta sejtekbe a GLUT2 transzporterén keresztül. A sejten belüli megnövekedett glükóz koncentráció hatására nő az intracelluláris ATP koncentráció, és csökken az intracelluláris ADP koncentráció (Lang, 1999). Az ATP direkt kölcsönhatás során képes zárni az ATP szenzitív kálium csatornákat (K_{ATP}) (Nichols, 2006). A K_{ATP} csatornák záródása miatt a béta sejtek depolarizálódnak, melynek hatására kinyílnak a feszültségfüggő Ca^{2+} ioncsatornák. A megnövekedett intracelluláris Ca^{2+} ion koncentráció hatására megtörténik az inzulin felszabadítása.

Már korábban kimutatták az inzulin fehérje jelenlétét az agy különböző területein (Havrankova and Schmechel, 1978; Baskin et al., 1983). Kísérleteinkben inzulin felszabadítását glibenclamiddal indukáltuk mely potens K_{ATP} csatorna blokkoló, a medicinában II-es típusú diabéteszes betegek kezelésére használják, a véráramba jutva a hasnyálmirigy inzulin termelését fokozza. In vitro glibenclamid kezelést alkalmazva, majd radioimmun vizsgálat elvégzése során 20,4 pg inzulin fehérje növekedést detektáltunk mg fehérjénként, ami szignifikáns növekedés volt a kontrollhoz képest. Az agyban megjelenő inzulin forrása eddigi adatok alapján a hasnyálmirigyből a vér-agy gáton keresztül eddig nem azonosított transzportrendszeren keresztül történhet. (Banks et al., 1997; Woods and Porte, 1977). Kimutattuk azonban, hogy in vitro agyszeletben előidézhető de novo inzulintermelés is.

A Párhuzamosan QRT-PCR és dPCR módszereket alkalmazva kimutattuk, hogy az agykérgi neurogliaform sejtek specifikusan és indukálhatóan fejezik ki az inzulin fehérjét kódoló ins2 mRNSt. Figyelembe véve, hogy eredményeink csak a sejt periszomatikus területére vonatkoznak –mivel a citoplazma legyűjtése a periszomatikus régióra korlátozódott–, az általunk mért kópiaszámok csak a hasonló módszerrel elvégzett korábbi munkákkal hasonlíthatóak össze. A digitális PCR reakció megbízhatóságát a 18S riboszómális fehérjét kódoló háztartási mRNS-en végzett kontroll vizsgálattal igazoltuk. A sejtcsoportok között nem találtunk különbséget az rps18 mRNS kópiaszámok átlagaiban, valamint az mRNS kópiaszámok közötti szórás sem mond ellent az eddigi adatoknak (Ståhlberg and Bengtsson, 2010). Az agykérgi neurogliaform sejtek esetén, az extracelluláris glükóz koncentrációtól függő ins2 mRNS expressziót találtunk, mind

a QRT-PCR (4.1 ábra), mind a dPCR kísérletekben (4.2 ábra). Agykérgi piramissejtek és gyorsan tüzelő interneuronok esetén ilyen mértékű *ins2* mRNS expressziót nem tapasztaltunk, és ezt az extracelluláris glükóz koncentrációjának változtatása sem volt képes befolyásolni.

A glibenclamiddal inkubált agyszeletekben szignifikánsan magasabb inzulin fehérje mennyiséget mértünk ki, mint a kontroll esetben. Ez a többlet inzulin nem származhatott a hasnyálmirigyből, mivel a glibenclamidos inkubáció az agy leszeletelése után következett be.

A fenti kísérletek bizonyítják, hogy a neurogliaform sejtekben indukálható az inzulin mRNS szintézise, illetve az agyszeletben glibenclamiddal indukálható az inzulin fehérje szintézise. Az *ins2* mRNS extracelluláris glükóz koncentrációtól való függése és a glibenclamid inzulin fehérje szintézisre gyakorolt hatása párhuzamban áll az egész agy szinaptoszóma preparátumokon végzett kísérletekkel (Santos et al., 1999). A felszabaduló inzulinon keresztül a neurogliaform sejt metabolikus homeosztázis szabályozásában vehet részt, inzulin függő glükóz transzportereken (GLUT4) keresztül, amelyek megtalálhatóak az agyi endothél sejtekben (McCall et al., 1997) és neuronokban is (Leloup et al., 1996).

4.7. Az inzulin csökkenti a sEPSC frekvenciát

Whole cell patch clamp vizsgálatainkban az inzulin (100 nM) nem módosította az idegsejtek intrinsic membrántulajdonságait, viszont szignifikánsan csökkentette az idegsejtre érkező sEPSC frekvenciáját, mely specifikus inzulin receptor antagonistával (Schäffer et al., 2008) és tirozin kináz inhibitorral kivédhető volt (lavendustin A 5 μ M) (4.3 ábra). Az inzulin hatását kutatva a központi idegrendszerben igen szerteágazó hatásmechanizmusokat feltételeztek a kutatócsoportok.

Gerincvelő preparátumokon (Spicarova and Palecek, 2010) és idegsejt kultúrákon (Zhou et al., 2001; Man et al., 2000) leírt jelenség, hogy az inzulin (500 nM - 10 μ M) árasztásos alkalmazása az AMPA receptorok internalizációját idézi elő, és ezt a hatást tirozin kináz inhibitor (lavendustin, 10 μ M) alkalmazásával lehetett gátolni.

Primer idegsejt kultúrákon igazolták, hogy 500 nM inzulin hatására az intracelluláris kompartmentekből GABA_A receptorok ülnek ki a poszt-szinaptikus denzitásba, ezzel növelve a sejtre érkező IPSC-k amplitúdóját, csökkentve a piramissejtek tüzelési valószínűségét (Wan, Q. et al. Nature 1997). Kísérleteinkben a GABA_A receptor antagonistá gabazine (5 μ M) nem volt hatással az inzulin sEPSC csökkentő hatására, ezért

feltételezzük, hogy az általunk megfigyelt jelenségben szinaptikus GABA_A receptorok nem vesznek részt. Hasonlóan GABA_A receptorok extraszinaptikus kihelyeződését figyelték meg hippokampális agyszeletekben piramissejteken melyek már 1 nM extracelluláris GABA koncentráció esetén telítődnek, így csökkentve a piramissejtek tüzelési valószínűségét (Jin et al., 2011). Az extracellulárisan kihelyeződő nagyon szenzitív GABA_A receptorok potenciális részvételét az általunk megfigyelt sEPSC frekvencia csökkenés kialakításában gabazine alkalmazásával nem lehet kizárni.

Eredményeinkhez hasonlóan 10 nM inzulin alkalmazásánál gyors és reverzibilis hatást mutattak ki idegsejt kultúrákon (O'Malley et al., 2003). Azt találták, hogy az inzulin mitogén aktivált protein kinázon (MAPK) keresztül aktiválja a K_{ATP} csatornákat, valamint a kalcium- és feszültségfüggő kálium csatornákat (BK), ami a sejtek aktivitás csökkenését okozza. Ez a mechanizmus párhuzamban áll az általunk megfigyelt eredményekkel, ugyanis a kálium ioncsatornák nyitása az agykérgi piramissejtek hiperpolarizációjához, így a tüzelési valószínűség csökkenéséhez vezet, ami az idegsejteken megfigyelhető sEPSC frekvencia csökkenését eredményezheti.

4.8. A neurogliaform sejtekből inzulin szabadítható fel

A PCR kísérletek és a radioimmun vizsgálatok nem adnak direkt bizonyítékot arra, hogy a neurogliaform sejtekből inzulin szabadul fel fiziológiailag releváns koncentrációban. Inzulin szintézise és felszabadítása a hasnyálmirigy béta sejtjeiben megy végbe, ennek mechanizmusa ismert. Mivel az inzulin felszabadításához szükséges fehérjék mindegyike megtalálható az agykéregben is, leellenőriztük, hogy vajon ugyanazzal a mechanizmussal történhet-e az inzulin felszabadítása a neurogliaform sejtekben is, mint a hasnyálmirigy béta sejtjeiben. A neurogliaform sejteken találtunk funkcionális K_{ATP} csatornákat, melyek glibenclamiddal történő zárása a sejttesten kimérhető depolarizációt okozott. A K_{ATP} csatornák zárását kimérhető Ca²⁺ ion koncentráció emelkedés követte (4.4 ábra). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a neurogliaform sejtek a inzulin felszabadításához szükséges fehérjék azonos repertoárjával rendelkeznek.

Az inzulin felszabadulásának bebizonyítása érdekében páros elvezetéseket végeztünk, ahol a két neuron sejttestje legfeljebb 100 µm távolságban helyezkedett el egymástól. Glibenclamid fokális alkalmazása K_{ATP} csatorna záródását okozta a neurogliaform sejten, azonban a szomszédos sejten nem tapasztaltunk áram változást (4.5 ábra). Az agykérgi interneuronokban és piramissejteken előfordul a K_{ATP} csatorna (Zawar et al., 1999), tehát a kapott eredmény azt mutatja, hogy a glibenclamid hatásos koncentrációban csak a neurogliaform sejt közvetlen környezetében volt jelen a glibenclamid lokális

alkalmazása során. A neurogliaform sejtre alkalmazott glibenclamid hatására a szomszédos sejteken az inzulin árasztásos alkalmazásával azonos eredményt kaptunk (sEPSC frekvencia csökkenése), mely S961 inzulin receptor antagonistával blokkolható volt. Az eredmények alapján valószínűsíthető, hogy az agykérgi neurogliaform sejtek a hasnyálmirigy béta sejtjeihez hasonlóan képesek az inzulin felszabadítására. A K_{ATP} csatornák bezárulásával a neurogliaform sejt depolarizálódik, feszültségfüggő Ca^{2+} ioncsatornákon keresztül nő az intracelluláris Ca^{2+} ion koncentráció, melynek hatására felszabadul az inzulin olyan koncentrációban, mely a környező neuronokon kifejti hatását.

4.9. Az inzulin szerepe az agyban

A központi idegrendszer hipotalamuszhoz köthető táplálékfelvétel és nemi működés szabályozása valószínűleg nincs a neurogliaform sejtek hatása alatt, mivel az inzulin féléletideje kicsi (4-6 perc) (Duckworth et al., 1998), és így az agykéreg és a hipotalamusz közötti távolság valószínűleg nem engedi meg a felszabaduló inzulin diffúzióját és hatását.

A neurogliaform sejtek által felszabadított inzulin potenciálisan alkalmas lehet a környező mikrohálózatot ellátó ereken bejutó glükóz mennyiségének szabályozására az inzulinfüggő endotéliumban megtalálható glükóz transzporterek (GLUT4) szabályozásán keresztül. A neurogliaform sejt egyetlen akciós potenciáljának hatására térfogati transzmisszióval GABA kerül az extracelluláris térbe, így pre- és posztszinaptikus, valamint extraszinaptikus receptorokon keresztül gátolja a környező sejteket (Oláh et al., 2009), csökkentve a neurális jelátvitelt. A neuropeptidek felszabadításához azonban nem szükséges akciós potenciál, hanem a Ca^{2+} ion koncentráció emelkedése szükséges és elégséges hozzá (Ludwig et al., 2002). Továbbá az agykérgi neurogliaform sejtek dendritjeibe az akciós potenciálok csak gyengén terjednek vissza (Price et al., 2008), így egy akciós potenciál nem jelent feltétlenül dendritikus Ca^{2+} ion szint emelkedést, ezzel potenciálisan elválaszthatóak az axonális és dendritikus funkciók. Az akciós potenciál függő GABA felszabadítással a neurogliaform sejt a környező mikrohálózat aktivitását szabályozza. Ugyanakkor adataink arra mutatnak, hogy az akciós potenciál független inzulin felszabadításán keresztül képes lehet a környező mikrohálózat metabolikus szabályozására.

Az inzulin eddig nem tisztázott mechanizmuson keresztül kapcsolatban van a diabétesz okozta demencia és az Alzheimer kór kognitív hatásainak kialakításában (Gasparini et al., 2002), továbbá klinikai kísérletekben megfigyelték az enyhébb Alzheimer kórban szenvedő betegek esetén az emelkedett plazma inzulin szint javítja a kognitív

képességeket (Craft et al., 1993). Az inzulint felszabadító neuronok szelektív pusztulása, vagy működési zavara részben magyarázhatja az obezitás, időskori demencia, vagy Alzheimer kór alatt megfigyelhető csökkent agyi inzulin koncentrációt (Pilcher, 2006), és ezek a sejtek potenciális támadáspontot jelenthetnek ezen állapotok klinikai kezelésében.

5. fejezet

Összefoglalás

Az inzulin a hasnyálmirigyben felszabaduló, a sejtek cukorháztartását szabályozó hormon. Az inzulin az agyban is jelen van, koncentrációja itt egy-két nagyságrenddel nagyobb, mint a vérplazmában. A hasnyálmirigy béta sejtjeiből felszabaduló inzulin a vér-agy gát egy telíthető transzportrendszerén keresztül bejuthat az agyba, ahol részt vesz a metabolikus folyamatok szabályzásában, a neuronhálózatok működésének finomhangolásában, a táplálékfelvétel csökkentésében. Az agyi inzulin koncentráció változhat a kor előrehaladtával, obezitás, cukorbetegség, valamint Alzheimer-kór esetén, de vita tárgya, hogy az agyban is történik-e inzulin szintézis.

Kísérleteinkben kimutattuk, hogy az inzulint kódoló mRNS megtalálható az agykérgi GABAerg interneuronok egy altípusában, a neurogliaform sejtekben. Egysejt alapú digitális polimeráz láncreakcióval kimutattuk, hogy az extracelluláris glükóz koncentrációja modulálja az inzulint kódoló mRNS kópiaszámát. A K_{ATP} csatorna blokkoló glibenclamid - amely inzulinszint növelő gyógyszerként használatos - alkalmazása agyszeletben de novo inzulin szintézist okozott. Az inzulin alkalmazása az extracelluláris folyadékban reverzibilisen csökkentette az idegsejtekre érkező spontán serkentő poszt-szinaptikus áramok (sEPSC) frekvenciáját. Az inzulin hatásához hasonlóan a glibenclamid fokális alkalmazása neurogliaform sejtekre a környező neuronokon csökkentette a sEPSC frekvenciát és ez a hatás nem volt kimutatható inzulin receptor antagonistá egyidejű alkalmazása esetén. Az fenti eredmények alapján elmondható, hogy az agykérgi neuronok egy alpopulációja inzulint szintetizál és szabadít fel, így ezzel képes lehet az agykérgi metabolikus szükségletet a helyi mikrohálózati aktivitáshoz igazítani.

Irodalomjegyzék

- Accili D, Drago J, Lee EJ, Johnson MD, Cool MH, Salvatore P, Asico LD, Jose PA, Taylor SI, Westphal H (1996) Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene. *Nat Genet* 12:106–109.
- Banks Wa, Jaspan JB, Huang W, Kastin aJ (1997) Transport of insulin across the blood-brain barrier: saturability at euglycemic doses of insulin. *Peptides* 18:1423–9.
- Baskin DG, Stein LJ, Ikeda H, Woods SC, Figlewicz DP, Porte DJ, Greenwood MR, Dorsa DM, Young JJaT (1985) Genetically obese Zucker rats have abnormally low brain insulin content. *Life Sciences* 36.
- Baskin DG, Porte D, Guest K, Dorsa Daniel M (1983) Regional Concentrations of Insulin in the Rat Brain. *Endocrinology* 112:898–903.
- Biessels GJ, Kamal a, Urban IJ, Spruijt BM, Erkelens DW, Gispen WH (1998) Water maze learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin treatment. *Brain research* 800:125–35.
- Buhl EH, Han ZS, Lorinczi Z, Stezhka VV, Karnup SV, Somogyi P (1994) Physiological properties of anatomically identified axo-axonic cells in the rat hippocampus. *J Neurophysiol* 71:1289–1307.
- Cauli B, Porter JT, Tsuzuki K, Lambolez B, Rossier J, Quenet B, Audinat E (2000) Classification of fusiform neocortical interneurons based on unsupervised clustering. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6144–6149.
- Clarke DW, Mudd L, Boyd FT, Fields M, Raizada MK (1986) Insulin Is Released from Rat Brain Neuronal Cells in Culture. *Journal of Neurochemistry* 47:831–836.
- Cobb SR, Buhl EH, Halasy K, Paulsen O, Somogyi P (1995) Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. *Nature* 378:75–78.

- Craft S, Dagogo-jack SE, Wiethop BV, Murphy C, Nevins RT, Fleischman S, Rice V, Newcomer JW, Cryer PE (1993) Effects of Hyperglycemia on Memory and Hormone Levels in Dementia of the Alzheimer Type : A Longitudinal Study. *Behavioral Neuroscience* 107:926–940.
- Devaskar SU, Giddings SJ, Rajakumar Pa, Carnaghi LR, Menon RK, Zahm DS (1994) Insulin gene expression and insulin synthesis in mammalian neuronal cells. *The Journal of biological chemistry* 269:8445–54.
- Duckworth WC, Bennett RG, Hamel FG (1998) Insulin degradation: progress and potential. *Endocrine reviews* 19:608–24.
- Fox CA, Rafols JA (1971) Observations on the oligodendroglia in the primate striatum. Are they Ramon y Cajal's "dwarf" or "neurogliaform" neurons? *J Hirnforsch* 13:331–340.
- Freund TF, Buzsaki G (1996) Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6:347–470.
- Frölich L, Bernstein H, Engelsberger S, Humrich J, Laufer S (1998) Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease. *Insulin* pp. 423–438.
- Gasparini L, Netzer WJ, Greengard P, Xu H (2002) Does insulin dysfunction play a role in Alzheimer's disease ? *Trends in Pharmacological Sciences* 23:288–293.
- Hajos N, Palhalmi J, Mann EO, Nemeth B, Paulsen O, Freund TF (2004) Spike timing of distinct types of GABAergic interneuron during hippocampal gamma oscillations in vitro. *J Neurosci* 24:9127–9137.
- Havrankova J, Roth J, Brownstein M (1978) Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. *Nature* 272:827–829.
- Havrankova J, Roth J, Brownstein MJ (1979) Concentrations of Insulin and of Insulin Receptors in the Brain are Independent of Peripheral Insulin Levels: Studies of Obese and Streptozotocin-treated Rodents. *The Journal of Clinical Investigation* 64:636–642.
- Havrankova J, Schmechel D (1978) Identification of insulin in rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 75:5737–5741.
- Hedlich A, Werner L (1986) Classification of neurons of the visual cortex of the guinea pig (*Cavia porcellus*). A Golgi study. *J Hirnforsch* 27:651–677.

- Hestrin S, Armstrong WE (1996) Morphology and physiology of cortical neurons in layer I. *J Neurosci* 16:5290–5300.
- Jin Z, Jin Y, Kumar-Mendu S, Degerman E, Groop L, Birnir B (2011) Insulin reduces neuronal excitability by turning on GABA(A) channels that generate tonic current. *PloS one* 6:e16188.
- Kawaguchi Y, Kubota Y (1996) Physiological and morphological identification of somatostatin- or vasoactive intestinal polypeptide-containing cells among GABAergic cell subtypes in rat frontal cortex. *J Neurosci* 16:2701–15.
- Kawaguchi Y, Kubota Y (1997) GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb Cortex* 7:476–86.
- Kawaguchi Y, Kubota Y (1998) Neurochemical features and synaptic connections of large physiologically-identified GABAergic cells in the rat frontal cortex. *Neuroscience* 85:677–701.
- Kisvarday ZF, Gulyas A, Beroukas D, North JB, Chubb IW, Somogyi P (1990) Synapses, axonal and dendritic patterns of GABA-immunoreactive neurons in human cerebral cortex. *Brain* 113:793–812.
- Kitamura T, Kahn CR, Accili D (2003) Insulin receptor knockout mice. *Annual review of physiology* 65:313–32.
- Klausberger T, Marton LF, Baude A, Roberts JD, Magill PJ, Somogyi P (2004) Spike timing of dendrite-targeting bistratified cells during hippocampal network oscillations in vivo. *Nat Neurosci* 7:41–47.
- Klausberger T, Magill PJ, Márton LF, Roberts JDB, Cobden PM, Buzsáki G, Somogyi P (2003) Brain-state- and cell-type-specific firing of hippocampal interneurons in vivo. *Nature* 421:844–8.
- Lang J (1999) Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion. *European journal of biochemistry / FEBS* 259:3–17.
- Leloup C, Arluison M, Kassis N, Lepetit N (1996) Discrete brain areas express the insulin-responsive glucose transporter GLUT4. *Molecular brain research* pp. 0–8.
- Ludwig M, Sabatier N, Bull PM, Landgraf R, Dayanithi G, Leng G (2002) Intracellular calcium stores regulate activity-dependent neuropeptide release from dendrites. *Nature* 418:85–9.

- Man HY, Lin JW, Ju WH, Ahmadian G, Liu L, Becker LE, Sheng M, Wang YT (2000) Regulation of AMPA receptor-mediated synaptic transmission by clathrin-dependent receptor internalization. *Neuron* 25:649–62.
- Marin-Padilla M (1985) Neurogenesis of the climbing fibers in the human cerebellum: a Golgi study. *J Comp Neurol* 235:82–96.
- Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C (2004) Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nature reviews. Neuroscience* 5:793–807.
- McCall aL, van Bueren aM, Huang L, Stenbit A, Celnik E, Charron MJ (1997) Forebrain endothelium expresses GLUT4, the insulin-responsive glucose transporter. *Brain research* 744:318–26.
- McCormick DA, Connors BW, Lightall JW, Prince DA (1985) Comparative electrophysiology of pyramidal and sparsely spiny stellate neurons of the neocortex. *J Neurophysiol* 54:782–806.
- McDonald AJ, Culbertson JL (1981) Neurons of the basolateral amygdala: a Golgi study in the opossum (*Didelphis virginiana*). *Am J Anat* 162:327–42.
- Miles R, Toth K, Gulyas AI, Hajos N, Freund TF (1996) Differences between somatic and dendritic inhibition in the hippocampus. *Neuron* 16:816–823.
- Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW (2006) Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 443:289–295.
- Mueckler M (1994) Facilitative glucose transporters. *European journal of biochemistry / FEBS* 219:713–25.
- Nichols CG (2006) KATP channels as molecular sensors of cellular metabolism. *Nature* 440:470–6.
- Oláh S, Füle M, Komlósi G, Varga C, Báldi R, Barzó P, Tamás G (2009) Regulation of cortical microcircuits by unitary GABA-mediated volume transmission. *Nature* 461:1278–81.
- O'Malley D, Shanley LJ, Harvey J (2003) Insulin inhibits rat hippocampal neurones via activation of ATP-sensitive K⁺ and large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Neuropharmacology* 44:855–863.
- Park CR (2001) Cognitive effects of insulin in the central nervous system. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 25:311–23.

- Peters A, Jones EG (1984) *Classification of cortical neurons*, Vol. 1 Plenum Press, New York, Peters, a. edition.
- Pilcher H (2006) Alzheimer's disease could be "type 3 diabetes".
- Pohl G, Shih IM (2004) Principle and applications of digital PCR. *Expert review of molecular diagnostics* 4:41–7.
- Price CJ, Scott R, Rusakov Da, Capogna M (2008) GABA(B) receptor modulation of feedforward inhibition through hippocampal neurogliaform cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28:6974–82.
- Ramon y Cajal S (1911) *Histologie du Système. Nerveux de l'Homme et des Vertébrés*, Vol. Chap. II Maloine, Paris.
- Saltiel A, Kahn R (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799–806.
- Sancesario G, Pisani A, D'Angelo V, Calabresi P, Bernardi G (1998) Morphological and functional study of dwarf neurons in the rat striatum. *Eur J Neurosci* 10:3575–83.
- Santos MS, Pereira EM, Carvaho aP (1999) Stimulation of immunoreactive insulin release by glucose in rat brain synaptosomes. *Neurochemical research* 24:33–6.
- Schäffer L, Brand CL, Hansen BF, Ribel U, Shaw AC, Slaaby R, Sturis J (2008) A novel high-affinity peptide antagonist to the insulin receptor. *Biochemical and biophysical research communications* 376:380–3.
- Schechter R, Sadiq HF, Devaskar SU (1990) Insulin and Insulin mRNA are Detected in Neuronal Cell Cultures Maintained in an Insulin-free/Serum-free Medium. *The Journal of histochemistry and cytochemistry* .
- Schlessinger J (2010) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103:211–225.
- Somogyi P, Tamas G, Lujan R, Buhl EH (1998) Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex. *Brain Res Rev* 26:113–135.
- Spanswick D, Smith Ma, Mirshamsi S, Routh VH, Ashford MLJ (2000) Insulin activates ATP-sensitive K⁺ channels in hypothalamic neurons of lean, but not obese rats. *Nature neuroscience* 3:757–8.
- Spicarova D, Palecek J (2010) Modulation of AMPA excitatory postsynaptic currents in the spinal cord dorsal horn neurons by insulin. *Neuroscience* 166:305–11.

- Spruston N, Schiller Y, Stuart G, Sakmann B (1995) Activity-dependent action potential invasion and calcium influx into hippocampal CA1 dendrites. *Science* 268:297–300.
- Ståhlberg A, Bengtsson M (2010) Single-cell gene expression profiling using reverse transcription quantitative real-time PCR. *Methods (San Diego, Calif.)* 50:282–8.
- Szabadics J, Lorincz A, Tamas G (2001) Beta and gamma frequency synchronization by dendritic GABAergic synapses and gap junctions in a network of cortical interneurons. *J Neurosci* 21:5824–5831.
- Tamas G, Buhl EH, Lorincz A, Somogyi P (2000) Proximally targeted GABAergic synapses and gap junctions synchronize cortical interneurons. *Nat Neurosci* 3:366–371.
- Tamas G, Buhl EH, Somogyi P (1997) Fast IPSPs elicited via multiple synaptic release sites by distinct types of GABAergic neuron in the cat visual cortex. *J Physiol (Lond)* 500:715–738.
- Tamas G, Lorincz A, Simon A, Szabadics J (2003) Identified sources and targets of slow inhibition in the neocortex. *Science* 299:1902–1905.
- Tamas G, Szabadics J (2004) Summation of unitary IPSPs elicited by identified axo-axonic interneurons. *Cereb Cortex* 14:823–826.
- Vogelstein B, Kinzler KW (1999) Digital PCR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:9236–41.
- Wei L, Matsumoto H, Rhoads DE (1990) Release of Immunoreactive Insulin from Rat Brain Synaptosomes Under Depolarizing Conditions. *Journal of Neurochemistry* 54:1661–1662.
- Woods SC, Porte D (1977) Relationship between plasma and cerebrospinal fluid insulin levels of dogs. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 233:G331–G334.
- Woods SC, Lotter EC, McKay LD, Porte D (1979) Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature* 282:503–505.
- Zawar C, Plant TD, Schirra C, Konnerth A, Neumcke B (1999) Cell-type specific expression of ATP-sensitive potassium channels in the rat hippocampus. *The Journal of physiology* 514 (Pt 2:327–41.
- Zhou Q, Xiao M, Nicoll RA (2001) Contribution of cytoskeleton to the internalization of AMPA receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:1261–6.

6. fejezet

Köszönetnyilvánítás

Hálával tartozom e dolgozat elkészítésében nyújtott segítségéért:

Dr. Tamás Gábornak

Dr. Molnár Gábornak

Dr. Füle Miklósnak

Dr. Oláh Szabolcsnak

Dr. Puskás Lászlónak

Dr. Kocsis Ágnes Katalinnak

Faragó Nórának

Lovas Sándornak

Tóth Évának

Komlósi Gergelynek

Boldog Eszternek

Baka Judithnak

Báldi Ritának

Piszár Ildikónak

családomnak

7. fejezet

Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez

Alulírott Rózsa Márton, Biológia MSc szakos hallgató, kijelentem, hogy részt vettem az azonosított sejtek citoplazmáinak legyűjtésében, az elektrofiziológiai és képkalkotó kísérletekben, valamint ezek analízisében.

Rózsa Márton
2012. június 14.