

XXXI. OTDK Biológia Szekció

TRPC6 csatornák lokalizációja a hippocampális régióban

Nagy Attila Gergő

Biológia BSc I. évfolyam

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Biológia szak

Magyar Tudományos Akadémia

Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet

Hálózat-Idegélettan Kutatócsoport

Témavezető: Dr. Hájos Norbert

Belső konzulens: Dr. Toldi József

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	2
Bevezetés:.....	3
Célkitűzés:	5
Anyag és módszer:	6
Állatok kezelése:	6
Immunhisztokémia:	6
A TRPC6 csatornák térbeli eloszlásának kvantitatív analízise a gyrus dentatus szemcsesejtek felszínén:.....	7
Eredmények és értékelésük:	9
TRPC6 csatornák lokalizációja patkány hippocampális régiójában	9
TRPC6 csatornák lokalizációja egér hippocampális régiójában és az immunreakció specifikusságának ellenőrzése Trpc6 génkiütött egerekben	9
A TRPC6 csatornák szubcelluláris eloszlása a gyrus dentatus-ban	10
A dendritüskék felszínén a TRPC6 csatornák térbeli eloszlása egyenletes, némileg preferálva az aszimmetrikus szinapszisok körül elhelyezkedő periszinaptikus gyűrűt	10
TRPC6 csatornák szubcelluláris eloszlása a stratum lucidum-ban.....	10
Interneuronok TRPC6 expressziója	11
A TRPC6 csatornák az interneuronok dendritjeiben plazmamembránhoz asszociáltan lokalizálódnak	12
Összefoglalás	13
TRPC6 csatornák a gyrus dentatus szemcsesejtjeinek plazmamembránjában	13
TRPC6 csatornák a gyrus dentatus szemcsesejtjeinek axonjaiban és axonterminálisaiban.....	14
TRPC6 csatornák az interneuronokon.....	15
Irodalomjegyzék:	17
Köszönetnyilvánítás:	23
Függelék:	24
1. ábra	24
2. ábra	26
3. ábra	28
4. ábra	29
5. ábra	31
6. ábra	32
7. ábra	33
Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez:	34

Bevezetés:

A hippocampális régió számos kognitív idegi tevékenységben játszik kulcsszerepet, például az információ kódolásában és előhívásában vagy a térbeli tájékozódásban (Bird és Burgess, 2008). A hippocampus és a gyrus dentatus idegi hálózata egyaránt serkentő principális és gátló GABAerg idegsejtekből áll (Freund és Buzsáki, 1996). A gyrus dentatusban a serkentősejtek funkcióját a hiláris mohasejtek és a szemcsesejtek töltik be, míg a hippocampusban a piramissejtek látják el ezt a funkciót (Amaral és munkatársai, 1990). Ellentétben a principális sejtekkel a gátlósejtek a két régióban hasonlóak (Freund és Buzsáki, 1996). A principális sejtek periszomatikus régióját egy Ca^{2+} kötő fehérjét, parvalbumint tartalmazó gyorsan tüzelő kosár- és axoaxonikus sejtek, valamint a szabályosan tüzelő CB1 kannabinoid receptorokat és egy neuropeptidet, a kolecisztokinint expresszáló kosársejtek innerválják (Freund és Katona, 2007). Kolecisztokinin a serkentősejtek dendritjein szinaptizáló interneuronokban is megtalálható (Cope és mtsai, 2002; Klausberger és mtsai, 2005). A principális sejtek dendritfájának legdisztálisabb részét az mGlu_{1a} metabotrópos glutamát receptorokat és egy neuropeptidet, a szomatosztatint expresszáló GABAerg interneuronok innerválják (Baude és mtsai, 1993; Katona és mtsai, 1999; Ferraguti és mtsai, 2004). Ez utóbbi sejtípus, a tipikus visszacsatoló gátlósejtnek tekinthető, ugyanis serkentő bemeneteik nagy részét éppen az általuk innervált principális sejtektől kapják (Blasco-Ibanez és Freund, 1995; Maccaferri és McBain, 1995). A hippocampális régió előreccsatoló gátlását a parvalbumint tartalmazó interneuronok adják, amiknek tüzelését jó hatásfokkal váltják ki az előreccsatoló serkentő afferensek (Glickfeld és Scanziani, 2006). Látható tehát, hogy a hippocampális régióban a principális sejtek különböző komputációs doménjeinek gátló szabályozását különböző, egymástól anatómiai és élettani tulajdonságaikban határozottan elkülönülő interneuron populációk látják el (Miles és mtsai, 1996; Lovett-Barron és mtsai, 2012).

Az úgynevezett hosszantartó receptor potenciálokat (transient receptor potential, TRP) kialakító kation csatornák számos sejtélettani funkcióban játszanak szerepet (Ramsey és mtsai, 2006). Összesen 28 típusú TRP csatorna különböztethető meg, amelyek szekvencia homológiájuk alapján 6 különböző alcsaládba tartoznak (Clapham, 2003; Owsianik és mtsai, 2006). A TRPC („canonical”) alcsalád tagjai jelentős Ca^{2+} permeabilitással bírnak és ezeket a csatornákat a hippocampusban számos receptor –mint például a tirozin kináz TrkB receptorok (TRPC3), az mGlu_1 és mGlu_5 metabotrópos glutamát receptorok (TRPC5) vagy a muszkarinikus kolinerg receptorok (TRPC5) – képes aktiválni (Abramowitz és Birnbaumer, 2009; Bollimuntha és mtsai,

2011). A TRPC5 csatornáknak feltehetően szerepe van a hippocampális piramissejtek axonális növekedésében is (Greka és mtsai, 2003).

Keveset tudunk azonban a TRPC6 csatornák hippocampális régióban betöltött funkciójáról. Korábbi vizsgálatok alapján úgy tűnik, hogy ezen csatornáknak a dendritikus növekedésben és a serkentő szinapszisok kialakulásában szerepük van, továbbá más tanulmányok szerint a TRPC6 csatornák részt vehetnek a retrogád messenger endokannabinoidok szintézisében is (Thai és mtsai, 2008; Zhou és mtsai, 2008; Bardel és Barker, 2010; Katona és Freund, 2008; Kano és mtsai, 2009). Ismert, hogy a diacylglicerol (DAG), amely molekula az endokannabinoidok előanyaga is, képes a TRPC6 csatornák nyitására (Hofmann és mtsai, 1999; Aires és mtsai, 2007). Egy hipotézis szerint a DAG által kinyitott TRPC6 csatornákon keresztül az idegsejtekbe áramló Ca^{2+} aktiválhatja a Ca^{2+} szenzitív DAG-lipázt és ezáltal ezek a csatornák részt vehetnek az endokannabinoidok szintézisében is (Bisogno és mtsai, 2003). A DAG szintézisében (mGlu_5 receptorok, foszfolipáz C) és degradációjában (DAG lipáz) résztvevő proteinek, egy periszinaptikus gyűrűt alkotva, a dendrittűskékre érkező aszimmetrikus, serkentő szinapszisok szélén helyezkednek el (Lujan és mtsai, 1996; Lujan és mtsai 1997; Katona és mtsai, 2007; Fukaya és mtsai, 2008). Tehát, ha a fentiekben leírt hipotézis igaz és a TRPC6 csatornák valóban részt vesznek az endokannabinoidok szintézisben, akkor, legalábbis részben, ebben a periszinaptikus gyűrűben kell elhelyezkedniük.

Célkitűzés:

Annak érdekében, hogy közelebb jussunk a TRPC6 csatornák pontosabb szerepének a feltárásához a különböző idegéletti folyamatokban, célunk volt meghatározni, hogy a felnőtt hippocampális régió idegi hálózatának, mely elemei expresszálják ezeket a csatornákat.

Anyag és módszer:

Állatok kezelése:

A kísérleteket az Intézeti Etikai Kódex irányelveinek és a Magyarországon hatályos szabályozásnak (1998, XXVIII, 243/1998 cikkely) megfelelően hajtottuk végre. Az állatokat 12-12 órás fény-sötét ciklusban voltak tartva és korlátlan mennyiségű élelem és víz állt rendelkezésükre. Minden lehetséges erőfeszítés megtörtént, annak érdekében, hogy az okozott fájdalom és szenvedés a lehető legkisebb mértékű legyen, valamint, hogy a kísérletek során a lehető legkevesebb állatot használjuk fel. A tanulmány során 10 darab Wistar patkány (200-400g, Charles River, Magyarország) és 2 felnőtt *Trpc6* génkiütött egér illetve ezek vadttípusú alomtársai (n=2) kerültek felhasználásra.

Immunhisztokémia:

A patkányokat intraperitoneálisan adott 0,2 ml /100 g testsúly dózisú equesin injekcióval mélyen elaltattuk. Ezután az állatokat szíven keresztül a következő oldatokkal perfundáltuk: először 2 percig 4 °C 0,9%-os NaCl oldattal, majd 10 percig 2 % paraformaldehidet és 3,75 % Acroleint tartalmazó foszfát pufferrel (pH=7,4), amit 2% paraformaldehid tartalmú foszfát puffer követett 20 percen át. Az egerek agyát 4%-os paraformaldehidben immerziósan fixáltuk. A fixálást követően Leica 1000S vibratómmal 40-50 µm vastagságú koronális metszeteket készítettünk, amiket 30% szacharóz tartalmú 0,1 M foszfát puffer alapú krioprotektív oldatba helyeztünk 1 éjszakára, majd az antitestek penetrációjának növelése érdekében, a metszeteket folyékony nitrogén fölött alumínium csónakokban fagyasztottuk. Alapos mosás után a metszeteket 0,1 M foszfát puffer alapú 1%-os nátrium-borohidrid oldattal kezeltük.

Ezután a metszeteket 2% marha szérum albumint (BSA), 100 mg/ml glicint, 10% normál kecske szérumot (Vector laboratories) tartalmazó Tris-pufferált só oldatba (TBS) (pH= 7,4) helyeztük 30 percre, majd 4 °C 1 éjszakán át inkubáltuk nyúl anti-TRPC6 antitesteket (Alomone labs Ltd, Jeruzsálem, Izrael) 1:20000 arányban tartalmazó TBS oldatban. Az elsődleges antitest kimosása után a metszeteket kecske anti-nyúl (Vector laboratories, Burlingame, CA), biotinilált, 1:200 arányban TBS-el hígított másodlagos antiszérumban inkubáltuk 2 órán keresztül. A metszeteket ezután TBS alapú, 1:300 arányban hígított avidin-biotinilált tormaperoxidáz komplexben (ABC Elite, Vector laboratories) inkubáltuk 2 órán át, amit immunperoxidáz reakció

követett, kromogénként diaminobenzidint (DAB, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) használva.

A TRPC6 fehérjék szubcelluláris lokalizációjának meghatározásához beágyazás előtti immunarany festést alkalmaztunk. Ebben az esetben a metszeteket a TRPC6 elleni antiszérumban (1:5000) 2 napig inkubáltuk, amit 1 nm-es aranszemcsékkel konjugált anti-nyúl másodlagos antitestet (Aurion, Wageningen, Hollandia) (1:50 arányban 1% BSA-t, 0,1% zselatint és 100 mg/ml glicint tartalmazó TBS-ben hígítva) tartalmazó oldatban 1 éjszakán át tartó inkubáció követett. A metszeteket TBS alapú 2% glutáraldehidet tartalmazó oldattal posztfixáltuk, majd az immunjeleket ezüsttel intenzifikáltuk.

Minden immunperoxidáz és immunarany festést a metszetek 1 percen át 0,5%-os OsO_4 -el majd 15 percen át 1%-os OsO_4 -el történő kezelése követte. Ezután a metszeteket felszálló alkoholsorral és acetonitrillel dehidráltuk, majd műgyantába (Durcupan) ágyasztuk. A dehidrálás közben a metszeteket 30 percen keresztül 1%-os uranil-acetáttal és 70%-os etanollal kezeltük. Végül a metszeteket újra átágyasztuk és fény- (Zeiss Axioscope 2) illetve elektronmikroszkóppal (JEOL JEM-1011) vizsgáltuk.

A konfokális mikroszkópos vizsgálatokhoz anti-TRPC6 (1:3000) és tengerimalacban termeltetett anti-mGlu_{1a} (1:500; Frontier Institute co. Ltd, Japan; (Tanaka és mtsai, 2000)) vagy anti-TRPC6 (1:3000) és egér anti-parvalbumin (1:2000; Sigma-Aldrich) antitestek keverékét használtuk. A metszeteket ezután 2 órán át a TBS-ben hígított másodlagos antitesteket tartalmazó oldatokkal inkubáltuk: Alexa Fluor 488 kecske anti-nyúl antitest (1:200; Molecular Probes, Eugene, OR) és Alexa Fluor 594 kecske anti-tengerimalac antitest (1:200; Molecular Probes) vagy Alexa Fluor 488 kecske anti-nyúl antitest (1:200; Molecular Probes) és Alexa Fluor 594 kecske anti-egér antitest (1:200; Molecular Probes). Mosás után a metszeteket üveg tárgylemezekre húztuk és Aqua poly/mount-tal (Polysciences Inc, Warrington, PA, USA) fedtük le. A fedőlemezeket körömlakkal rögzítettük. A felvételeket Nikon A1R konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal készítettük.

A TRPC6 csatornák térbeli eloszlásának kvantitatív analízise a gyrus dentatus szemcsesekjtek felszínén:

Minden kvantifikációt 3 patkányból származó szövetmintákon végeztünk. Mivel a különböző állatokból származó mintákon végzett mérések eredményei között nem találtunk szignifikáns különbséget, a különböző állatokból kapott adatokat összevonva elemeztük. Az analízishez az ImageJ szoftvert (NIH) használtuk. Ha az ezüsttel intenzifikált immunarany szemcsék kevesebb, mint 100 nm távolságra helyezkedtek el a plazmamembrántól, akkor azokat a plazmamembránhoz asszociálnak tekintettük. Az analízishez a felvételeket 3 ultravékony metszetből álló sorozatmetszetekben, 2500-szoros nagyításon készítettük a stratum moleculare vagy

startum granulosum középső régiójáról. Az immunjelek sűrűségének meghatározását a középső metszetről készült felvételen végeztük, úgy, hogy minden a képen teljesen látható (tehát a képről nem lelógó) profilt a 2 szomszédos metszetről készült felvételeket felhasználva dendritként, dendrittüskéként, szómaként, axon végződésenként vagy ismeretlen profilként meghatároztunk, majd a középső felvételen az adott kategóriába tartozó összes profilban lokalizálódó immunszemcsék számát osztottuk az adott kategóriába tartozó összes profil teljes membránhosszával. Mivel az immunjelek eloszlása nem különbözött szignifikánsan a normál eloszlástól ($p < 0,01$) a kapott immunjel/membránhossz eredményeket az átlaggal és az átlag szórásával jellemeztük.

A TRPC6 csatornák dendrittüskék felszínén való térbeli eloszlásának meghatározásához állatonként ($n=3$) 93 immunjelet vettünk be az analízisbe. A Lujan és mtsai által korábban leírt módszertant követve (Lujan és mtsai, 1996; Lujan és mtsai, 1997) minden immunjel esetében meghatároztuk a szinaptikus réstől való távolságát plazmamembrán mentén. Ezek után meghatároztuk az adott dendrittüske félkerületét, amit 60 nm-es egységekre osztottunk, majd minden egyes immunjelet a meghatározott egységek valamelyikébe soroltunk a szinaptikus réstől való távolsága alapján. A három adatsor nem különbözött egymástól szignifikánsan ($p > 0,5$, Kruskal-Wallis nem-parametrikus teszt), így az adatokat összevonva elemeztük.

Eredmények és értékelésük:

TRPC6 csatornák lokalizációja patkány hippocampális régiójában

Hogy áttekintést nyerjünk arra vonatkozóan, hogy a TRPC6 csatornákat a hippocampális régió mely idegi elemei expresszálják, a TRPC6 transzmembrán protein intracelluláris C-terminusa ellen termeltetett poliklonális antitesttel végeztünk immunfestést. Patkány szövetben az immunperoxidáz festés DAB kromogént használva erős jelet adott a gyrus dentatus-ban a stratum moleculare-ban és némileg gyengébbet a hippocampusz CA3 régiójában a stratum lucidum-ban. (1. ábra, A, B, D) Emellett a hilus-ban és a stratum oriens-ben egyaránt láthatóak voltak immunjelölt tüskés dendritek (1. ábra, C; 6. ábra, A, D), valamint a stratum radiatum-ban és stratum oriens-ben a piramissejteivel párhuzamosan futó sima dendritek közül is több immunreaktívnek bizonyult (1. ábra, A).

TRPC6 csatornák lokalizációja egér hippocampális régiójában és az immunreakció specifikusságának ellenőrzése Trpc6 génkiütött egerekben

Az immunfestések antigén-antitest reakciójának specifikusságát vad típusú és Trpc6 génkiütött egerek hippocampuszai immunfestődésének összehasonlításával ellenőriztük (Dietrich és mtsai, 2005). Vad típusú egérben az immunfestődés mintázata megegyezett a patkányban látottal (2. ábra, A): a stratum moleculare erősen, míg a stratum lucidum némileg gyengébben estődött (2. ábra, A, C), valamint a stratum oriens-ben, stratum radiatum-ban és hilus-ban lokalizálódó interneuron dendritek jelölődése is megfigyelhető volt (2. ábra, B). Ezzel szemben a Trpc6 génkiütött egérben sem a stratum moleculare és stratum lucidum, sem pedig az interneuron dendritek immunreaktivitása nem volt kimutatható (2. ábra, D, E, F). Mindemellett néhány neuron citoplazmájának és számos gliasejteknek az immunjelöltsége a patkány és vad típusú egér, valamint a Trpc6 génkiütött egér hippocampuszában egyaránt megfigyelhető volt (2. ábra, E, F). Ezen eredmények alapján elmondható, hogy a TRPC6 csatornák jelen vannak a gyrus dentatus szemcsesejtjeinek ki- és bemeneti régiójában, valamint az interneuronok dendritjeiben is, továbbá, hogy a gliasejtek és néhány neuron szómájának a citoplazmatikus jelölődése ezzel az antitesttel nem specifikus.

A TRPC6 csatornák szubcelluláris eloszlása a gyrus dentatus-ban

A további kísérletek mindegyikét patkány hippocampális régiójában végeztük. A TRPC6 csatornák szubcelluláris eloszlásának vizsgálatához preembedding immunarany festést használtunk, és meghatároztuk, hogy a jelek túlnyomó része a szemcsesejtek plazmamembránjához kötődik (3. ábra). A TRPC6 csatornák serkentősejteken való lokalizációjának pontos leírásához az immunjelek sűrűségét három különböző kompartmentumban (dendrituskék, dendritek, sejtestek) hasonlítottuk össze. Az immunjelek sűrűsége a dendritek plazmamembránjában volt a legnagyobb ($0,12 \pm 0,01$ jel/ μm , $n=150$), ennél szignifikánsan kisebb sűrűségben voltak megfigyelhetők az immunjelek a dendrituskékben ($0,04 \pm 0,01$ jel/ μm , $n=267$) és a sejtestekben ($0,06 \pm 0,01$ jel/ μm , $n=20$) (3. ábra). Ezen eredmények azt mutatják, hogy a TRPC6 csatornák a gyrus dentatus szemcsesejteiben preferáltan a dendriteken lokalizálódnak.

A dendrituskék felszínén a TRPC6 csatornák térbeli eloszlása egyenletes, némileg preferálva az aszimmetrikus szinapszisok körül elhelyezkedő periszinaptikus gyűrűt

Noha a TRPC6 csatornák sűrűsége a dendriteken volt a legnagyobb, további részletesebb vizsgálatot a dendrituskéken végeztünk. Ennek oka, hogy néhány fehérje (például a dendrituskékben a DAG koncentrációjának szabályozásáért felelős fehérjék) a dendrituskére érkező aszimmetrikus szinapszis szélén elhelyezkedve periszinaptikus gyűrűt hoznak létre (Katona és Freund, 2008). Annak érdekében, hogy eldöntsük, vajon a TRPC6 csatorna részét képezi-e a periszinaptikus gyűrűnek, meghatároztuk a TRPC6 csatornák szinaptikus réshez viszonyított szubszinaptikus térbeli elrendeződését. A Lujan és kollégái által kidolgozott módszer szerint (Lujan és mtsai, 1996; Lujan és mtsai, 1997) a dendrituske félkerületét 60 nm-es egységekre osztottuk, majd ezekbe az egységekbe soroltuk be az immunjeleket a szinapszis szélétől való távolságuk alapján (4. ábra). Ezen vizsgálattal kiderítettük, hogy a dendrituskék felszínén a TRPC6 csatornák térbeli eloszlása egyenletes, azonban némileg preferáltan helyezkednek el a periszinaptikus gyűrűben. Meghatároztuk továbbá azt is, hogy az immunjelek az esetek kevesebb mint 2%-ában helyezkedtek el a posztzinaptikus denzitásban, vagy intracellulárisan a citoplazmában.

TRPC6 csatornák szubcelluláris eloszlása a stratum lucidum-ban

Mivel mind a patkány, mind a vad típusú egér hippocampusában megfigyelhető volt a stratum lucidum festődése, amely azonban hiányzott a *Trpc6* génkiütött egér hippocampusában, a

következőekben a gyrus dentatus szemcsesejtjeinek axonvégződési zónájában vizsgáltuk a TRPC6 csatornák szubcelluláris eloszlását. Szemben a stratum moleculare-val, ahol az immunjelek a dendritekben és a dendrittüskékben szinte kizárólag plazmamembránhoz kötötten lokalizálódtak (3. ábra), a stratum lucidum-ban az immunjelölés a moharostokra jellemző módon szerveződő axonok belsejében, valamint a szemcsesejtek speciális axon terminálisaiban, az úgynevezett mohaterminálisokban volt látható (5. ábra). A mohaterminálisokban az immunszemcsék az intracelluláris ciszternák membránjához illetve a plazmamembránhoz asszociáltan fordultak elő, a vezikulum klasztereket minden esetben elkerülték. Ezen a megfigyelések alapján elmondhatjuk, hogy míg a szemcsesejtek dendritjeiben és dendrittüskéiben a TRPC6 csatornák szinte kizárólag a plazmamembránhoz kapcsolódva vannak jelen, addig ugyanezen sejtek axonjaiban és axonvégződéseiben gyakran intracellulárisan is, a terminálisokban sokszor feltehetően intracelluláris membrán ciszternákhoz asszociálódva.

Interneuronok TRPC6 expressziója

Következő kísérleteinkben a TRPC6 immunreaktív dendritekkel rendelkező interneuronok azonosítását végeztük el. A stratum oriens és alveus határán, valamint a hilus-ban látható sűrű, TRPC6 immunpozitív dendritálózat az mGlu_{1a} metabotrópos glutamát receptorokat expresszáló interneuronok dendritjeire hasonlított. Kettős immunfluoreszcens festéssel bizonyítottuk, hogy a TRPC6 csatornák lokalizálódnak az mGlu_{1a} receptorokat expresszáló interneuronok dendritjein (6. ábra, A-F). A stratum radiatum-ban megfigyelhető, szintén TRPC6 immunreaktivitást mutató sima dendritek meghatározásához neurokémiai markerként a parvalbumint választottuk, ugyanis ezt a Ca²⁺ kötő fehérjét a hippocampális régió számos GABAerg sejtje expresszálja (Katsumaru és mtsai, 1988; Freund és Buzsáki, 1996). A kettős immunfestett metszetek vizsgálatából kiderült, hogy ezen dendritek nagy része a TRPC6 mellett parvalbumint is tartalmaz (6. ábra, G-I). A stratum moleculare-ban a TRPC6 csatornák parvalbumin immunpozitív dendriteken való jelenlétét nem lehetett vizsgálni, ugyanis – feltehetően a szemcsesejtek dendritjeinek és dendrittüskéinek erős immunjelöltsége miatt - az egyes TRPC6 immunreaktív interneuron dendriteket egymástól nem lehetett megkülönböztetni (1. ábra, B). Eredményeink szerint tehát, a TRPC6 csatornák jelen vannak legalább kettő különböző interneuron populációban, melyek közül az egyik az mGlu_{1a} receptorok expressziójával, a másik pedig parvalbumin tartalmával jellemezhető.

A TRPC6 csatornák az interneuronok dendritjeiben plazmamembránhoz asszociáltan lokalizálódnak

Végezetül az interneuronok dendritjein vizsgáltuk TRPC6 csatornák szubcelluláris lokalizációját. Beagyazás előtti immunarany festést alkalmazva meghatároztuk, hogy az immunarany-szemcsék a stratum oriens-ben és hilus-ban található tüskés interneuron dendritekben (7. ábra, A, B) (Baude és mtsai, 1993; Acsády és mtsai, 1998; Takács és mtsai, 2012) a plazmamembránhoz asszociáltan találhatók. A stratum radiatum-ban lévő, a parvalbumin immunpozitív dendritekre hasonlító (Gulyás és mtsai, 1999), sima, aszimmetrikus szinapszisokkal sűrűn borított dendritekben (7. ábra, C) az immunjelek szintén ilyen módon lokalizálódtak. Ezen eredmények alapján elmondhatjuk, hogy a TRPC6 csatornák megfelelő pozícióban vannak ahhoz, hogy mind az mGlu_{1a} receptorokat expresszáló, mind a parvalbumint tartalmazó GABAerg sejtek bemeneteit szabályozzák a hippocampális régióban.

Összefoglalás

Munkánkban leírtuk, hogy a hippocampális régióban a TRPC6 csatornákat a gyrus dentatus szemcsesejtei és gátló interneuronok expresszálják. Elektronmikroszkópos vizsgálatokkal meghatároztuk, hogy ezek a csatornák az interneuronok dendritjeinek valamint a gyrus dentatus szemcsesejtek dendritjeinek, dendrittüskéinek és sejtestjeinek plazmamembránjához asszociálódva fordulnak elő. Továbbá részletesebb vizsgálataink megmutatták azt is, hogy a szemcsesejtek dendrittüskéinek felszínén a TRPC6 csatornák eloszlása egyenletes, kivéve, hogy a csatornák némileg sűrűbben lokalizálódnak az aszimmetrikus szinapszist körülvevő periszinaptikus gyűrűben. A szemcsesejtek axonjaiban és axon terminálisaiban a TRPC6 fehérjék leginkább intracellulárisan helyezkednek el, míg a mohaterminálisokban gyakran membrán ciszternákhoz kapcsolódva.

TRPC6 csatornák a gyrus dentatus szemcsesejtjeinek plazmamembránjában

Immuncitokémiai eredményeink, melyek a TRPC6 csatornák erős expresszióját igazolták a stratum moleculare-ban, alátámasztják egy korábbi vizsgálat eredményeit (Chung és mtsai, 2006), amelyben egy másik, szintén TRPC6 ellen termeltetett antitestet használtak. Ebben a munkában a szerzők a stratum moleculare-n kívül egyéb rétegekben nem találtak immunjelölt profilokat. Immunarany technikát alkalmazva ezeket az adatokat kiegészítettük azzal, hogy tisztáztuk, a gyrus dentatus szemcsesejtjeiben a TRPC6 csatornák a dendritek és dendrittüskék plazmamembránjához asszociáltan lokalizálódnak. Mivel ezeknek a csatornáknak a nyitását DAG kontrollálja (Hofmann és mtsai, 1999; Aires és mtsai, 2007), a TRPC6 fehérjék térbeli eloszlását a tüskék felszínén összehasonlítottuk a lokális DAG koncentráció szabályozásában résztvevő fehérjék lokalizációjával. Ilyen jellegű kvantitatív adat az aszimmetrikus szinapszisok körül elhelyezkedő periszinaptikus gyűrűben is megtalálható mGlu₅ receptorokra, PLCβ 1/4 és DAG lipáz fehérjékre vonatkozóan érhető el (Lujan és mtsai, 1996; Lujan és mtsai, 1997; Nakamura és mtsai, 2004; Katona és mtsai, 2006; Yoshida és mtsai, 2006; Fukaya és mtsai, 2008). Eredményeink alapján a TRPC6 csatornák egy része preferáltan a periszinaptikus gyűrűben helyezkedik el, az mGlu₅ receptor mediált DAG produkcióhoz szükséges fehérje apparátussal szerkezeti korrelációt mutatva. Ez alapján feltételezhető, hogy a gyrus dentatus szemcsesejtjeinek mGlu-függő depolarizációját kísérő Ca²⁺ emelkedés, legalábbis részben, a TRPC6 csatornákon keresztül történik. A TRPC6 csatornákon keresztül a sejtbe jutó Ca²⁺ számos egyéb szerepe mellett a csatorna zárásához vezető visszacsatoló jelként is szolgálhat (Hofmann és mtsai, 1999). Az intracelluláris Ca²⁺-szint

emelkedés hatására a DAG lipáz működése jelentősen fokozódhat, ami így még hatékonyabban hasítja a DAG molekulákat és vezet a csatorna zárásához (Bisogno és mtsai, 2003). Tehát a TRPC6 csatornák szabályozó folyamatai - az mGlu₅ receptorok aktivációjának hatására bekövetkező PLCβ1-függő DAG termelődés és a DAG-lipáz által végzett DAG-bontás, amely folyamatokhoz szükséges fehérje apparátus - a gyrus dentatus szemcsesejtjeinek dendrittüskéiben kompartmentalizálódik. A hippocampális piramissejtek dendrittüskéiben feltehetően hasonló mechanizmus működik, itt a TRPC6 csatornák helyett a Ca²⁺-ra kevésbé permeábilis TRPC3 és/vagy TRPC7 csatornák játszhatnak szerepet az mGlu-függő depolarizációban (Abramowitz és Birnbaumer, 2009; Bollinmuntha és mtsai, 2011; Gee és mtsai, 2003). Kiemelendő, hogy elvben minden Gq proteinhez kapcsolt metabotróp receptor aktiválhatja a TRPC6 vagy akár a többi DAG-érzékeny TRPC csatornát. Példának okért korábbi munkák eredményei mutatják, hogy a Gq jelátviteli útvonalon keresztül működő mGlu_{1a}, TrkB vagy az 1-es típusú muszkarinikus receptorok megtalálhatóak a principális sejtek dendrittüskéinek felszínén (Baude és mtsai, 1993; Lujan és mtsai, 1996; Drake és mtsai, 1999; Yamasaki és mtsai, 2010). Tehát elvileg lehetséges, hogy mindezen metabotrópos receptorok aktivációjuk után DAG-érzékeny TRPC csatornákat nyissanak ki, amelyek aztán mediálják a kationáramlást a kérgi serkentősejtek dendrittüskéibe.

A TRPC6 csatornák a szemcsesejtek dendrittüskéi mellett a dendritek és a sejtestek felszínén is lokalizálódnak. A fent felsorolt metabotrópos receptorok mindegyike megtalálható ezen sejtek dendritjeinek és sejtestjeinek plazmamembránjában is, így feltehető, hogy a TRPC6 csatornák nyitása ezekben a kompartmentekben is hasonlóan történik. Mindezek alapján elmondható, hogy a gyrus dentatus szemcsesejtjeinek bemeneti régiói rendelkeznek a TRPC6 csatornák működésének szabályozásához szükséges molekuláris rendszerekkel.

Egy új tanulmány szerint a dendritikus növekedésben és a szinapszisok formálásában betöltött szabályozó funkciójuk mellett, a TRPC6 csatornák lehetséges szereppel bírnak a neurotranszmitter felszabadulást jelentősen csökkenteni képes endokannabinoidok szintézisében is (Bardell és Barker, 2010; Kano és mtsai, 2009; Katona és Freund, 2008). Mivel a DAG által aktivált TRPC6 csatornák a Ca²⁺-szint lokális emelkedéséhez vezetnek – ami az endokannabinoid szintézis egyik szükséges lépése -, ezért feltehető, hogy ezek a csatornák a CB1 kannabinoid receptorok által mediált szinaptikus plaszticitási folyamatokban is részt vesznek (Katona és Freund, 2008 ; Kano és mtsai, 2009).

TRPC6 csatornák a gyrus dentatus szemcsesejtjeinek axonjaiban és axonterminálisaiban

A dendritekben és dendrittüskékben megfigyelttel szemben, a moharostokban a TRPC6

csatornákat jelölő immunszemcsék gyakran intracellulárisan helyezkednek el, ami azt sugallja, hogy ezek a csatornák az axonok végződéseiben feltehetően más szerepet töltenek be, mint ugyanezen sejtek bemeneti régiójában. Egyes kísérleti adatok arra utalnak, hogy a TRPC6 csatornák szerepet játszhatnak az intracelluláris Ca^{2+} raktárak Ca^{2+} szintjének szabályozásában (Cahalan, 2009; Pani és mtsai, 2012). Ezt a hipotézist eredményeink is alátámasztják, hiszen a mohaterminálisokban az immunjelek gyakran intracelluláris membrán ciszternákhoz asszociálódva fordulnak elő, amelyek intracelluláris Ca^{2+} raktárakként funkcionálhatnak. Shimizu és munkatársai leírták (Shimizu és mtsai, 2008) a 2-es típusú ryanodin receptorok szubcelluláris loklizációját a gyrus dentatus szemcsesejtjeinek axonjaiban. Hasonlóan a TRPC6 csatornák általunk megfigyelt eloszlásához, a 2-es típusú ryanodin receptorok szintén elsősorban az axonokban intracellulárisan és kisebb részt a terminálisokban lokalizálódtak, ahol az immunjelek szinte minden esetben elkerülték a vezikulum klasztereket. Shimizu és munkatársai kimutatták, hogy a ryanodin receptorok aktivációja felerősíthet egy kialakuló Ca^{2+} -jelet. Ennek fényében érdekes hipotézis, hogy az ugyanezen kompartmentumokban hasonló lokalizációt mutató TRPC6 csatornáknak is szerepe lehet a Ca^{2+} szint szabályozásában, és ilyen módon közvetve a neurotranszmitter felszabadulás regulációjában is.

TRPC6 csatornák az interneuronokon

A serkentő szemcsesejtek mellett a gátló mGlu_{1a} receptorokat expresszáló, illetve a parvalbumin tartalmú interneuronok is kifejezik a TRPC6 csatornákat a dendritikus membránfelszíneiken. Mivel mindkét interneuron populáció rendelkezik mGlu_1 és/vagy mGlu_5 receptorokkal (Baude és mtsai, 1993; Lujan és mtsai, 1996; van Hooft és mtsai, 2000; Topolnik és mtsai, 2006), 1-es és/vagy 3-as típusú muszkarinikus receptorokkal (Lawrence és mtsai, 2006; Ceardel Rio és mtsai, 2010) és valószínűleg TrkB receptorokkal (Holm és mtsai, 2009) valamint DAG lipázzal (Peterfi és mtsai, 2012) is, feltételezhetően a TRPC6 csatornák működésének szabályozása az interneuronokban a szemcsesejtekéhez hasonló módon történhet. Egy korábbi tanulmányban leírtak szerint a TRP csatornákon keresztül beáramló Ca^{2+} a CA1 stratum oriens régiójában horizontális dendritekkel rendelkező, mGlu_{1a} immunpozitív interneuronokra emlékeztető sejteknél, a bemeneti régióra érkező serkentő szinapszisok hosszútávú megerősödéséhez vezetett (Topolnik és mtsai, 2006). Ebben a munkában a szerzők nem határozták meg, hogy pontosan mely TRP csatornák okozzák ezt a hatást, de eredményeink alapján, feltételezhető, hogy a nagy relatív Ca^{2+} permeabilitással bíró TRPC6 csatornák hozzájárulhatnak ezen jelenség kialakulásához. Az általunk vizsgált két egyaránt TRPC6 immunpozitívnak bizonyuló interneuron populáció közül az egyik az

előrecsatoló gátlást (parvalbumin immunpozitív interneuronok), míg a másik a visszacsatoló gátlást (mGlu_{1a} immunpozitív interneuronok) biztosító gátló neuronkörök alkotója, így elmondható, hogy a hippocampális régióban a DAG-érzékeny TRPC6 csatornák aktivációja révén lehetséges az információfeldolgozás módosítása (Pouille és Scanziani, 2004).

Mindent összevetve, eredményeink alapján a TRPC6 csatornák Gq metabotrópos receptorok általi aktivációjuk révén a hippocampális triszinaptikus kör első fázisában, a gyrus dentatus-ban található szemcses sejtek Ca²⁺ szintjének változtatásával képesek az információ feldolgozását módosítani, továbbá ezen csatornák az interneuronok dendritjein expresszálódva megfelelő pozíciót foglalnak el ahhoz, hogy a különböző interneuron típusok szinaptikus plaszticitási folyamataiban szerepet játszanak.

Irodalomjegyzék:

- Abramowitz J, Birnbaumer L (2009) Physiology and pathophysiology of canonical transient receptor potential channels. *FASEB J* 23:297-328.
- Acsády L, Kamondi A, Sik A, Freund T, Buzsáki G (1998) GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus. *J Neurosci* 18:3386-3403.
- Aires V, Hichami A, Boulay G, Khan NA (2007) Activation of TRPC6 calcium channels by diacylglycerol (DAG)-containing arachidonic acid: a comparative study with DAG-containing docosahexaenoic acid. *Biochimie* 89:926-937.
- Amaral DG, Ishizuka N, Claiborne B (1990) Neurons, numbers and the hippocampal network. *Progress in brain research* 83:1-11.
- Bardell TK, Barker EL (2010) Activation of TRPC6 channels promotes endocannabinoid biosynthesis in neuronal CAD cells. *Neurochem Int* 57:76-83.
- Baude A, Nusser Z, David J, Roberts B, Mulvihill E, McIlhinney RAJ, Somogyi P (1993) The metabotropic glutamate receptor (mGluR1) is concentrated at perisynaptic membrane of neuronal subpopulations as detected by immunogold reaction. *Neuron* 11:771-787.
- Bird CM, Burgess N (2008) The hippocampus and memory: insights from spatial processing. *Nature reviews. Neuroscience* 9:182-194.
- Bisogno T, Howell F, Williams G, Minassi A, Cascio MG, Ligresti A, Matias I, Schiano-Moriello A, Paul P, Williams EJ, Gangadharan U, Hobbs C, Di Marzo V, Doherty P (2003) Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J Cell Biol* 163:463-468.
- Blasco-Ibanez JM, Freund TF (1995) Synaptic input of horizontal interneurons in stratum oriens of the hippocampal CA1 subfield: structural basis of feed-back activation. *Eur J neurosci* 7:2170-2180.

- Bollimuntha S, Selvaraj S, Singh BB (2011) Emerging roles of canonical TRP channels in neuronal function. *Advances in experimental medicine and biology* 704:573-593.
- Cahalan MD (2009) STIMulating store-operated Ca^{2+} entry. *Nat Cell Biol* 11:669-677.
- Cea-del Rio CA, Lawrence JJ, Tricoire L, Erdelyi F, Szabo G, McBain CJ (2010) M3 muscarinic acetylcholine receptor expression confers differential cholinergic modulation to neurochemically distinct hippocampal basket cell subtypes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:6011-6024.
- Chung YH, Sun Ahn H, Kim D, Hoon Shin D, Su Kim S, Yong Kim K, Bok Lee W, Ik Cha C (2006) Immunohistochemical study on the distribution of TRPC channels in the rat hippocampus. *Brain Res* 1085:132-137.
- Clapham DE (2003) TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426:517-524.
- Cope DW, Maccaferri G, Marton LF, Roberts JD, Cobden PM, Somogyi P (2002) Cholecystokinin-immunopositive basket and Schaffer collateral-associated interneurons target different domains of pyramidal cells in the CA1 area of the rat hippocampus. *Neuroscience* 109:63-80.
- Dietrich A, Mederos YSM, Gollasch M, Gross V, Storch U, Dubrovskaya G, Obst M, Yildirim E, Salanova B, Kalwa H, Essin K, Pinkenburg O, Luft FC, Gudermann T, Birnbaumer L (2005) Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6^{-/-} mice. *Mol Cell Biol* 25:6980-6989.
- Drake CT, Milner TA, Patterson SL (1999) Ultrastructural localization of full-length trkB immunoreactivity in rat hippocampus suggests multiple roles in modulating activity-dependent synaptic plasticity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19:8009-8026.
- Ferraguti F, Cobden P, Pollard M, Cope D, Shigemoto R, Watanabe M, Somogyi P (2004) Immunolocalization of metabotropic glutamate receptor 1 α (mGluR1 α) in distinct classes of interneuron in the CA1 region of the rat hippocampus. *Hippocampus* 14:193-215.

- Freund TF, Buzsáki G (1996) Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6:345 - 470.
- Freund TF, Katona I (2007) Perisomatic inhibition. *Neuron* 56:33-42.
- Fukaya M, Uchigashima M, Nomura S, Hasegawa Y, Kikuchi H, Watanabe M (2008) Predominant expression of phospholipase C β 1 in telencephalic principal neurons and cerebellar interneurons, and its close association with related signaling molecules in somatodendritic neuronal elements. *The European journal of neuroscience* 28:1744-1759.
- Gee CE, Benquet P, Gerber U (2003) Group I metabotropic glutamate receptors activate a calcium-sensitive transient receptor potential-like conductance in rat hippocampus. *J Physiol* 546:655-664.
- Glickfeld LL, Scanziani M (2006) Distinct timing in the activity of cannabinoid-sensitive and cannabinoid-insensitive basket cells. *Nat Neurosci* 9:807-815.
- Greka A, Navarro B, Oancea E, Duggan A, Clapham DE (2003) TRPC5 is a regulator of hippocampal neurite length and growth cone morphology. *Nat Neurosci* 6:837-845.
- Gulyas AI, Megias M, Emri Z, Freund TF (1999) Total number and ratio of excitatory and inhibitory synapses converging onto single interneurons of different types in the CA1 area of the rat hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19:10082-10097.
- Hofmann T, Obukhov AG, Schaefer M, Harteneck C, Gudermann T, Schultz G (1999) Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* 397:259-263.
- Holm MM, Nieto-Gonzalez JL, Vardya I, Vaegter CB, Nykjaer A, Jensen K (2009) Mature BDNF, but not proBDNF, reduces excitability of fast-spiking interneurons in mouse dentate gyrus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:12412-12418.
- Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimotodani Y, Uchigashima M, Watanabe M (2009) Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiological reviews* 89:309-380.

- Katona I, Acsady L, Freund TF (1999) Postsynaptic targets of somatostatin-immunoreactive interneurons in the rat hippocampus. *Neuroscience* 88:37-55.
- Katona I, Freund TF (2008) Endocannabinoid signaling as a synaptic circuit breaker in neurological disease. *Nature medicine* 14:923-930.
- Katona I, Urban GM, Wallace M, Ledent C, Jung KM, Piomelli D, Mackie K, Freund TF (2006) Molecular composition of the endocannabinoid system at glutamatergic synapses. *J Neurosci* 26:5628-5637.
- Katsumaru H, Kosaka T, Heizmann CW, Hama K (1988) Immunocytochemical study of GABAergic neurons containing the calcium-binding protein parvalbumin in the rat hippocampus. *Exp.Brain Res.* 72:347-362.
- Klausberger T, Marton LF, O'Neill J, Huck JH, Dalezios Y, Fuentealba P, Suen WY, Papp E, Kaneko T, Watanabe M, Csicsvari J, Somogyi P (2005) Complementary roles of cholecystokinin- and parvalbumin-expressing GABAergic neurons in hippocampal network oscillations. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:9782-9793.
- Lawrence JJ, Statland JM, Grinspan ZM, McBain CJ (2006) Cell type-specific dependence of muscarinic signalling in mouse hippocampal stratum oriens interneurons. *J Physiol* 570:595-610.
- Lovett-Barron M, Turi GF, Kaifosh P, Lee PH, Bolze F, Sun XH, Nicoud JF, Zemelman BV, Sternson SM, Losonczy A (2012) Regulation of neuronal input transformations by tunable dendritic inhibition. *Nat Neurosci*
- Lujan R, Nusser Z, Roberts JD, Shigemoto R, Somogyi P (1996) Perisynaptic location of metabotropic glutamate receptors mGluR1 and mGluR5 on dendrites and dendritic spines in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 8:1488-1500.
- Lujan R, Roberts JD, Shigemoto R, Ohishi H, Somogyi P (1997) Differential plasma membrane distribution of metabotropic glutamate receptors mGluR1 alpha, mGluR2 and mGluR5, relative to neurotransmitter release sites. *J Chem Neuroanat* 13:219-241.

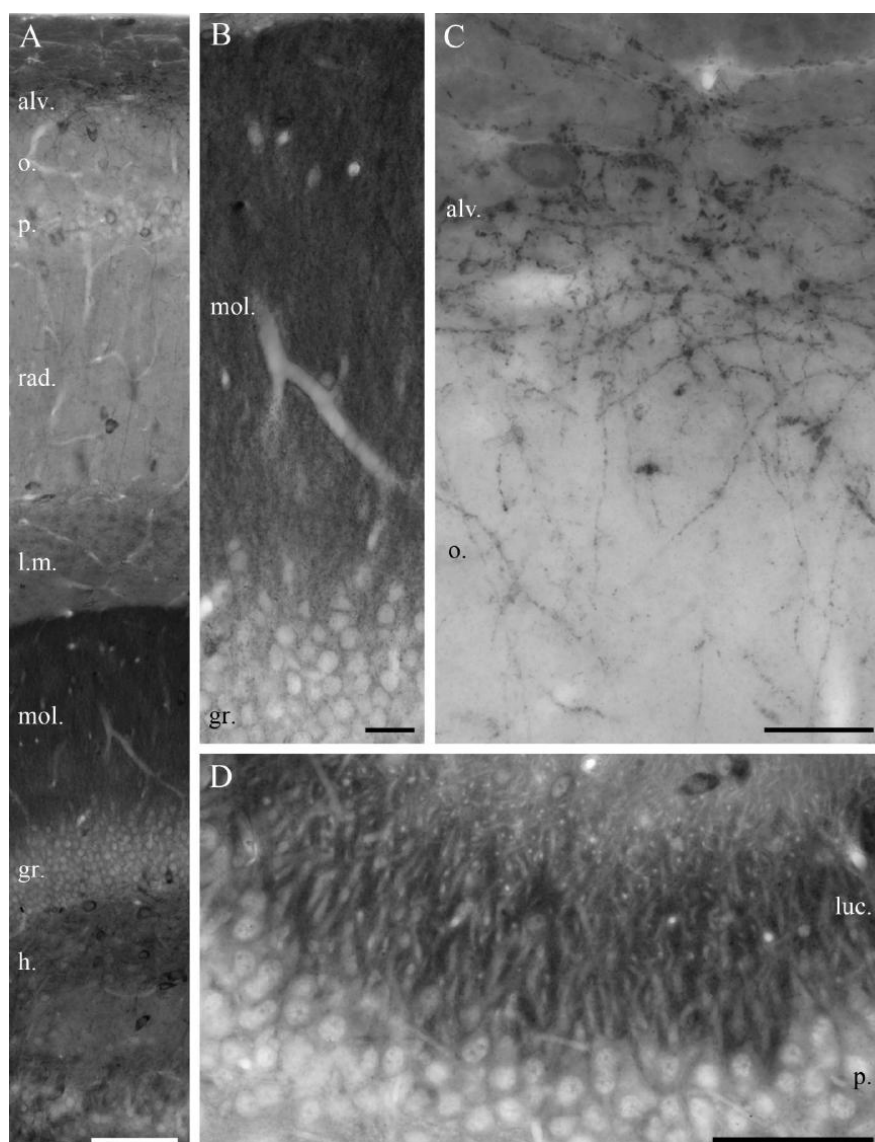
- Maccaferri G, McBain CJ (1995) Passive propagation of LTD to stratum oriens-alveus inhibitory neurons modulates the temporoammonic input to the hippocampal CA1 region. *Neuron* 15:137-145.
- Miles R, Toth K, Gulyás AI, Hajos N, Freund TF (1996) Differences between somatic and dendritic inhibition in the hippocampus. *Neuron* 16:815-823.
- Nakamura M, Sato K, Fukaya M, Araishi K, Aiba A, Kano M, Watanabe M (2004) Signaling complex formation of phospholipase C β 4 with metabotropic glutamate receptor type 1 α and 1,4,5-trisphosphate receptor at the perisynapse and endoplasmic reticulum in the mouse brain. *The European journal of neuroscience* 20:2929-2944.
- Owsianik G, D'Hoedt D, Voets T, Nilius B (2006) Structure-function relationship of the TRP channel superfamily. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 156:61-90.
- Pani B, Bollimuntha S, Singh BB (2012) The TR (i)P to Ca²⁺ signaling just got STIMy: an update on STIM1 activated TRPC channels. *Front Biosci* 17:805-823.
- Péterfi Z, Urbán GM, Papp OI, Németh B, Monyer H, Szabó G, Erdélyi F, Mackie K, Freund TF, Hajos N, Katona I. (2012) Endocannabinoid-mediated long-term depression of afferent excitatory synapses in hippocampal pyramidal cells and GABAergic interneurons. *J Neurosci* 32(41):14448-63.
- Pouille F, Scanziani M (2004) Routing of spike series by dynamic circuits in the hippocampus. *Nature* 429:717-723.
- Ramsey IS, Delling M, Clapham DE (2006) An introduction to TRP channels. *Annual review of physiology* 68:619-647.
- Shimizu H, Fukaya M, Yamasaki M, Watanabe M, Manabe T, Kamiya H (2008) Use-dependent amplification of presynaptic Ca²⁺ signaling by axonal ryanodine receptors at the hippocampal mossy fiber synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:11998-12003.
- Tai Y, Feng S, Ge R, Du W, Zhang X, He Z, Wang Y (2008) TRPC6 channels promote dendritic growth via the CaMKIV-CREB pathway. *J Cell Sci* 121:2301-2307.

- Takacs VT, Klausberger T, Somogyi P, Freund TF, Gulyas AI (2011) Extrinsic and local glutamatergic inputs of the rat hippocampal CA1 area differentially innervate pyramidal cells and interneurons. *Hippocampus*
- Tanaka J, Nakagawa S, Kushiya E, Yamasaki M, Fukaya M, Iwanaga T, Simon MI, Sakimura K, Kano M, Watanabe M (2000) Gq protein alpha subunits Galphaq and Galpha11 are localized at postsynaptic extra-junctional membrane of cerebellar Purkinje cells and hippocampal pyramidal cells. *The European journal of neuroscience* 12:781-792.
- Topolnik L, Azzi M, Morin F, Kougioumoutzakis A, Lacaille JC (2006) mGluR1/5 subtype-specific calcium signalling and induction of long-term potentiation in rat hippocampal oriens/alveus interneurons. *J Physiol* 575:115-131.
- Uchigashima M, Narushima M, Fukaya M, Katona I, Kano M, Watanabe M (2007) Subcellular arrangement of molecules for 2-arachidonoyl-glycerol-mediated retrograde signaling and its physiological contribution to synaptic modulation in the striatum. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:3663-3676.
- van Hooft JA, Giuffrida R, Blatow M, Monyer H (2000) Differential expression of group I metabotropic glutamate receptors in functionally distinct hippocampal interneurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:3544-3551.
- Yamasaki M, Matsui M, Watanabe M (2010) Preferential localization of muscarinic M1 receptor on dendritic shaft and spine of cortical pyramidal cells and its anatomical evidence for volume transmission. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:4408-4418.
- Yoshida T, Fukaya M, Uchigashima M, Miura E, Kamiya H, Kano M, Watanabe M (2006) Localization of diacylglycerol lipase-alpha around postsynaptic spine suggests close proximity between production site of an endocannabinoid, 2-arachidonoyl-glycerol, and presynaptic cannabinoid CB1 receptor. *J Neurosci* 26:4740-4751.
- Zhou J, Du W, Zhou K, Tai Y, Yao H, Jia Y, Ding Y, Wang Y (2008) Critical role of TRPC6 channels in the formation of excitatory synapses. *Nat Neurosci* 11:741-743.

Köszönetnyilvánítás:

Köszönöm mentoromnak és témavezetőmnek Dr. Hájos Norbertnek a sok segítséget , türelmet, és hogy kutatási és tanulási lehetőséget biztosít számomra laborjában. Köszönetet mondok belső konzulensemnek, Dr. Toldi Józsefnek. Köszönet illeti továbbá a Hálózat-Idegélettan Kutatócsoport minden munkatársát.

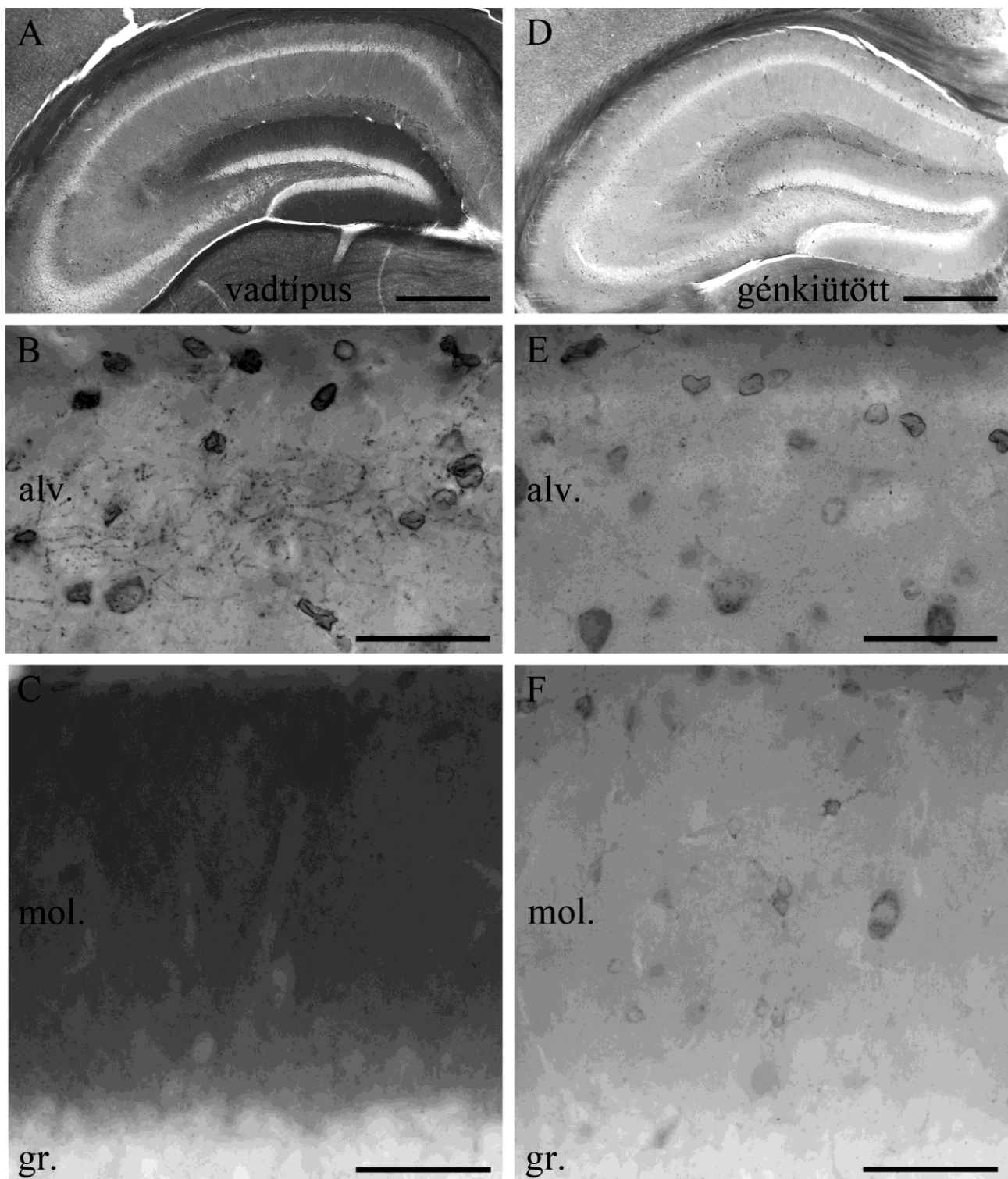
Függelék:



1. ábra

Patkány hippocampális régiójából származó TRPC6 immunfestett szövet fénymikroszkópos képe. A: Kis nagyítású fénymikroszkópos felvétel, melyen a hippocampusz CA1 régiójában és a gyrus dentatus-ban a TRPC6 immunfestődése látszik. A stratum moleculare erős festődése mellett a hilus-ban, a stratum oriensben és a stratum radiatum-ban számos immunjelölt dendrit látszik. Továbbá a hippocampális régió minden régiójában láthatóak TRPC6 immunpozitív interneuron sejttestjeire hasonlító képletek. B: Nagyobb nagyítású fénymikroszkópos felvételen látszik a gyrus dentatus szemcsesejtek dendritjeinek erős immunfestődése a stratum moleculare-ban. C: A CA1 régióban a stratum oriens és alveus határán futó, főleg horizontális lefutású interneuron dendritek által meghatározott különböző idegi elemek immunfestődése látszik. D: A hippocampusz CA3

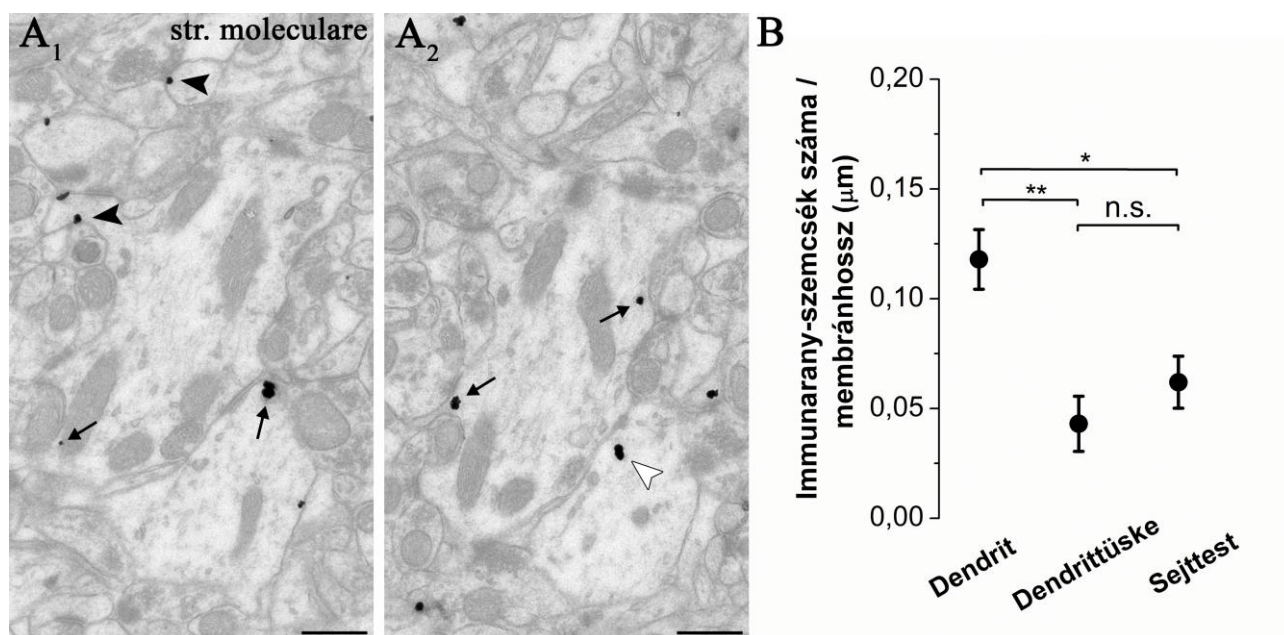
régiójában, a stratum lucidum-ban a piramissejtek láthatóan immunnegatív apikális dendritjeit erősen immunpozitív képletek szegélyezik. Rövidítések: alv., alveus; o., stratum oriens; p., stratum pyramidale; rad., stratum radiatum; l.m., stratum lacunosum-moleculare; mol., stratum moleculare; gr., stratum granulosum; h., hilus. Skálák : A, 100 μ m; B, C, 20 μ m; D, 100 μ m.



2. ábra

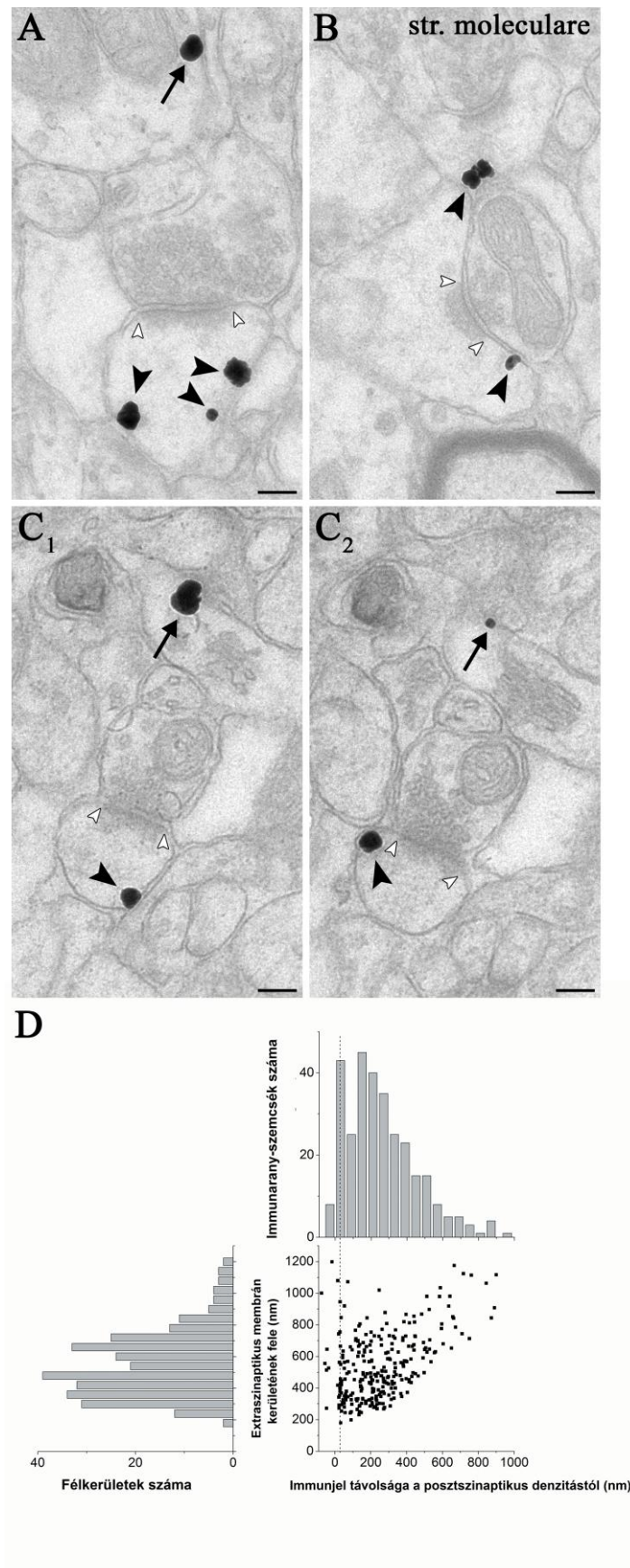
Fénymikroszkópos felvételek egér hippocampális régiójának TRPC6 expressziójáról. A: Vadtípusú egérben a TRPC6 csatornák lokalizációja megegyezik a patkányban látottal. C: A stratum molare erősen festődik, még nagyobb nagyításon sem különíthetők el egymástól az egyes dendritek. B: A stratum oriens és alveus határán elhelyezkedő immunpozitív dendritek vadtípusú egérben is megtalálhatóak, akárcsak a patkány hippocampuszában. D: A vadtípusú egérrel szemben, a *Trpc6* génkiütött egérből készült metszetek esetében nem látható TRPC6 immunjelölés a

hippokampális régióban (F). E: Trpc6 génkiütött egérben nem látszanak a stratum oriens-alveus határán a vadípusú egérben és patkányban látott immunreaktív profilok. A Trpc6 génkiütött állatban látható citoplazmatikus festődés a vadípusú egérben egyaránt megfigyelhető, így ez aspecifikus jelölésnek tekintendő. Skálák: A, D: 500 μm ; B, C, E, F: 50 μm .



3. ábra

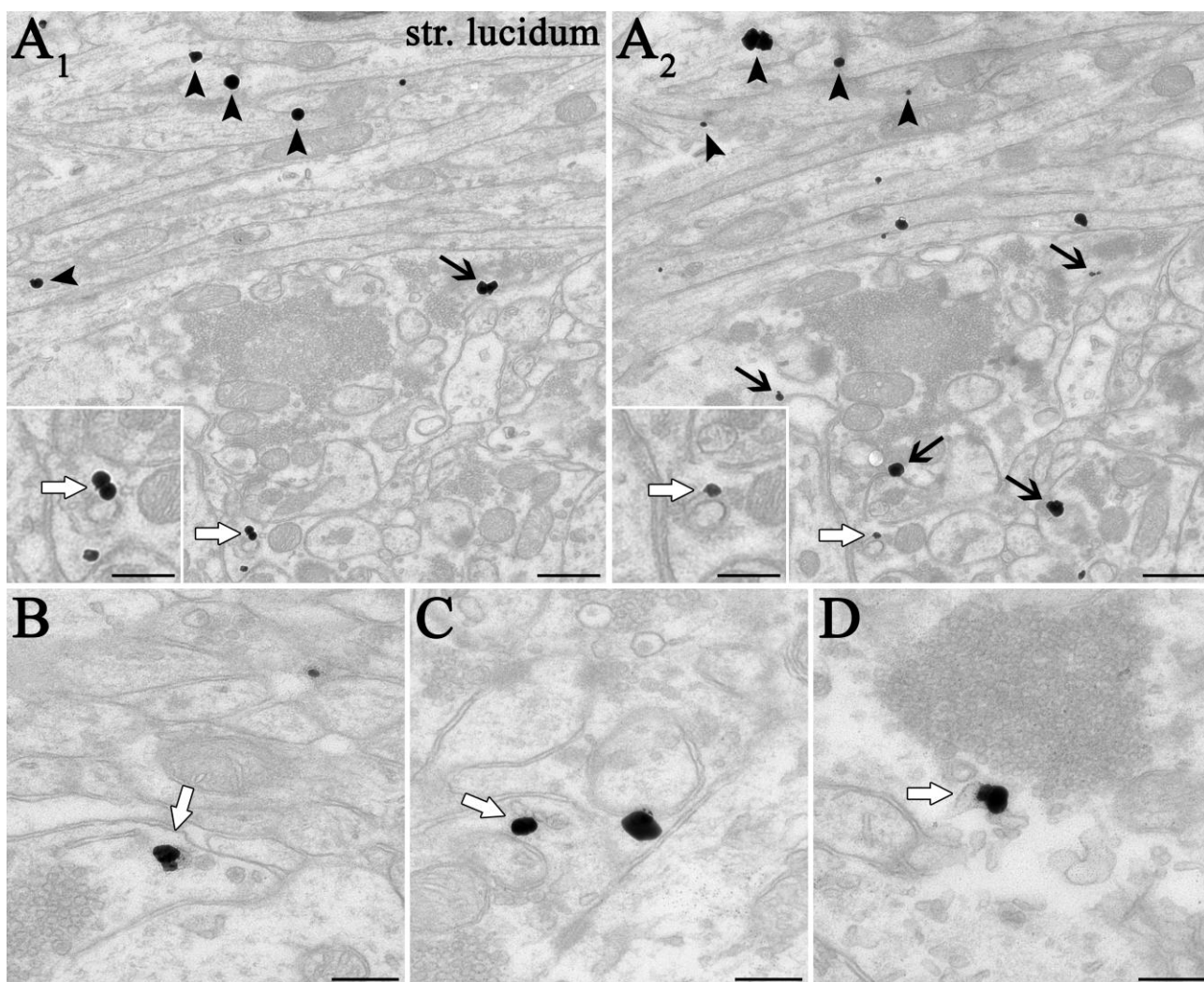
A TRPC6 csatornákat a gyrus dentatus szemcsesejtei a dendritek plazmamembránjában expresszálják. A1-2: Sorozatmetszetekről készült elektronmikroszkópos felvételeken látszik, hogy a stratum moleculare-ban a szemcsesejtek dendritjeinek és dendrittüskéinek plazmamembránjában lokalizálódnak a TRPC6 csatornákat jelző immunszemcsék (nyilak: dendritek; nyílhegyek: dendrittüskék). Az általunk használt antitest a TRPC6 fehérje intracelluláris epitópját ismeri fel, és látható, hogy a vártan megfelelően az aranszemcsék a plazmamembrán intracelluláris felszínéhez asszociálódnak. Ritkán az immunjelek intracellulárisan is megtalálhatóak (üres nyílhegy), ezek feltehetően éppen szállítódó TRPC6 csatornákat jelölnek. Skála: 0,5 μm . B: Immunszemcsék sűrűsége a különböző kompartmentumok membránjaiban. Az immunjelek előfordulásának gyakoriságát tekintve szignifikáns különbség mutatkozott a dendritek és sejttestek (jelölve: *, $p=0,02$), valamint a dendritek és tüskék (jelölve: **, $p=0,002$) plazmamembránjai között, viszont nem volt különbség a dendrittüskéket és sejttesteket illetően (n.s., nem szignifikáns, $p=0,41$).



4. ábra

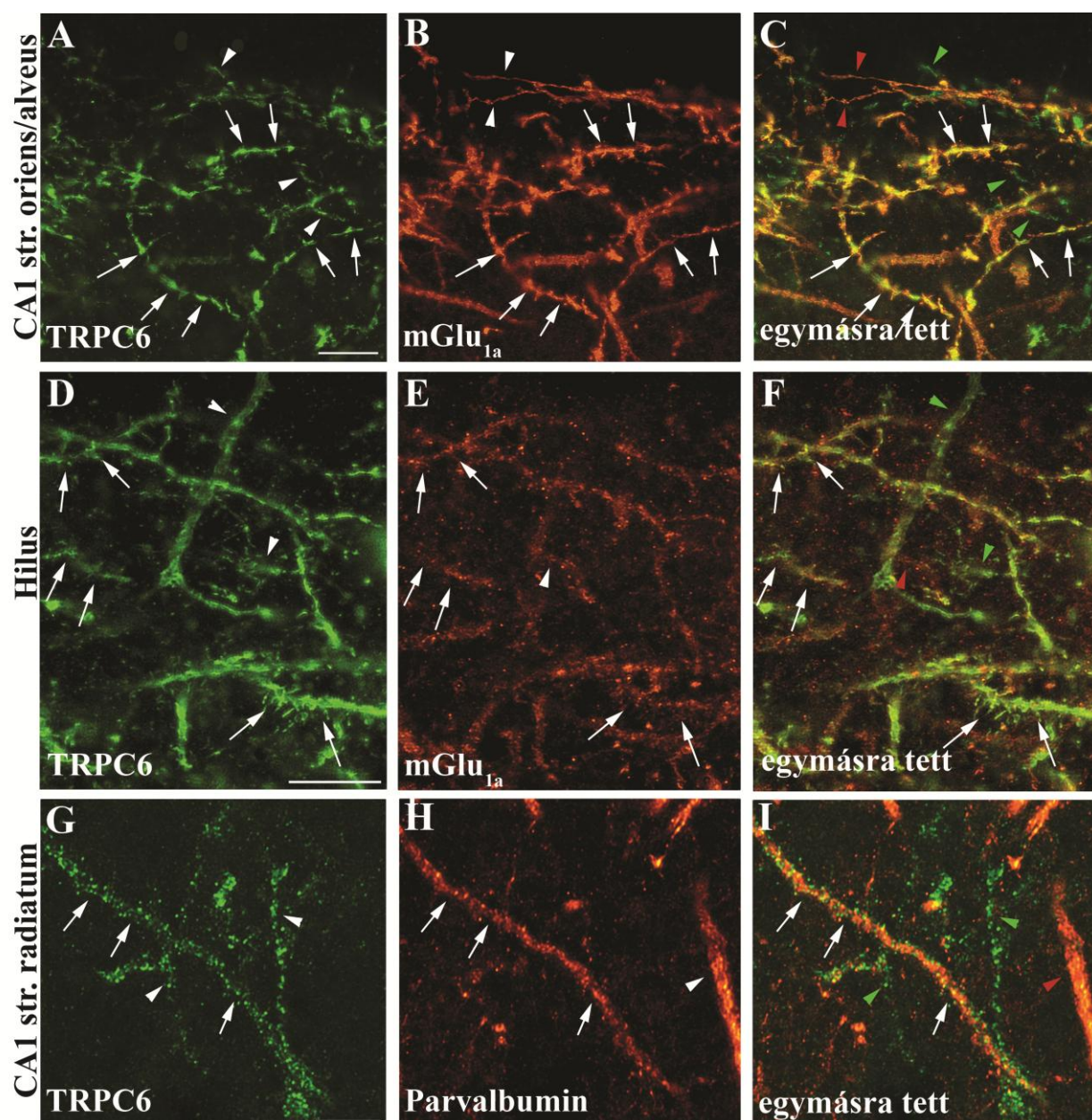
TRPC6 csatornák térbeli eloszlása szemcse sejtek dendrittüskéinek felszínén. A, B: Nagy felbontású beágyazás előtti immunarany technikát alkalmazva látszik, hogy a TRPC6 csatornák az

aszimmetrikus szinapszisokat kapó dendrittüskéken (nyílhegy) és a vékony dendriteken is megtalálhatóak (nyilak). C1-2: TRPC6 immunpozitív dendrittüskéről készült sorozatmetszet. Skála: 2 μ m. D: A TRPC6 csatornákat jelölő immunszemcsék szinapszistól való távolságának és a dendrittüskék félkerületének összefüggése. Az immunjelek kb. 15 %-a (szaggatott vonal jelzi) a szinapszisok szélén lokalizálódik, míg a jelek fennmaradó, nagyobbik része egyenletesen oszlik el a dendrittüskék felszínén. A felső oszlopdiagramon az immunjelek posztzinaptikus denzitáshoz viszonyított térbeli megoszlása látszik. A távolságot a szinaptikus réstől a plazmamembrán mentén mértük az immunjel közepéig, majd a kapott értékeket 60 nm-ként meghatározott csoportokba osztottuk. A bal oldali oszlopdiagramon a tüskefejek szinaptikus rés nélküli kerülete felének megoszlása van feltüntetve.



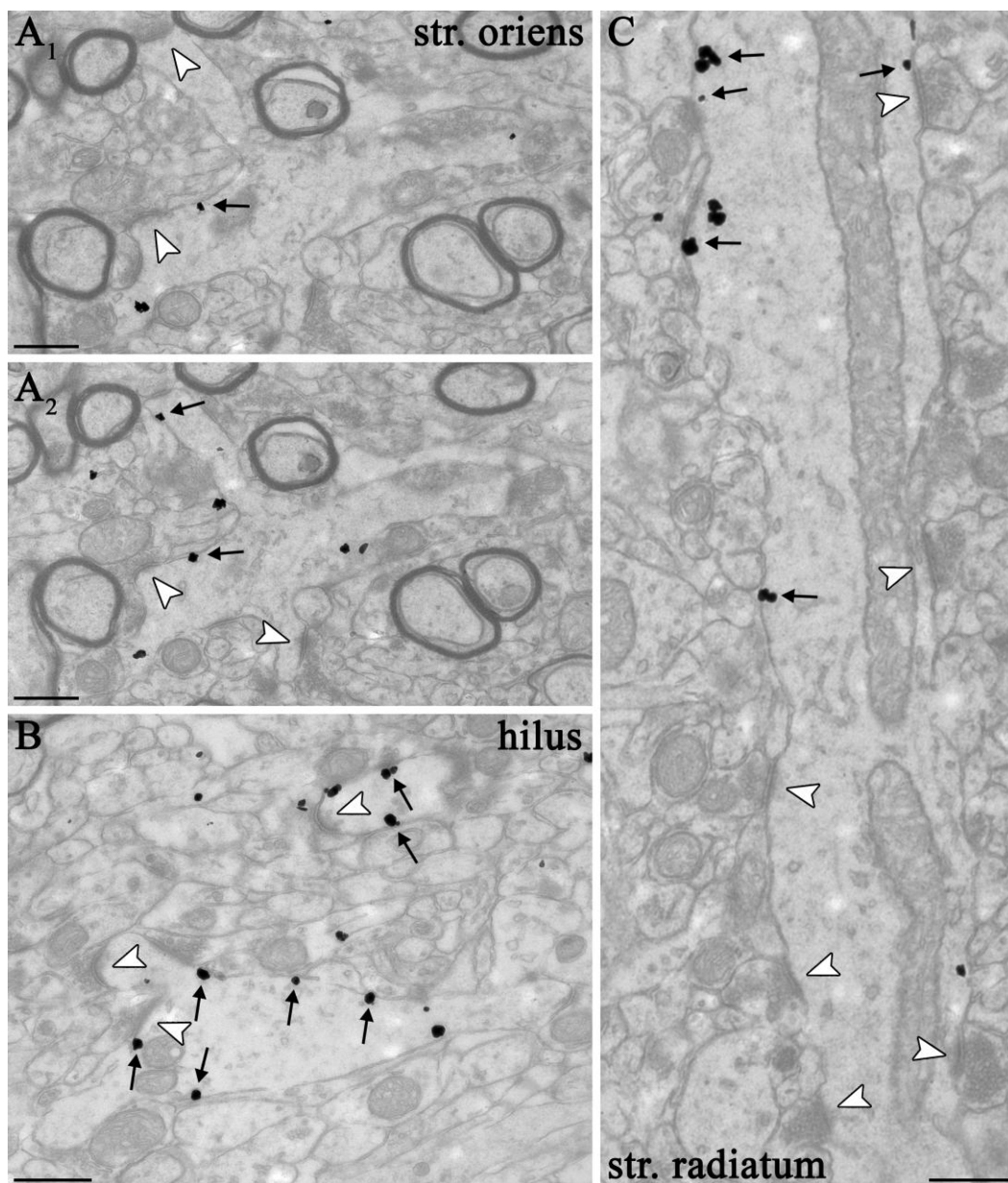
5. ábra

A gyrus dentatus szemcsesejteinek axonjaiban a TRPC6 csatornák gyakran intracellulárisan helyezkednek el. A1-2: A TRPC6 csatornákat jelölő immunszemcsék elsősorban a stratum lucidumban kötegekbe rendeződő en passant axonokban intracellulárisan fordulnak elő (nyílhegyek). A mohaterminálisokban a plazmamembránhoz és intracelluláris ciszternák membránjához asszociáltnak találjuk az immunjeleket (nyilak), amelyek azonban a vezikulum klaszterekben nem fordulnak elő. B, C, D: A nagy nagyítású képeken láthatóak a feltehetően intracelluláris membrán ciszternákhoz kapcsolódó immunszemcsék (üres nyilak). Skálák: A: 0,5 μm , betoldás: 0,25 μm ; B-D: 0,2 μm .



6. ábra

Az 1a típusú metabotrópos glutamát receptorokat expresszáló, valamint a parvalbumint tartalmazó interneuronokon egyaránt lokalizálódnak a TRPC6 csatornák. A kettős immunfestett metszetekről készült felvételeken látszik, hogy az stratum oriens-alveus határon és a hilusban található mGlu_{1a} immunpozitív dendritek többségén TRPC6 csatornák is lokalizálódnak (fehér nyilak). Hasonlóan a stratum radiatum-ban található parvalbumin immunreaktivitást mutató dendritek egy része is expresszálja a TRPC6 csatornákat (fehér nyilak). Az egymásra tett képeken azokat a profilokat, ahol a TRPC6 nem kolokalizál a parvalbuminnal vagy az mGlu_{1a}-val, megfelelő színű nyilak jelzik. Skálák: A, D: 10 µm; G, 5 µm.



7. ábra

Az interneuron dendritekben a TRPC6 csatornákat jelölő immunszemcsék a plazmamembránhoz kapcsolódtak. A1-2: A stratum oriens-ből származó sorozatmetszetekről készített elektronmikroszkópos felvételeken látható, hogy az immunjelek a horizontális lefutású, a tüskékre és dendritre is aszimmetrikus szinapszisokat (üres nyílhegyek) kapó interneuron dendritekben lokalizálódnak a TRPC6 csatornák jelenlétét bizonyító immunjelek (fekete nyilak). B: A hilusban a dendrittüskére és dendrittestre is aszimmetrikus szinapszisokat fogadó interneuron dendritben immunarany jelölés található. C: A stratum radiatum-ban található, aszimmetrikus szinapszisokkal borított dendritben, amely a parvalbumin tartalmú interneuronokra jellemző, szintén a plazmamembránhoz asszociált TRPC6 csatornák jelenlétét mutató immunjeleket látunk. Skála: 0,5 μm .

Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez:

Alulírott Nagy Attila Gergő a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül a:

- Minták újra átágyazását elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz
- Elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz alkalmas ultravékony metszetek készítését
- Elektronmikroszkópos felvételek elkészítését
- Elektronmikroszkópos felvételek kiértékelését

végeztem el.

aláírás

Budapest, 2012. 12. 28.

Az immunfestéseket és a fénymikroszkópos felvételeket Botond Gergő készítette.
A dolgozat megírásában témavezetőm, Dr. Hájos Norbert nyújtott segítséget.