

36. OTDK Biológia Szekció

**Metabotróp glutamát receptor aktiváció hatása a serkentő
szinaptikus jelátvitelre emberi és rágcsáló agykéregben**

Sandle Joanna Grace

Biológus BSc

3.évfolyam

Szegedi Tudományegyetem

Témavezetők:

Prof. Dr. Tamás Gábor,

Dr. Molnár Gábor

Tartalmi összefoglaló

Az agykéreg evolúcióját kísérő méret-, és komplexitásbeli növekedés megteremtette a strukturális és funkcionális alapjait a komplex gondolkodás és viselkedés kialakulásának. Ez az agyi expanzió gyakran történt a meglévő neuronális mikrohálózatokhoz újabb, azokhoz hasonló struktúrák hozzáadódásával. A közös őstinktől örökölt alapvető strukturális terv ellenére az eltérő környezeti és szelekciós nyomásokhoz való alkalmazkodás, génáramlás és a véletlen vezérelte genetikai sodródás a recens fajok között fundamentális és jelentős kognitív képesség-, és viselkedésbeli különbségek kialakulásához vezetett (DeFelipe, 2011).

Az idegrendszer egy meghatározó tulajdonsága, a plaszticitás, azaz az idegsejtek között lévő kapcsolatok képessége a dinamikus változásra. Az idegsejtek közötti, információ továbbításáért felelős struktúrák, a szinapszisok megerősödhetnek, illetve gyengülhetnek különböző időskálákon, összekötve egyes neuroncsoportokat vagy éppen megbontva azokat. Ezek a folyamatok, melyek többek között lefektetik a tanulás, felejtés és memória alapjait változatos formáikkal szétválasztják az egyes fajokat kognitív kapacitásuk alapján. A szinaptikus kapcsolatok erősségének modulációja szélesen tanulmányozott, azonban tudásunk döntő része modell-állatokra támaszkodik, azokon belül is elsősorban rágcsálókra. Felmerül a kérdés, hogy ezek a modell állatokban kapott eredmények mennyire megbízhatóan adnak magyarázatot a mi agyműködésünkkel kapcsolatban, illetve milyen mértékben értelmezhetőek és felhasználhatóak emberben. A rágcsálók és emberek közötti evolúciós szakadékot áthidalva mi kísérleteink során nem-patológiás humán agyszeletekben vizsgáltuk egy metabotróp receptor szinaptikus erősség moduláló hatását. Az összevethetőség érdekében a kísérleteket Wistar patkányok agykérgében is elvégeztük.

Az központi idegrendszerben megtalálható 1-es típusú metabotróp glutamát receptorok számos szignalizációs és szinaptikus plaszticitást kiváltó folyamatban játszanak szerepet. Így többek között részt vesznek az agykéreg tanulóssal és memóriával asszociált plaszticitásában. Továbbá ismert, és potenciális terápiás célpontok számos neurológiai megbetegedésben. Ennek ellenére emberi agykéregben kiváltott hatásukra fókuszáló kutatások száma kevés, ezért tűztük ki célul a serkentő szinapszisokban megtalálható mGlu receptorok aktivációjának vizsgálatát.

Kísérleteinkben szimultán teljes-sejt konfigurációs patch-clamp elvezetéseket végeztünk humán 2/3 rétegi pirams sejt és GABAerg interneuron szinaptikusan kapcsolt sejtpárokon, hogy megvizsgáljuk az 1-es típusú metabotróp glutamát receptorok (mGluR) agykérgi neuronhálózati aktivációra és szinaptikus serkentésre gyakorolt hatásait. Azt találtuk, hogy a szelektív 1-es típusú mGluR receptor agonista, (S)-3,5-dihydroxyphenylglycine (DHPG), a kiváltott poliszinaptikus események előfordulását képes volt

módosítani, továbbá a posztszinaptikus interneuron típusától függően befolyásolta a szinaptikus erősséget. A nem gyorsan-tüzelő, adaptáló tüzelésű interneuronokon főként depressziót figyeltünk meg a mGluR1/5 farmakológiai aktivációját követően, míg a gyorsan-tüzelő kosársejtek és axo-axonikus sejtekre érkező serkentő szinaptikus bemenetek elsősorban potencírozódást mutattak. A kísérleteket Wistar patkány szomatoszenzoros agykéregben megismételve DHPG mediált potencírozódást figyeltünk a glutamaterg szinaptikus transzmisszióban. Az eredményeink az 1-es típusú metabotróp glutamát receptor posztszinaptikus sejttypus függő hatását mutatja be a szinaptikus serkentés modulációjában emberi és rágcsáló neokortikális idegsejtekben.

Tartalomjegyzék

Tartalmi összefoglaló	3
Tartalomjegyzék	5
Bevezetés	6
Az agykéreg és evolúciója és felépítése	6
Interneuronok.....	8
Szinapszisok és plaszticitás	11
mGlu receptorok	13
Célok.....	15
Anyagok és módszerek	16
Túlélő agyszelet készítés	16
Elektrofiziológia	17
Hisztológia	18
3D rekonstrukció	18
Analízis és statisztika.....	19
Eredmények	20
mGluR aktiváció befolyásolhatja a diszinaptikus IPSC-k előfordulását humán agykéregben.....	20
mGluR aktiváció hatása azonosított sejttypusokon emberi agykéregben	21
mGluR aktiváció hatása gyorsan tüzelő interneuronokon rágcsló agykéregben	28
Disszkusszió	31
Irodalomjegyzék	34
Tételes szerzői hozzájárulás	37

Bevezetés

Az agykéreg és evolúciója és felépítése

Az agykéreg azon belül is a neokortex a központi idegrendszer legfiatalabb filogenetikai újítása, ami meghatározó szerepet játszik a szenzoros ingerek feldolgozásában, a komplex gondolkodás, memória illetve a motoros kimenetek kialakításában. E struktúra felépítése a viselkedés- és kognitív képességben lévő különbségek forrása az ember és más gerinces fajok között. Általános trendként a komplexitás és a diverzitás növekedését fedezhetjük fel az emlősökkel közös őstől legkorábban levált filogenetikai ág mai képviselőitől a homo sapiens sapienshez közelítve.

Különböző fajok neokortexét vizsgálva megfigyelhető egy általános szerveződés, mely alapján feloszthatjuk az agykérget funkcionálisan specializált területekre, mint például elsődleges szenzoros régiók, amelyek a vizuális, hallással és tapintással kapcsolatos ingerek feldolgozását végzik, asszociációs területek, amelyek szétterjedt projekcióikkal magasabb rendű idegi funkciókat látnak el, és motorosrégiókra, melyek a centrális és perifériás idegrendszer integrált ingereinek kimenetét adják a motoros működések tervezésével, kontrolljával és kivitelezésével. Ezek a homológ területek hasonló összekapcsoltsági mintákat mutatnak az agykéreg evolúciójának különböző lépcsőin az egyes projekciók kiinduló és célterületeiben, illetve a régiók hierarchikus rendeződésében (Krubitzer és Seelke, 2012). Azonban a közös ősből divergálódó fajok a rájuk ható eltérő szelekciós nyomások hatására és eltérő adaptációs stratégiáknak köszönhetően a neokortikális modifikációk széles választékára tettek szert. Mind az egész cortex, mind az egyes területeinek abszolút és relatív méretében számos változás történt. Az emberek rendelkeznek a legnagyobb aggyal a testtömegükhöz viszonyítva a szárazföldi állatok között. A főemlősöknél megjelenik az agy tekervényezettsége is, növelve a cortex felületét, továbbá megfigyelhető náluk a neokortex többi agyi struktúrához mérten egyenlőtlenül nagy megnövekedése, amihez elsősorban az asszociációs és prefontális régiók kiterjedése járult hozzá, különösen az emberekben. Az egyes régiók elhelyezkedésében, azok számában, méretében és kapcsoltságában számos módosulás jött léte, mint például a vizuális cortex redukciója a föld alatt vagy sötétben élő állatok esetében, illetve a halló és látókéreg megnövekedése a szaglókéreg területének csökkenésével párhuzamosan emberben (DeFelipe, 2011; Shepherd, 2004).

Egy további említése méltó strukturális szinapomorfia a megközelítőleg 200 millió éve megjelent hatrétegű neokortex (Northcutt és Kaas), melynek vastagsága meglepően állandó a fajok között, a szembetűnően nagy agy- testtömeg arányban tapasztalt szórás ellenére. Például a törpecickányok kortexe 0.4 mm, míg a náluk több ezerszer nagyobb aggyal rendelkező bálnák agykérge csak annak ötszöröse, 2 mm. Az egy egyeden belül megfigyelhető különböző agyrégióihoz tartozó cortex vastagságok különbségei hasonlóak a fajok között mérhető varianciával (DeFelipe, 2011).

A jól konzervált kortikális rétegezetségen belül is megannyi citoarchitektúrális apomorfia jelent meg. Megfigyelhető például, hogy emberből és rágcsálóból származó agykérgi metszeteket összehasonlítva, az intuitív megérzésnek ellentmondóan, a rágcsálókban sokkal sűrűben helyezkednek el a sejtek, azonban ezt mintegy ellensúlyozva, az egy sejtre érkező szinapszisok száma lényegesen magasabb az ember agykérgében (DeFelipe és mtsai., 2002). Egyes interneuronok és piramissejtek nagyobb szómájúak, a főemlősök kortexében, és hosszabb, több dendrittel rendelkeznek, továbbá az utóbbiakban dendrittüskék sűrűsége és felülete is megnövekedett a rágcsálókhoz képest, ami a sejtre érkező bemenetek hatékonyabb feldolgozását sugallja (DeFelipe, 2011, Ascoli 2008).

A strukturális változások mellett kompozícióbeli változásokat is végig követhetünk a neokortex evolúciójában. Ezek a változások eredhetnek egy adott sejtípus növekvő vagy csökkenő előfordulásából, vagy az adott típuson belül megváltozott expressziós, így molekuláris és celluláris tulajdonságaiból. Továbbá bizonyos neurontípusok reallokálódhatnak; megjelenhetnek, vagy éppen eltűnhetnek egyes agyi régiókból, illetve teljesen el is veszhetnek és új fajspecifikus idegsejtek is kialakulhatnak (Krienen és mtsai., 2020). Az utóbbira példa a humánspecifikus 1. rétegi csipkebogyó sejt, ami a kortikális piramisok disztális dendritjeire érkező bemenetek integrációjában tölt be fontos szerepet és a rágcsáló agykérgében nem fordul elő (Boldog és mtsai., 2018). Homológ sejtípusok a génexpresszióban bekövetkező változásokkal egy-egy fajra jellemző specifikus tulajdonságokat nyerhetnek. Transzkriptomikai vizsgálatokkal világítottak rá például, egy neurogliaform karakterisztikusságokkal rendelkező – egér hippocampusban felfedezett, borostyán sejtnek nevezett – interneuron elterjedtével válására a makákók, selyemmajmok és emberek kortexében, ahol több transzkriptomikai altípusra is szétváltak. Egy adott sejtípus gén expressziója időben és térben is eltérhet, azonban általánosságban elmondható, hogy a fejlettebb állatokban szélesebb a génexpressziós változatosság (Krienen és mtsai., 2020).

A serkentő és gátló neuronok aránya kritikus az egy agy által kivitelezhető operációk mennyisége és precízsege szempontjából, továbbá elengedhetetlen a fizioiógias, egészséges agyműködéshez. Az interneuronok aránya növekvő tendenciát mutat; a rágcsálók agykérgi neuronjainak mintegy 15-20%-át alkotják az interneuronok, ami a főemlősök és ember asszociációs régióiban 20-29%-ra emelkedik, egyes területeken akár a 34-44%-ot is elérve (DeFelipe, 2011; Džaja és mtsai., 2014; Krienen és mtsai., 2020).

Azonban mind a fizioiógias agyműködés megértésében mind a patológiás elváltozások feltérképezésében a legmeghatározóbb különbségek, a többek között a fent említett eltérésekből adódó funkcióbeli eltérések. Egy kiemelkedő különbség, hogy míg rágcsálókban egy kortikális piramissejtről interneuronra adott glutamáterg szinapszis csak küszöb alatti serkentést tud kiváltani a posztzinaptikus neuronon, addig az ember neokortexében egyetlen piramissejtről érkező egyedülálló akciós potenciál elegendő lehet küszöb feletti válasz kiváltásában egy azzal közvetlenül kapcsolatban lévő GABAerg

sejten, így komplex di- és poliszinaptikus eseményeket idézve elő (Molnár és mtsai., 2008), ami az információ megbízható és precíz propagációjában játszhat szerepet (Szegedi és mtsai., 2017; Woodruff és Yuste, 2008). A jelenség hátterében a nagyobb hatékonyságú serkentő szinaptikus transzmisszió áll, ami a preszinaptikus axonterminálisokban megtalálható nagyobb méretű aktív zónákon és az átlagosan négyszer nagyobb számú dokkolt vezikulákon keresztül valósul meg (Molnár és mtsai., 2016).

Egyre nő az ezeket a celluláris, szinaptikus és hálózati különbséget feltáró tanulmányok száma, azonban eddigi tudásunk az agy működéséről, és rengeteg napjainkban folyó kutatás is modell állatokban megfigyelt eredményekre támaszkodik. Egyértelműen kirajzolódik, hogy az emberi agy mechanizmusainak feltárásához elengedhetetlen a humán idegsejteknek, azok kapcsolatainak, hálózatainak tanulmányozása.

Interneuronok

Míg a neuronok döntő többségét kitevő serkentő sejtek az információ továbbításáért felelősek, addig a kisebbségben lévő, de fiziológiailag és morfológiailag diverzebb interneuronok az idegrendszeri hálózatok időben és térben precíz és hatékony működést teszik lehetővé. Az interneuronok mind projekciós mind lokális piramis sejtek axon kollaterálisairól kapnak serkentő bemenetet és *feedforward* és *feedback* gátlás operációkkal járulnak hozzá a kortikális neuronhálózatok finomhangolásához (Bartos és mtsai., 2011).

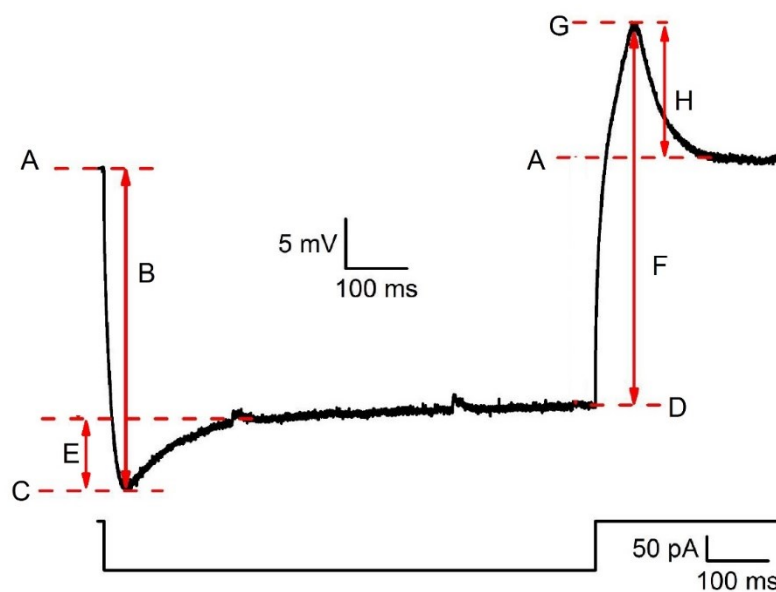
A különböző sejtípusok esszenciális és alapvető építőelemei az idegrendszernek, azonban a csoportosításuk gyakran ütközik problémákba, különösen a rágszálóknál jelentősen diverzebb humán interneuron populáció esetében. Egy evolúciós megközelítés szerint egy csoportba sorolhatjuk azokat a sejteket melyek együtt változtak az evolúció során (Arendt és mtsai., 2016) és így hasonló morfológiai, elektrofiziológiai és transzkriptomikai tulajdonságokra tettek szert. Ennek a három paraméternek az együttes vizsgálata teszi lehetővé az idegsejtek legmegbízhatóbb besorolását (Gouwens és mtsai., 2020).

A neuronok legkorábban megfigyelhető tulajdonsága azok morfológiája volt. Számos sejt leírását köszönhetjük Ramón y Cajal munkásságának a 19 sz. végén, aki ezüst impregnáció segítségével vizsgálta az emberi agyat alkotó idegsejteket (Cajal 1899). Az interneuronok rendkívüli változatosságot mutató szoma, dendrit és axon morfológiájából, az axonjaik elhelyezkedése meghatározó a serkentő bemenetek integrációjában és modulációjában, lehetővé téve azok kompartment specifikus gátlását a célsejtjeikben (Bartos és mtsai., 2011), sokat elárulva a sejt hálózatban betöltött szerepéről is. Ez alapján az interneuronok anatómiaiailag jól karakterizálhatóak annak függvényében, hogy posztzinaptikus partnereik mely szubcelluláris alegységét célozzák. Például az axo-axonikus sejt, a piramis sejtek axon iniciális szegmentjére adva bemenetet, az axon eltérő ioncsatorna expressziójából és nyugalmi membránpotenciáljából kifolyólag egyedi módon képes depolarizációt is kiváltani a posztzinaptikus

neuronon (Szabadics, 2006). A kosársejtek axonjaikkal a piramissejtek szómáját körbe ölelve a periszomatikus gátlásért felelősek és a posztszinaptikus sejt aktivitására gyakorolnak hatást. Tehát az egyes interneuronokra jellemző morfológia nem csak azok beazonosításában és besorolásában segít, hanem a neuron funkcionális feladataikkal kapcsolatban is informatív.

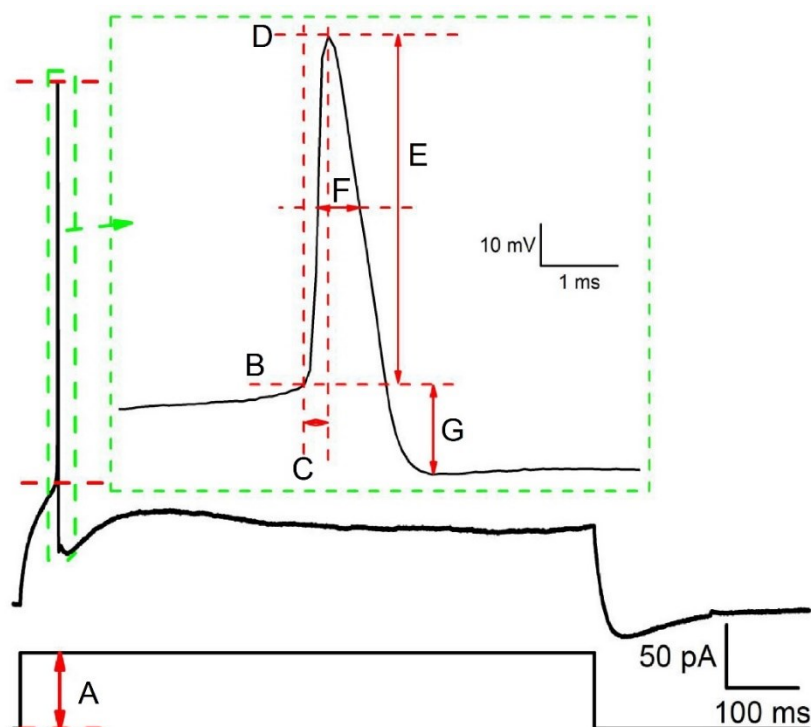
Az idegsejtekben lejátszódó, ion-koncentráció gradiens vezérelte elektromos jelenségek felismerésével és az ezeknek a mérését lehetővé tevő patch-clamp technika elterjedésével lehetővé vált a sejtek membránjának passzív és aktív biofizikai tulajdonságainak mérése. Az egyes neuron csoportok eltérő ioncsatorna kompozíciói egyedi elektrofiziológiai jellemzőket eredményeznek, melyek szintén egyfajta csoportosítást tesznek lehetővé.

Passzív tulajdonságok a membrán azon tulajdonságai, amik nyugalmi állapotban, illetve küszöb alatti ingerlés hatására mérhetőek (1. ábra). Ilyen például a membrán időállandója (Tau), ami a hiperpolarizáló áramlépcsővel kiváltott feszültségválasz kezdetétől, annak amplitúdójának 63%-ának eléréséig eltelt idő [ms], vagy a sag amplitúdó, ami hiperpolarizáció aktiválta depolarizáló kationáram mediálta feszültségváltozás (Ascoli és mtsai., 2008).



1. ábra: Passzív elektrofiziológiai paraméterek áram-zár konfigurációban hiperpolarizáló áramlépcső hatására. A, nyugalmi membránpotenciál vagy konstans tartó árammal fenntartott membrán potenciál, [mV] B, a hiperpolarizáló áram lépcsővel kiváltott feszültségváltozás amplitúdója (A és C különbsége), [mV] C, B minimum értéke, [mV] D, egyensúlyi állapot (steady-state), [mV] E, sag amplitúdó, D és C különbsége [mV] F, a hiperpolarizáció kikapcsolásával kiváltott feszültségváltozás amplitúdója G, F maximum értéke, [mV] H, rebound amplitúdó, G és A különbségének abszolútértéke

Az egyes neuronokat a spontán tüzelésük, illetve stimuláció hatására kiváltott akciós potenciáljaik kinetikájával is jellemezhetünk, ezeket a paramétereket nevezzük aktív tulajdonságoknak (2. ábra). Ilyen például az AP amplitúdója, félszélessége, frekvenciája illetve a frekvenciának az adaptációja (Ascoli és mtsai., 2008). A kísérleteink során mi is áramlépcső stimulussal kiváltott tüzelési mintázataik alapján azonosítottuk az elvezetett ideg sejteket. Gyorsan tüzelő interneuronok nevezzük azokat a neuronokat, melyek a beinjektált áramlépcső hatására magas frekvencián képesek akciós potenciálokat generálni, akár 450 Hz-el az asszociációs kortextben (Wang és mtsai., 2016), közülük tartoznak a kosársejtek és az axo-axonikus sejtek. A neurogliaform sejtekre jellemző a késői tüzelés, mely nem akkomodál és az akciós potenciálokat jellegzetes utóhiperpolarizáció követi. Egy adaptálódó frekvenciájú sejt típusra példa a Martinotti sejt, mely esetében az áramimpulzus kezdetén egy magasabb frekvenciájú burst-aktivitást is megfigyelhetünk. A különböző elektrofiziológiai csoportokhoz tartozó neuronokra érkező és általuk adott szinapszisok is eltérő kinetikájúak lehetnek és a preszinaptikus sejtjeik aktivitására, neurotranszmitterek és neuromodulátorok jelenlétére is eltérően modulálódnak, diverz és dinamikus hálózati operációkat képezve.



2. ábra: Aktív elektrofiziológiai paraméterek áram-zár konfigurációban depolarizáló áramlépcső hatására. A, reobázikus áram: az minimális áram mennyiség, ami már képes akciós potenciált kialakítani, [pA] B, küszöbpotenciál: az idegsejt membránjának kritikus feszültség értéke, melynél nagyobb depolarizáció akciós potenciál kialakulásához vezet, [mV] C, Onset idő: a küszöbpotenciál elérésének időpontja D, AP csúcs: az akciós potenciál maximális feszültségértéke, [mV] E, AP

*amplitúdó: a küszöbpotenciál és AP csúcs feszültségének különbsége F , akciós potenciál felszállása: az akciós potenciál felszálló és leszálló ága között eltelt idő az AP amplitúdójának felénél mérve, [ms]
 G , utóhiperpolarizáció (AHP): az akciós potenciál repolarizációs fázisának túllövése, amikor membránpotenciál átmenetileg a nyugalmi membránpotenciál alá süllyed, [mV]*

A szekvenáló technikák fejlődésével, azon belül is az egy-sejt RNS szekvenáló technológiával egy új fejezetet nyílt az idegsejtek csoportosításában. A módszer segítségével lehetővé vált egy sejt teljes molekuláris profiljának a meghatározása (Boldog és mtsai., 2018; Gouwens és mtsai., 2020). Az interneuronok működésének megértésében fontos molekulák; mint a transzkripciós faktorok, neurotranszmitterek, enzimek, receptorok, neuropeptidok, Ca^{2+} kötő fehérjék, strukturális proteinek, ion csatornák vagy membrán transzporterek eloszlásának vizsgálatával az egyes interneuron csoportok közötti különbségekről is egy új, több dimenziós képet kaphatunk. Az interneuronok génexpressziója alapján azokat nagyobb nem átfedő csoportokba lehet sorolni, ebből a két legelterjedtebb a parvalbumin pozitív (PV+) és szomatostatin pozitív (SST+) neuronok melyek a kortikális gátló sejtek közel 70%-át teszik ki. A maradék 30%-ot a vazóaktív intestinalis peptidet (VIP+), a kalretinint (CR+) és a reelin-t expresszáló neuronok teszik ki (Takada és mtsai., 2014).

A transzkriptomikai hasonlóságok szoros összefüggést mutattak az egyéb modalitásokban lévő hasonlóságokkal, például a PV+ sejtek a gyorsan tüzelő, anatómia alapján kosár és axo-axonikus sejt-ként azonosított neuronokkal vannak átfedésben (Gouwens és mtsai., 2020). Az interneuronok rendszerezése azonban nem egyszerű feladat. Az egyes sejtek morfológiai, elektrofiziológiai és transzkriptomikai paraméterei diszkrét és folytonos értékeket is felvehetnek, a különböző csoportok egyes tulajdonságai között átfedések lehetnek. Különös kihívást okoz az emberi agy neuronjainak rendkívüli diverzitása. (Ascoli és mtsai., 2008).

Szinapszisok és plaszticitás

Az idegrendszer felépítésének alapegységei a neuronok. A dendritok az idegsejt bemeneti egységei, ezek felelősek a rá érkező jelek begyűjtéséért. A neuron szómájában történik az integráció, a gátló és serkentő potenciálok időben és térben való szummálódása, majd az axon iniciális szegmentumon eldől, hogy keletkezik-e tovaterjedő akciós potenciál. Az axon pedig, mint kimeneti alegység, tovább juttatja a célsejtekhez a szóma és dendritok által integrált információt. Ha neuronokat tekintjük az idegrendszer strukturális építőköveinek, a szinapszisokat értelmezhetjük, mint annak az alapvető funkcionális egységei.

A szinapszisok képezik azokat a fundamentális funkcionális és strukturális kapcsolódási egységeket, melyek lehetővé teszik az idegsejtek közötti jeltovábbítást. Ezeknek az interakcióknak a komplex

láncolata alkotja az agyi neuronhálózatokat, melyek létrehozzák és szabályozzák a funkcionális műveleteket. A fogalom tágabb értelmezésében szinapszissnak nevezünk minden kontaktot a neuronok között, melyen keresztül transzmisszió történik. A szűkebb, strukturális definíció szerint a szinapszis egy egyedülálló, specializált kontakt, aminek van pre- és posztszinaptikus elektrondenzitása és specializált jelátvitelt megvalósító struktúrái.

A szinapszisok a jelátvitel módját tekintve két csoportra oszthatóak; elektromos és kémiai szinapszisokra. A dolgozatom témája a kémiai szinapszisokkal foglalkozik, azon belül is egy metabotróp glutamát receptor hatására a szinapszisok erősségében, így a továbbiakban ezekre szeretnék részletesebben kitérni. A kémiai szinapszist felfoghatjuk mint jelátalakítót, mely egy elektromos jelet, a preszinaptikus sejt AP-ja, átalakít kémiai jellé, ezek a neurotranszmitterek, majd visszakonvertálja elektromos jellé, amit, mint a posztszinaptikus sejt áram válaszai mérhetünk. A legtöbb kémia szinapszis egy preszinaptikus és egy posztszinaptikus sejt egymással szemben álló membránjából és a köztük lévő részből áll. A szinapszisok rendelkeznek egy irányultsággal is, amit a membránon lévő vagy azzal asszociált fehérjék határoznak meg. A preszinaptikus denzitást kialakító fehérjék a neurotranszmitterek és egyéb jelmolekulák felszabadítását teszik lehetővé, míg a posztszinaptikus denzitás ezeknek a fogadására specializált molekulákból épül fel. A pre- és posztszinaptikus sejt azonban relatív fogalom, csak egy szinapszis kontextusában értelmezhető, lévén, hogy egy idegsejt szinapszisok ezreit képezi és fogadja.

Működésének első lépése a preszinaptikus sejt axonján végighaladó akciós potenciál, ami a membrán depolarizációjával nyitja a szinapszis környékén lévő feszültség függő Ca^{2+} csatornákat. Ez a Ca^{2+} influx a citoplazmában lévő vezikulumok membránjába integrált Ca^{2+} érzékeny molekulák aktiválásához vezet, amelyek segítségével a neurotranszmittert tartalmazó vezikulák dokkolódnak, majd fuzionálnak a membránnal felszabadítva tartalmukat. Ezek a molekulák a szinaptikus résben diffúzióval jutnak el a posztszinaptikus sejten lévő receptoraikhoz, amikhez kötődve direkt vagy indirekt módon az ioncsatornákra hatva változást hoznak létre a posztszinaptikus sejt membránpotenciáljában, depolarizálva vagy hiperpolarizálva azt.

Egy szinapszis erőssége alatt a preszinaptikus sejt által kiváltott, posztszinaptikus áram vagy feszültség válasz relatív amplitúdóját értjük. A szinaptikus kapcsolat erőssége időben nem állandó, modulálható, a neuronok aktivitásától függően, pre- és posztszinaptikus mechanizmusok gyengíthetik, illetve megerősíthetik azokat. Ezeket a folyamatokat nevezzük szinaptikus plaszticitásnak. Az individuális neuronok az egyedfejlődés során szert tesznek anatómiai és elektrofiziológiai tulajdonságaik egy jelentős részére, azonban a környezet kihívásaira reagálva folyamatos alkalmazkodásra van lehetőség a szinaptikus hatékonyság és erősség rugalmas modulálásával (Atwood és Karunanithi, 2002). Két neuron közötti szinaptikus kapcsolat erősségét meghatározó modell a kvantális modell, mely szerint a pre- és

posztszinaptikus sejt közötti kommunikáció hatékonysága függ a funkcionális felszabadulási helyek számától (N), az itt történő neurotranszmitter felszabadulás valószínűségétől (P), és az egy szinaptikus vezikulumból felszabaduló neurotranszmitter mennyiségétől, amit kvantumnak nevezünk (q) (Brock és mtsai., 2020; Korn és Faber, 1991).

A szinaptikus plaszticitásnak két legfontosabb paramétere a szinaptikus erősségben történő változás iránya, erősödés esetében potencírozódásról vagy facilitációról, gyengülés során szinaptikus depresszióról beszélünk. E változás hossza, tartóssága, ami alapján a folyamatokat rövid- és hosszú ideig tartó plaszticitásra osztjuk. A két plaszticitásnak nincsen élesen megszabott időablaka, azonban általában milliszekundumoktól az 1-2 percig tartó változásokat rövid, míg az órákig, napokig, évekig fennmaradó depressziót vagy potencírozódást a hosszan tartó plaszticitásokhoz soroljuk.

A rövid idejű, *short term* (ST) plaszticitás direkt és azonnali hatással van a neuronhálózat aktivitására, mivel dinamikája egy időskálára esik a stimulusok érkezésével, így folyamatos és precíz szabályozást megvalósítva. Hátterében számos, legtöbbször preszinaptikus eredetű mechanizmus állhat. Depressziót okozhat, a vezikula kimerülés, amikor is a vezikulák neurotranszmitterrel való feltöltésénél gyorsabban történik azok exocitózisa. A facilitációnak egy lehetséges háttérmechanizmusa a reziduális Ca^{2+} akkumulációja a preszinaptikus terminálban, ami a vezikulák emelkedett felszabadulási valószínűségéhez vezet. Ezek a változások reverzibilisek, idővel a kapcsolat erőssége magától, homeosztatikus folyamatok révén visszaáll a kiindulási értékére (Hennig, 2013).

A hosszan tartó, *long term* (LT) plaszticitási formák kritikus szerepet játszanak az egyed fejlődés során az agyi mintázatok kialakításában és elengedhetetlenek a tanulás és memória folyamataiban. Az ST plaszticitással szemben sokkal tartósabb és ellenállóbb, gyakran jár a transzkripció megváltozásával vagy akár a sejt anatómiájának módosulásával. A morfológiai módosulások magukba foglalják a megnövekedett aktív zónát, posztszinaptikus denzitást, növekedést a preszinaptikus sejt által a posztszinaptikus neuronra adott szinapszisok számában. Továbbá farmakológiai vizsgálatok egyre több receptor és az általuk indukált hozzájuk kapcsolt folyamatok szerepét tárják fel az egyes hosszan tartó plaszticitás indukciójában és fenntartásával, mint például NMDA, AMPA ionotróp és különböző metabotróp receptorok (Kullmann és Lamsa, 2011a).

mGlu receptorok

A központi idegrendszer fő serkentő neurotranszmittere a glutamát, egy nem esszenciális aminosav. Hatását ionotróp és metabotróp receptorokat aktiválva is ki tudja fejteni. Az ionotróp receptorok ligandvezérelt ioncsatornák, melyek ligandjukat kötve konformációs változáson mennek keresztül és kinyílnak, átjárást biztosítva egyes ionoknak a koncentráció gradiensük csökkentésének irányába. A

metabotróp receptorokhoz ezzel szemben közvetetten, metabolikus reakciók láncolatával- G fehérjéken és citoplazmális másodlagos hírvivőkön, keresztül fejtik ki hatásukat (Ferraguti és Shigemoto, 2006).

A felosztásuk ligandjaik alapján történik. A metabotróp glutamát receptorok (mGluR) aktivációjukkal képesek módosítani a szinapszisok erősséget, ezáltal létrehozva különböző rövid és hosszan tartó plaszticitást és befolyásolni az általuk irányított fiziológiás és patológias folyamatokat. A nyolc ismert mGlu receptort (mGluR1-8) három alcsoportra lehet tovább bontani aminosavszekvenciájuk homológiája, farmakológiai tulajdonságaik és szignál transzdukciójuk alapján. Az I-es típusú receptorokhoz tartozik az mGluR1 és mGluR5. A II-es típusú mGluR-okat a mGluR2 és mGluR3 receptorok alkotják, míg III-as típusú mGluR-ok amGluR4, mGluR6, mGluR7, és mGluR8 (Crupi és mtsai., 2019).

A leginkább tanulmányozott és egyben dolgozatom témáját adó receptorok 1-es típusú mGluR-ok. Ezek a receptorok a serkentő szinapszisok posztszinaptikus denzitásának perifériáján helyezkednek el és $G_{\alpha q/11}$ heterotrimer G fehérjéhez kapcsolódnak. Tipikusan a sejtek intenzív tüzelése során indítanak el foszfolipáz C (PLC) és inozitol (IP3) és diacilglicerol (DAG) függő folyamatokat. Elsősorban glutamáterg szinapszisokban való tartós depressziót (*Long Term Depression*, LTD) kiváltó hatásuk ismert (Fitzjohn és mtsai., 1999), mely agyrégiótól és posztszinaptikus sejtípustól függően eltérő mechanizmusú lehet (Lüscher és Huber, 2010).

Két alosztálya, az mGluR1 és mGluR5, az agy nagy részén eltérően expresszálódnak, és a szinapszisok modulációjában is eltérő módon vehetnek részt (Ferraguti és Shigemoto, 2006; Mannaioni és mtsai., 2001). Az mGluR1 magasan expresszált például a szaglógumó mitrális sejtjeiben és a kisagy Purkinje sejtjeiben, míg az mGluR5-ok jellemzőek a nagyagykéregben és a hippocampusban, de a két receptor altípus együtt az agy nagy részét lefedi.

Az 1-es típusú mGluR-ok szignalizációs és plaszticitási folyamatok széles skáláját mediálják az agyban és mint potenciális terápiás célpontjai egyes neuropszichiátriai és fejlődésneurológiai megbetegedéseknek, egyre nagyobb jelentőséggel bírnak (Crupi és mtsai., 2019; Lüscher és Huber, 2010). Azonban ezeknek a receptoroknak a működési mechanizmusáról szerzett tudásunk szinte kizárólagosan rágcslókból származik. Ezért a munkákban szeretnénk ezeknek az mGluR receptoroknak az ember agykérgi hálózataiban betöltött szerepéről nagyobb felbontású képet kapni.

Célok

Célom volt az I-es típusú mGlu receptorok szerepének vizsgálata az emberi agykéreg kiváltott neuronhálózati aktivitásában, di- és poliszinaptikus események előfordulásában, és szinaptikusan kapcsolt kortikális 2/3-ik rétegi piramis sejtről azonosított interneuronra érkező serkentő szinapszisokon.

Illetve megvizsgálni, hogy amennyiben találunk szinaptikus erősség moduláló hatást az függ-e a posztszinaptikus sejt típusától.

További célom volt rágcsló agykérgi, szinaptikusan kapcsolt kortikális 2/3-ik rétegi piramis sejtről azonosított interneuronra érkező serkentő szinapszisok mGluR aktivációval kiváltott modulációjának vizsgálata, illetve az emberben és rágcslóban kapott eredmények összevetése.

Anyagok és módszerek

Túlélő agyszelet készítés

Minden kísérlet a Helsinki Nyilatkozatnak megfelelően és a Szegedi Tudományegyetem Etikai Bizottságának engedélyével történt. A humán minták nem-patológias agykérgi biopsziákból származtak, melyek eltávolítására mélyagyi tumorok, epilepszia, hidrocephalia kezelése érdekében volt szükség. A szövetminták, azok kísérletes felhasználását műtét előtt írásban engedélyező páciensekből származtak. A humán minták (n=36) 4-től 73 éves férfi és női páciensek frontális, temporális, parietális és occipitális lebenyéből lettek eltávolítva. A rágsáló agykéreg vizsgálatához 18-30 napos Wistar patkányokat áldoztunk fel (n=24). Hím és nőstény egyedeket egyaránt használtunk, minthogy a humán minták is mindkét nemből származtak.

A humán minták esetében; műtéti eltávolítást követően a szövetminták mesterséges agy-gerincvelői folyadékban, ACSF-ben (*artificial cerebro spinal fluid*) voltak szállítva 95% O₂ és 5% CO₂-vel telítve. Az ACSF összetétele mM-ban: 85 NaCl, 2,5 KCl, 1,25 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 0,5 CaCl₂, 4 MgSO₄, 25 d(+)-glükóz, 75 szacharóz. A szövetblokkból, azt egy mágnes korongra felragasztva, Microm HM 650 V vibráló pengéjű mikrotóm segítségével a kortikális rétegekre merőlegesen 320 µm vastag szeleteket készítettünk. A szeletek 36 °C-n inkubálódtak fél órát ACSF-ben majd ezt az oldatot fokozatosan lecseréltünk egy az elvezetésekhez használt oldathoz hasonló (130 NaCl, 3,5 KCl, 1 NaH₂PO₄, 24 NaHCO₃, 3 CaCl₂, 1,5 MgSO₄, 10 d(+)-glükóz), de alacsonyabb Ca²⁺ tartalmú ACSF-re (1 CaCl₂, 3 MgSO₄, 10 d(+)-glükóz) és ebben tároltuk az agyszeleteket 17 °C -n a felhasználásig (<18 óra) folyamatos 5% O₂ és 95% CO₂ buborékoltatása mellett. Az alacsony Ca²⁺ szint a Ca²⁺ által indukált exocitotoxicitás, és a sejtek túlaktiválásának kivédését szolgálja az alacsonyabb hőmérséklettel együtt, melynek köszönhetően az idegsejtek és a kapcsolataik alkotta mikrohálózatok még órákon keresztül vizsgálhatóak. A kísérletekhez az inkubáló kamrából mérő kamrába helyezett szeleteken 36°C-os oxigenáltatott mesterséges agy-gerincvelői folyadékot áramoltatunk folyamatosan 2-3 ml/perc sebességgel (Soukup és mtsai., 2002).

Az állatokat először halotánnal (2-bromo-2-kloro-1,1,1-trifluoetán) altattuk, majd dekapitáltuk. A kipreparált agy szomatoszenzoros kortexből 320 µm vastag koronális agyszeletek készítettünk Microm HM 650 V segítségével. A rágsáló agyszeleteket innentől kezdve a humán mintákkal egyező módon inkubáltuk és használtuk fel, azzal a különbséggel, hogy a patkányból származó agyszeletek a humán mintáknál rövidebb ideig voltak kísérletezésre alkalmas állapotban tarthatóak (6-8 óra).

Elektrofiziológia

Az agyszeleteket és a bennük lévő sejteket differenciál-interferencia kontraszt videomikroszkóppal (DIC) és víz immerziós 40x objektívvel vizualizáltuk. A potenciálisan egymással szinaptikusan kapcsolt piramissejteket és interneuronokat a DIC kamerán keresztül megfigyelhető szómájuk alapján választottunk ki a 2/3-ik rétegben. A szimultán patch clamp elvezetésekhez Luigs & Neumann Infranpatch manipulátor rendszert használtunk és DMZ-Universal Puller-el üreges üveg filamentumokból húzott 3.5–5 M Ω -os ellenállású üveg mikropipettákkal alakítottunk ki teljes sejt (*whole cell patch clamp*) konfigurációt. Az elvezetésekhez két csatornás HEKA EPC10 erősítőt használtunk 100kHz mintavételi frekvenciával. A mikropipettákat kétféle intracelluláris oldattal töltöttük; a preszinaptikus piramisból elvezető mikropipetta hegyébe normál intracelluláris oldatot, NIC-et (*normal intracellular solution*) tettünk, melynek összetétele mM-ban: 126 K-glükonát, 4 KCl, 4 ATP-Mg, 0.3 GTP-Na₂, 10 HEPES, 10 foszfo-kreatin, és 8 biocytin (pH 7.20; 300 mOsm), majd erre glutaminsav tartalmú intracelluláris oldatot rétegeztünk rá, aminek az összetétele mM-ban: 116 K-glükonát, 10 L-glutaminsav, 4 KCl, 4 ATP-Mg, 0.3 GTP-Na₂, 10 HEPES, 10 foszfo-kreatin, and 8 biocytin (pH 7.20; 300 mOsm). A hozzáadott glutaminsav azt a célt szolgálja, hogy a kísérleti protokoll alatti sokszori stimuláció, és az intracelluláris tér, ebben a konfigurációban előforduló kihígulása során ne csökkenjen a sejt glutaminsav tartalma (Molnár és mtsai., 2016). A szövetbe hatoláskor a pipettára enyhe pozitív nyomást adunk, annak eltömődésének kivédésére, ennek hatására abból kis mennyiségű oldat távozik az extracelluláris térbe, így a környező sejtek glutamáttal való serkentésének elkerülésének érdekében tettünk NIC-t a pipetta hegyébe. Az intracelluláris oldatokba tett biocytin a későbbi anatómiai rekonstrukcióhoz szükséges. A mérések során a soros ellenállást (Rs), azaz azoknak az ellenállásoknak összegét, amik nem a sejt biofizikai tulajdonságaiból eredtek, végig monitoroztuk,.

A teljes sejt konfiguráció kialakítása után a sejteket *current-clamp*, azaz áram-zár módban (CC), azaz növekvő beinjektált áramlépcső stimulus hatására mutatott tüzelési mintázatuk alapján azonosítottuk. A sikeres tüzelési minta felvételt követően páros pulzus protokoll (PPP) segítségével teszteltük, a két megszárt sejt szinaptikus kapcsoltságát. A CC-ben tartott preszinaptikus piramissejtben két akciós potenciált (AP) váltottunk ki, 3-8 ms hosszúságú 800 pA-es árapulzus injektáltálásával egymástól 60ms-ra, majd egy -10pA hiperpolarizáló lépcsőt az Rs ellenőrzésének céljából. Mindeközben figyeltük a *voltage-clamp*, azaz feszültség-zár módban (VC) -60mV tartópotenciálon posztszinaptikus interneuronok a preszinaptikus sejt tüzelése által kiváltott serkentő posztszinaptikus áramok (EPSC) megjelenését. Kapcsolat detektálása esetén 10 másodperces intervallumokban ismételtük a páros pulzus protokollt folyamatosan monitorozva az interneuron áramválaszait. A PPP plaszticitás szempontjából semleges stimulus a szinaptikus erősségben nem okoz változást.

A teljes sejt elvezetés stabil elektromos hozzáférést ad a mért sejthez, azonban képes kihígítani a sejt intracelluláris terét, így potenciálisan az ott található transzkripciós faktorokat, hírvivő molekulákat és egyéb, az mGluR receptorok által indukált hatást közvetítő molekulákat. Ennek elkerüléseért az interneuron membránjának beszakítását követően 5 percen belül applikáltuk az mGluR1/5 agonistát (DHPG 50 μ M) a folyamatosan áramoltatott mérő ACSF-be. Előzetes kísérleteinkben azt találtuk, hogy hosszabb kontroll periódus után már nem sikerült változásokat indukálni a szinaptikus erősségben az mGluR-ok aktiválásával.

Annak vizsgálatához, hogy mGluR1/5 agonista jelenléte szükséges-e az általa kiváltott hatás fenntartásához kétféle kimosást alkalmaztunk; a kísérletek egy részében a DHPG-t tartalmazó ACSF-et lecseréltük az eredeti mérő oldatra, míg a második esetben 1-es típusú mGluR antagonistákat alkalmaztunk; MPEP-et (25 μ M), ami egy erős, szelektív, nem kompetitív mGluR5 antagonistája, és LY-367385 -öt (10 μ M), ami pedig szelektív mGluR1 antagonistája.

Hisztológia

Az elektrofiziológiai mérések után az agyszeleteket 4% paraformaldehid, 1,25% glutáraldehid és 0,2% pikrinsav tartalmú 0,1 M foszfátpuffer oldatban (PB) fixáltuk, két Wathman cellulóz-nitrát szűrőpapír között, a deformáció elkerüléseért, 4 °C-on, minimum 24, de maximum 72 óráig. A fixáló oldat lemosása után nátrium-azidos 0,1 M-os PB-ben voltak tárolva a szeletek a további feldolgozásig. Az előzőlegesen 10%-os majd 20%-os szukrózoldattal kezelt szeletekben a sejteket folyékony nitrogénes fagyasztással, tártuk fel majd 10%-os zselatinba ágyazva azokat Leica VT 1000S vibratómmal 70 μ m vastagságúra metszettük. A visszametszett szeletek 1:1000 avidin-biotin-tornaperoxidáz-komplex tartalmú trispufferoldatban (TBS) voltak egy éjszakán át inkubálva 4 °C-on. Az elvezetések során biocytinnel töltött sejtek láthatóvá tétele 0,05%-os 3,3'-diaminobenzidine tetrahidrokloriddal (DAB) történt, ami oxidálószer; 0,01% H₂O₂, jelenlétében a biocytinnel töltött sejtekben sötétbarna csapadékot képez. A reakció után a metszetek 1% OsO₄ tartalmú 0,1 M-os PB-ben utófixálódtak majd 1%-os uranil-acetáttal kontrasztosítást végeztünk. Végül a felszálló alkoholsorral dehidratált szeleteket négykomponensű epoxigyantába (Durcupan, Fluka) ágyaztuk és 48 óráig 60 °C-n polimerizáltuk azokat a tárgylemezen. Ezek után az agyszeletekben a kísérletek során elvezetett idegsejtek morfológiája fénymikroszkóppal vizsgálható.

3D rekonstrukció

A hisztológiai eljárás során láthatóvá tett biocytinnel feltöltött sejtek morfológiája Neurolucida rendszerrel (MicroBrightField, Colchester, USA) és BX-60F (Olympus, Tokyo, Japan) fénymikroszkóp segítségével 100x-os olajimmerziós objektívvel. A rekonstrukciók során rekonstruáltuk a sejtek számját, dendritfáját és axon arborizációját.

Analízis és statisztika

Az elektrofiziológiai kísérletek analíziséhez FitMaster (HEKA) és Origin 9.0 (OriginLab) és *Real Statistics Data Analysis Tools* szoftvereket használtunk. EPSC amplitúdókat a posztzinaptikus interneuron -60 mV-on tartásához szükséges tartóáram és az áramválasz minimumának különbségeként számoltuk a FitMaster Analysis eszköze segítségével.

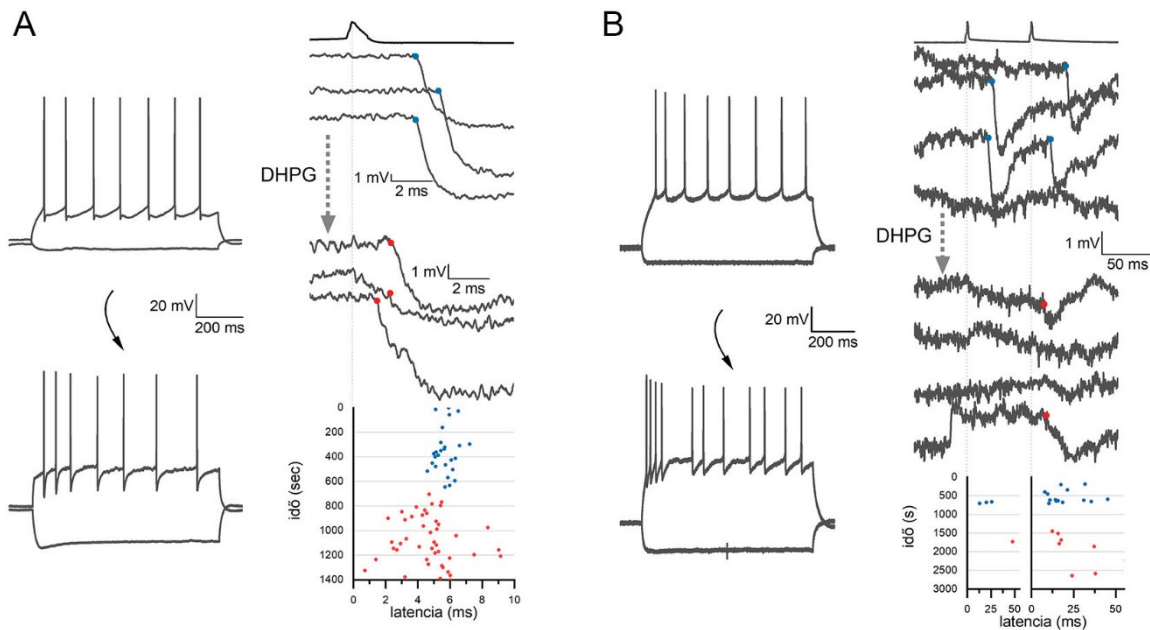
A di- és poliszinaptikus események frekvenciáját és latenciáját a preszinaptikus sejten kiváltott, komplex eseményeket elindító akciós potenciált követő 60 ms-os időablakban mértük. A latencia időt az akciós potenciál csúcsától a szinaptikus események onset ideje közötti intervallumként határoztuk meg.

A statisztikai tesztek az egyes kísérletek paramétereinek megfelelően határoztuk meg. A normalitás tesztet (Shapiro-Wilk teszt, Lilliefors próba) követően a nem normális eloszlású mintákon nem parametrikus tesztek (Mann-Whitney teszt, Wilcoxon Signed Ranked teszt) használtunk. A szignifikancia szintet $P < 0,05$ -nak határoztuk meg.

Eredmények

mGluR aktiváció befolyásolhatja a diszinaptikus IPSC-k előfordulását humán agykéregben

Egyedülálló jelenség a humán kortexben a piramis sejteknek azon képessége, hogy egyetlen akciós potenciállal akár több tíz milliszekundumig tartó komplex eseményeket tudnak iniciálni, egész mikrohálózatokat aktiválva (Molnár és mtsai., 2008). Ezek a mono-, di-, és poliszinaptikus események serkentő és vagy gátló események sorozataiból állnak. Ezért az I-es típusú mGluR receptorok hálózati működésre gyakorolt hatásának a vizsgálatához kortikális sejtpárokból végeztünk elvezetéseket, és di-, és poliszinaptikus eseményeket váltottunk ki, főleg piramissejtek, intracelluláris stimulálásával, majd I-es típusú mGluR agonista, (S)-3,5- dihidroxifenilglicint (DHPG, 50 μ M) applikálását követően tovább monitoroztuk a hálózati eseményeket. A szinaptikus események frekvenciáját és onset idejét a kiváltott akciós potenciált követő 60 ms-os időablakban analizáltuk az agonista hiányában illetve jelenlétében, és változatos hatásokat tapasztaltunk (n= 7). Néhány kísérlet során a vizsgált paraméterek változatlanok maradtak, azonban találtunk facilitálódást (n=3), és depressziót (n= 1) a komplex események megjelenésében. Facilitáció esetében a DHPG applikációja után latenciák, azaz a kiváltott AP-től a posztzinaptikus áramok onset-jéig tartó idők, rövidültek (3. ábra, A), míg az mGluR1/5 mediálta depresszió során a diszinaptikus IPSC-k (gátló posztzinaptikus áram) frekvenciája lecsökkent (3. ábra, B).

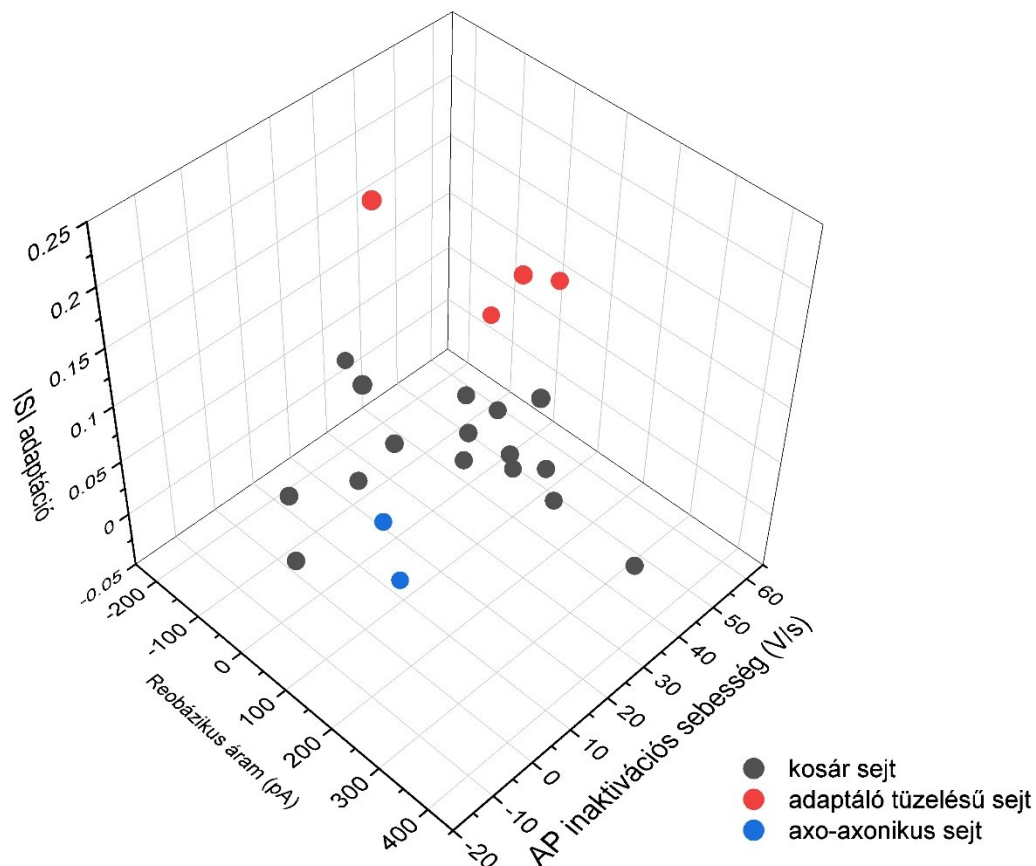


3. ábra, I-es típusú mGluR aktiváció hatása a poliszinaptikus eseményekre. A, Egy 2/3 rétegi piramis AP-je által inicializált komplex szinaptikus események facilitációja mGluR1/5 applikációját követően. Az ábra bal oldalán láthatjuk felül, a piramis sejt tüzelési mintázatát, alatta pedig a vele indirekt kapcsolatban lévő interneuron tüzelési mintázatát. Jobb oldalt a legfelső sorban a piramis sejt AP-jét látjuk, az AP csúcsa halvány szürkével behúzva a következő sorokban is látszik. A következő sorokban az interneuronról elvezetett, egyedülálló, egymást követő, piramis sejt tüzelésével kiváltott szinaptikus feszültségválaszokat mutatja. A szinaptikus válaszok onset-jét kontroll periódus alatt kék pontok, míg DHPG applikációt követően piros pontok jelzik. Az alsó, idő-latencia függvényen láthatjuk, hogy a DHPG hatására csökken a szinaptikus események latenciája. B, Egy 2/3 rétegi piramis AP-je által inicializált komplex szinaptikus események depressziója mGluR1/5 applikációját követően. Bal oldalt itt is a hálózati eseményeket inicializáló piramis sejt (felül) és az elvezetett interneuron (alul) tüzelési mintázata látszik. Jobbra a piramis sejt két stimulációval kiváltott AP-je, majd alatta az interneuronból elvezetett szinaptikus események. Ezeknek az eseményeknek gyakoriságának a csökkenését figyelhetjük meg az mGluR1/5 aktiváció hatására az individuális áram zár módban történő elvezetések soraiban és az alattuk lévő idő-latencia függvényen is.

mGluR aktiváció hatása azonosított sejttípusokon emberi agykéregben

Láttuk, hogy a mGluR-ok aktivációja a poliszinaptikus események modulációjában diverz hatást mutatott. Feltételeztük, hogy a változásért a poliszinaptikus eseményeket kiváltó neuronális hálózatban lévő köztes interneuronokra érkező serkentő bemenetek modulációja a felelős, ezért szinaptikusan kapcsolt piramis interneuron sejtpárok vizsgálatát tűztük ki célul. Ehhez szimultán teljes-sejt elvezetést végeztünk kortikális 2/3 rétegi sejtpárokból, ahol a piramis sejt monoszinaptikus serkentő kapcsolatot ad

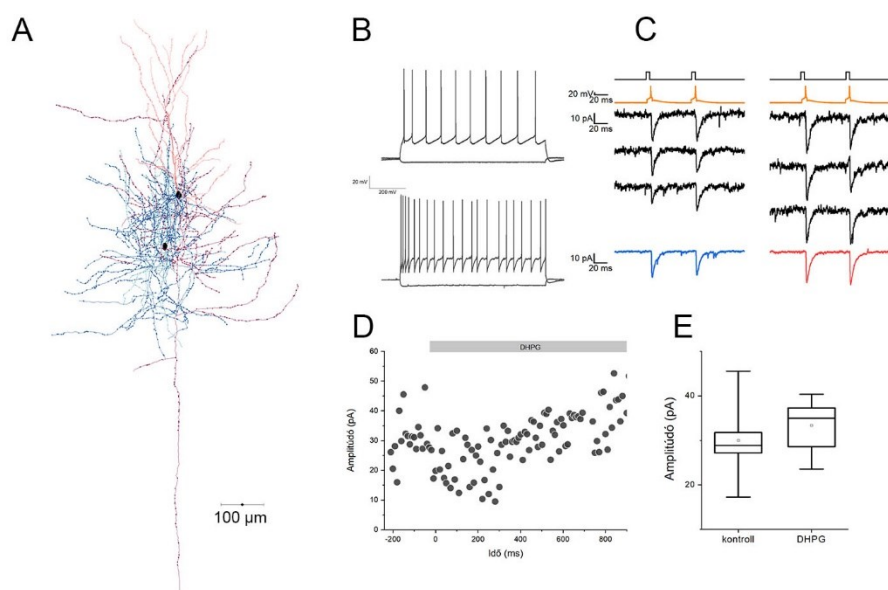
az elvezetett posztszinaptikus interneuronra. Az elmúlt évek emberi agykérgen elvégzett egysejt RNS-szekvenálási kutatásai szerint az emberi agykéreg 45 interneuron altípussal rendelkezik (Hodge és mtsai.). Ezen altípusok teljes jellemzése azonban egyelőre hiányzik, tehát pontos elektrofiziológiai és morfológiai jellemzőik nem ismertek. Célunk volt, hogy a sejt specifikus (Lüscher és Huber, 2010; Meredith, 2019) mGluR1/5 mediált szinaptikus változások megfigyelését különböző alosztályokba tartozó interneuronokon végezzük el. A laborunkban közel 20 éve folytatnak emberi agykérgi elvezetések, az eddigi tapasztalatok alapján az elvezetett interneuronokat 4 fő csoportba soroltuk az elektrofiziológiai elvezetéseken mérhető, az idegsejtekre jellemző paramétereik és morfológiai jegyeik alapján. Ezek a kosár sejtek, axo-axonikus sejtek, tüzelési ráta adaptálódó sejtek (ISI adaptáló sejtek) és az összes többi egyéb a három sejtcsoporttól különböző neuronok. Ez utóbbi csoport, több egyéb elektrofiziológiai tulajdonságaik alapján az első három típustól eltérő altípusba sorolható sejtből áll össze melyekből egyenként csak alacsony számú elvezetés származott.



4. ábra: Kortikális interneuron típusok elektrofiziológiai elkülönülése. A 3D-s ábrán a kosár sejtek (szürke), axo-axonikus sejtek (kék), és adaptáló sejtek (piros) vannak feltüntetve három elektrofiziológiai paraméterük- az inter spike intervallum adaptáció, a reobázikus áram és az AP inaktivációs sebesség- alapján. Az AP inaktivációs sebesség az akciós potenciál leszálló ágának feszültség-idő függvényének a deriváltja. Megfigyelhetjük, hogy az egy csoportba tartozó sejtek egymás közelébe rendeződnek,

paraméterei egymáshoz közeli értékeket vesznek fel. Az ISI adaptáló sejtek kiválnak a magasabb ISI adaptáció értékeikkel míg a gyorsan tüzelő kosár és axo-axonikus sejtek elektrofiziológiailag nem szétválaszthatóak.

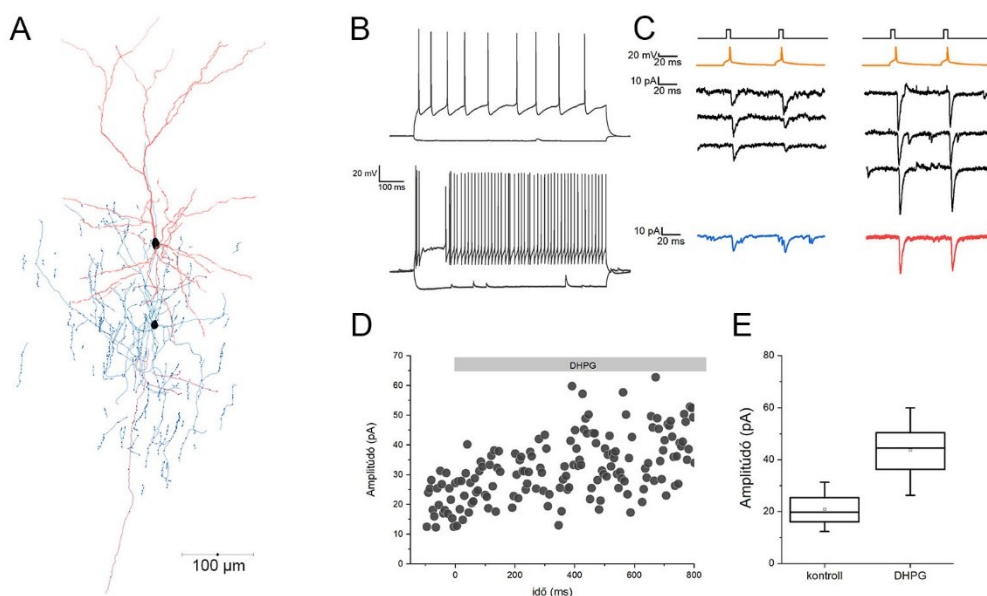
A szinaptikus kapcsolat mGluR függő modulációjának vizsgálatához a preszinaptikus piramis sejtekben AP-t váltottunk páros pulzus protokollal, miközben mértük a posztszinaptikus sejt áramválaszait (5. ábra, C). A kontrol periódus idejét az interneuron membránjának beszakításától mért öt percnél határoztuk meg, azt követően beleoldottuk a szelektív 1-es típusú mGluR agonistát (DHPG, 50 μ M) a mérő ACSF-be a PPP leállítása nélkül. Az mGluR1/5 szinaptikus erősség moduláló hatását az interneuronról elvezetett serkentő posztszinaptikus áram (EPSC) amplitúdóinak mérésével tudtuk megfigyelni (5. ábra, D). Az egy kísérletben, kontrol és farmakológiai receptor aktiváció periódusában mért amplitúdókat két független mintás Mann-Whitney teszttel hasonlítottuk össze. A DHPG indukálta szinaptikus erősség változást a bemosástól eltelt 2-3 perc múlva 200 másodperces időablakban mértük.



5. ábra: Reprezentatív kísérlet; mGluR1/5 aktiváció indukált potenciórozódás kosár sejtre érkező serkentő szinapszison emberi agykéregben. A, Anatómiai rekonstrukció a kísérlet során elvezetett sejt párból. A preszinaptikus piramis sejt dendritjei rózsaszínnel, axonjai bordóval jelölve. A posztszinaptikus axo-axonikus sejten a dendritek világoskékkel, az axonok sötét kékkel vannak jelölve. B, Preszinaptikus piramis sejt tüzelési mintázata (felül), posztszinaptikus kosár sejt tüzelési mintázata (alul). C, Elektrofiziológiai kísérleti protokoll. Első két sorban a preszinaptikus sejtbe injektált áram (fekete) és az így kiváltott akciós potenciálok (narancssárga) vannak ábrázolva. Alatta a posztszinaptikus interneuronból elvezetett individuális áramválaszok (fekete), majd azok átlaga kontrol periódus alatt

(kék) és DHPG applikációt követően (piros). D, Az EPSC amplitúdók változása az idő függvényében DHPG bemosás hatására. E, EPSC amplitúdók kontrol és agonista applikáció alatt. Az egyes körülmények között mért EPSC amplitúdók átlaga (kis négyzet a boksz belsejében), mediánja (boksz középső vonala), 25,75% percentilis (alsó és felső keret), SD (bajusz). Láthatjuk, hogy az agonista az EPSC amplitúdók növekedését, a szinaptikus kapcsolat erősödését eredményezte.

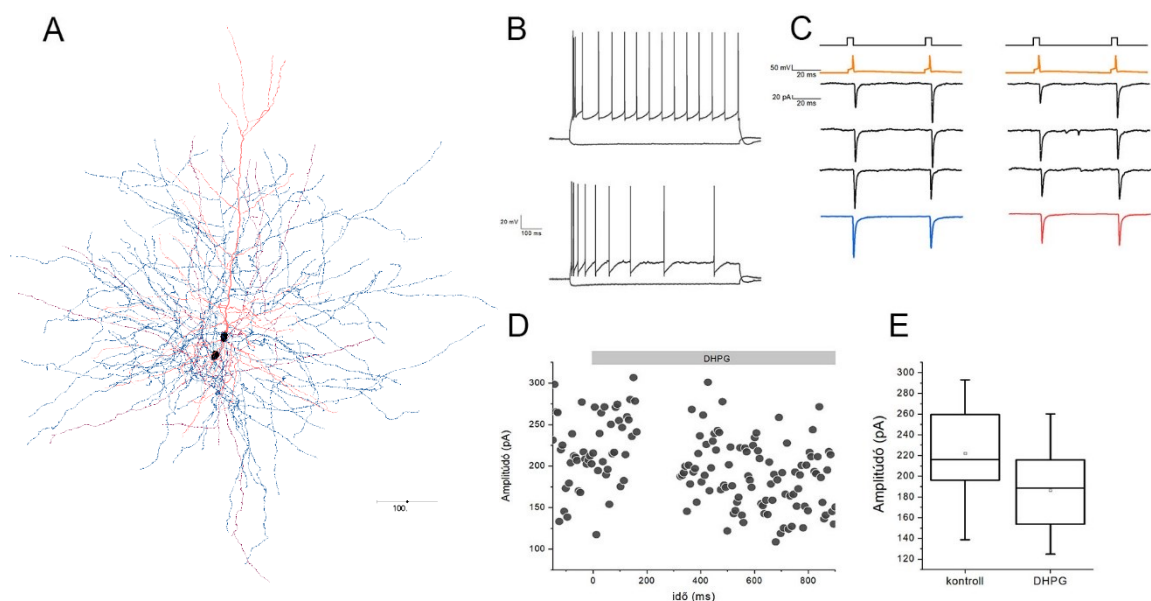
Az első csoport a kosár sejtek csoportja, melyek a rágszáló kéregben az alacsony bemenő ellenállás, a nem adaptálódó akciós potenciál sorozat, rövid akciós potenciál félszélesség és a nagyfrekvenciás tüzelés jellemzi leginkább. Emberi kosársejtben ezeken a jellemzőkön túl még a megszakításos tüzelési minta jellemző. Meg kell jegyezni azonban, hogy ezekre az irányadó paraméterekre gyakran jellemző a heterogén megjelenés, azaz a csoport nem minden neuronján megfigyelhető az összes jellemző jegy megléte. A teljes sejt elvezetés során a sejteket biocytinnel töltjük föl, így azok processzálast követően fénymikroszkóppal vizsgálhatóvá válnak. Ezeknek az interneuronoknak a morfológiáját az axonok más idegsejt szómáira adott szinapszisainak klasszikus kosárszerű elhelyezkedése vagy dendritcélzó axon végződés vagy *en passant* kapcsoltság jellemezte. Kosársejteknél (n=15) az agonista applikációja változatos hatást gyakorolt a szinaptikus erősségre, legjellemzőbben potenciózta azt (n=7) vagy nem volt rá hatással (n=6), de két esetben a kapcsolat depresszióját is megfigyeltük (5. ábra, 8. ábra).



6. ábra: Reprezentatív kísérlet; *mGluR1/5* aktiváció indukált potenciórozódás axo-axonikus interneuronra érkező serkentő szinapszison emberi agykéregben. A, Anatómiai rekonstrukció a kísérlet során elvezetett sejtpárból. A preszinaptikus piramis sejt dendritjei halvány rózsaszínnel, axonjai

bordóval vannak jelölve. A posztszinaptikus axo-axonikus sejten a dendritek világoskékkel, az axonok sötét kékkel vannak rajzolva. Az axonon megfigyelhetők az az erre a sejt típusra jellemző gyöngyszerű megvastagodások. B, Preszinaptikus piramis sejt tüzelési mintázata (felül), posztszinaptikus axo-axonikus sejt tüzelési mintázata (alul). C, Elektrofiziológiai kísérleti protokoll. A preszinaptikus sejtbe injektált áram (fekete) az első sorban, alatta az ezzel kiváltott akciós potenciálok (narancssárga) majd a posztszinaptikus interneuronból elvezetett individuális áramválaszok (fekete) és azok átlaga kontrol periódus alatt (kék) és DHPG applikációt követően (piros). D, Az EPSC amplitúdók változása az idő függvényében DHPG bemosás hatására. E, EPSC amplitúdók kontrol és agonista applikáció alatt. Az egyes körülmények között mért EPSC amplitúdók átlaga (kis négyzet), mediánja (vízszintes vonal), 25,75% percentilis (alsó és felső keret), SD (bajusz).

A második csoportba a morfológiailag is azonosított axo-axonikus sejtek kerültek, melyek kizárólag a piramis sejtek iniciális szegmentumát szinaptizálják, és az axonjaik gyöngyszerű varikozitásai alapján könnyen felismerhetők. Tüzelési mintázatukra a nagy frekvenciájú akciós potenciálok és a pozitív áramaktivációra kialakuló korai akciós potenciál majd az azt követő hosszabb-rövidebb szünet jellemzi. Piramis sejt és axo-axonikus sejt párok (n=2) esetében az mGluR receptorok aktivációja az EPSC amplitúdók növekedését, azaz potencírozódását okozta (n=2). (6. ábra, 8. ábra).

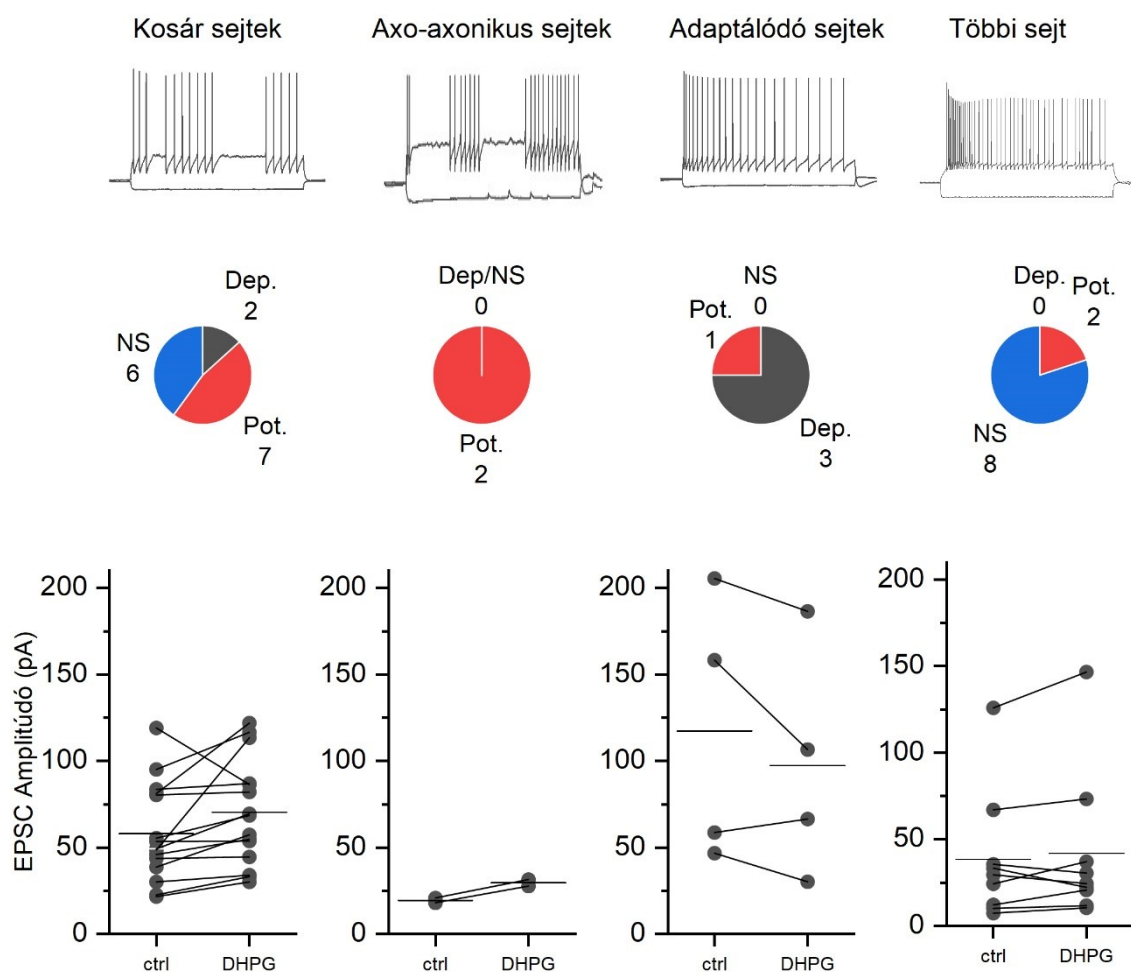


7. ábra: Reprezentatív kísérlet: mGluR1/5 aktiváció indukált potencírozódás ISI adaptáló interneuronra érkező serkentő szinapszison emberi agykéregben. A, A kísérlet során biocytinnel feltöltött sejtek

anatómiai rekonstrukciója. A preszinaptikus piramis sejt dendritjei halvány rózsaszínnel, axonjai bordóval vannak jelölve. B, Preszinaptikus piramis sejt tüzelési mintázata (felül), posztzinaptikus ISI adaptáló interneuron tüzelési mintázata (alul), amin megfigyelhetjük tüzelés frekvenciájának csökkenését. C, Elektrofiziológiai kísérleti protokoll. Első két sorban a preszinaptikus sejtbe injektált áram (fekete) és az így kiváltott akciós potenciálok (narancssárga) látszanak. Alatta a posztzinaptikus interneuronból elvezetett individuális áramválaszok (fekete), majd azok átlaga kontroll periódus alatt (kék) és DHPG applikációt követően (piros). D, Az EPSC amplitúdók változása az idő függvényében DHPG bemosás hatására. E, EPSC amplitúdók kontroll és az agonista applikáció alatt. Az egyes körülmények között mért EPSC amplitúdók átlaga (kis négyzet), mediánja (vízszintes vonal), 25,75% percentilis (alsó és felső keret), SD (bajusz). A mGluR agonista bemosása után az EPSC amplitúdók csökkenése következett be.

A harmadik csoportba azokat az interneuronokat soroltuk melyeknek a küszöbpotenciál feletti konstans áram injektálása során az AP-k között mért intervallum fokozatosan megnő, azaz tüzelésük frekvenciája csökkent a stimulus során. Ezeket a (továbbiakban) ISI (*inter spike intervallum*) adaptálódó sejteknek nevezzük (7. ábra, B). Az ISI adaptálódó sejtekre (n=1), a gyorsan tüzelő sejtekkel ellentétben, a szinaptikus kapcsolat depressziója volt a legjellemzőbb (n=3). (7. ábra, 8. ábra)

A negyedik csoportba soroltunk minden egyéb sejtípust melyeknek az elektrofiziológiai paramétereit nagy heterogenitás jellemezte, e csoport tagjait olyan sejtípusok alkotják melyekből csak kis számú elvezetés készült. Ilyenek voltak például az erősen akciós potenciál amplitúdó adaptálódó Martinotti sejtek, neurogliaform sejtek, vagy szabályosan tüzelő interneuronok. A negyedik csoportban mért serkentő szinaptikus erősségét alapvetően az mGluR receptorok aktivációja nem módosította szignifikánsan, szinaptikus eltérés csak n=2 esetben találtunk n=10 vizsgált sejtől.



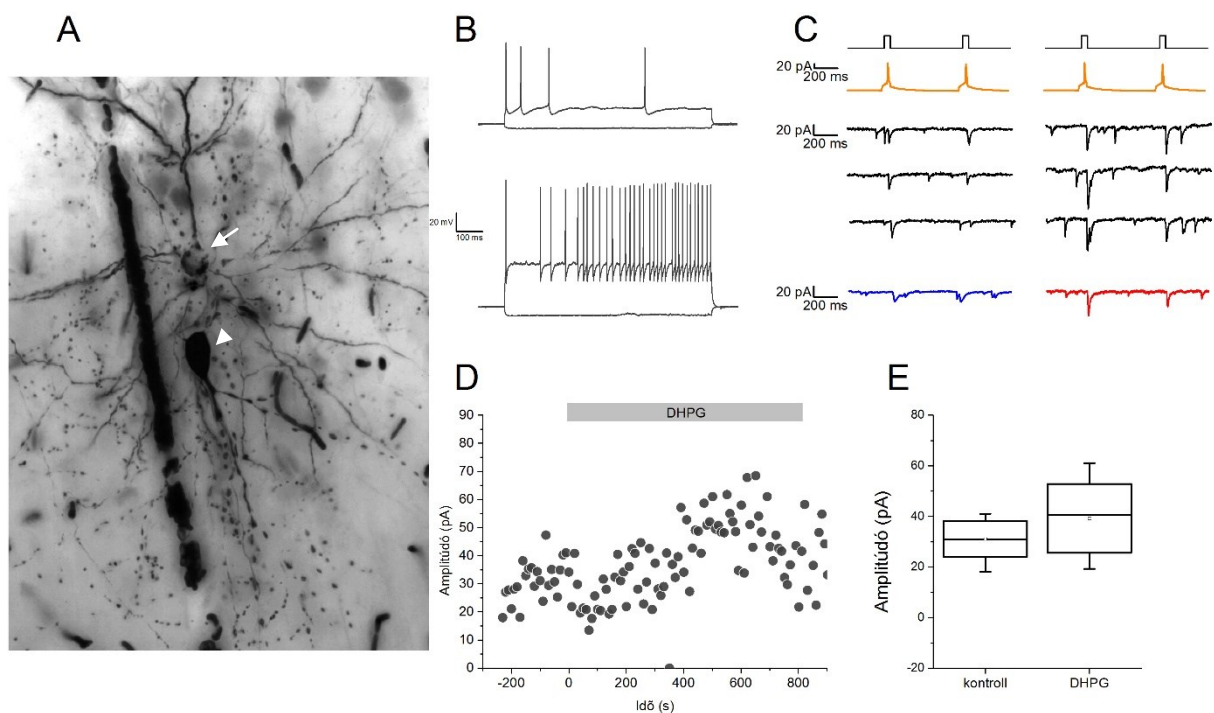
8. ábra, mGluR1/5 aktiváció hatása különböző interneuronokra érkező serkentő szinapszisokon emberi agykéregben. Az ábra egy oszlopa egy interneuron csoportot képvisel. A legfelső sorban az egyes csoportokhoz tartozó sejtek jellemző tüzelési mintázata látszik. Az utolsó oszlop egy heterogén csoportot takar, mely sejtjeire változatos elektrofiziológiai paraméterek jellemzőek, itt egy a kísérleteink során elvezetett interneuron (Martinotti-sejt) látható. A következő sorban az interneuronokra érkező serkentő szinapszisok mGluR1/5 mediálta változásainak eloszlása van feltüntetve az egyes csoportokban. NS: nincs szignifikáns változás, Pot.: potencírozódás, Dep.: depresszió a szinapszis erősségében. A számok a rövidítések alatt az elemszámot jelentik. Az alsó sor grafikonjai a kontrol és DHPG applikáció alatt mért átlagolt EPSC amplitúdókat mutatják, az individuális kísérletekhez tartozó értékek egy vonallal vannak összekötve. A hosszú vízszintes vonal az átlagolt EPSC amplitúdók átlagát mutatja a két kondíció alatt.

Kísérleteink során azt láttuk, hogy az 1-es típusú mGluR-ok aktiválása különböző változás kiváltására képes egyes sejttypusok között és azokon belül is. (8. ábra) A kiváltott szinapszis modulációk mögött

számos molekuláris folyamat húzódnak, ezért szerettük volna megvizsgálni, hogy az mGluR1/5 által indukált hatás fenntartásához szükséges-e az agonista receptorokhoz való kötődése, ami utalhat arra hogy a ligand receptorhoz való kötődése milyen molekuláris folyamatokhoz kapcsolódik, befolyásolja-e a transzkripciót, fehérje szintézist. Ehhez az agonistát kimostuk az eredeti mérő ACSF-fel vagy mGluR1 és mGluR5 antagonistákat (10 μ M LY-367385, 25 μ M MPEP) áramoltattunk az agyszeletekre szintén DHPG mentes ACSF-be oldva, miközben folyamatosan mértük a posztszinaptikus sejten az EPSC-eket. Méréseink során azt figyeltük meg, hogy a különböző irányú plaszticitásbeli változások időbelisége is eltérő, az agonista kötődésének megszűnésére máshogyan reagáltak. A potencírozódó sejtek EPSC amplitúdói a kimosás hatására visszatértek vagy megközelítették a kontrollban mért értékeiket, vagyis az mGluR receptorok folyamatos aktivációja szükséges a szinaptikus hatékonyság növekedésének fenntartásához. A depresszálo sejt párok esetében a legyengült kapcsolat nem állt vissza a kiindulási állapotra és a hatás perzisztált, ami utalhat arra, hogy a DHPG ezekben a kortikális interneuronokban is aktiválni tudta az endocannabinoid jelútvonalat (Heifets és Castillo, 2009) és retrográd molekulákkal a preszinaptikus sejt neurotranszmitter felszabadítás valószínűségére hatva képes kiváltani hosszan tartó depressziót (LTD). Azok a kapcsolatok, ahol az mGluR receptorok farmakológiai aktivációja nem okozott változást az EPSC amplitúdókban, az antagonisták jelenlétében is ugyanolyan erősek maradtak.

mGluR aktiváció hatása gyorsan tüzelő interneuronokon rágcsáló agykéregben

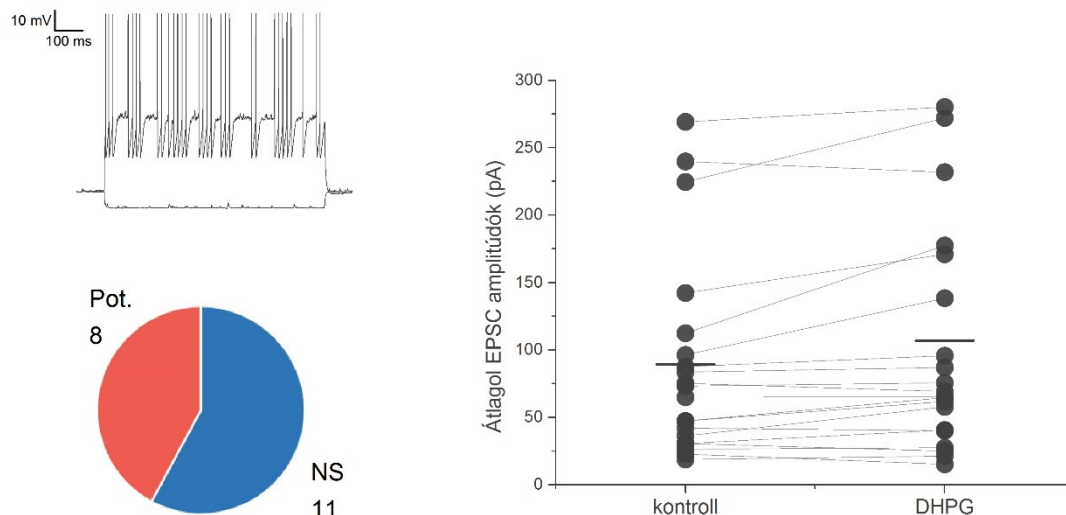
Az mGluR1/5 aktiváció hatását Wistar patkányok agykéregben is megvizsgáltuk gyorsan tüzelő (*fast spiking* - FS) gátló sejteken. Az elvezetett sejtek morfológiájának vizsgálatához számos feltételnek kell teljesülnie mint, hogy a mért neuronok töltődjenek fel megfelelően biocytinnel, illetve a környező sejtek ne vegyék fel azt, és az elvezetett idegsejtek ne legyenek túl közel egymáshoz megnehezítve vagy éppen ellehetetlenítve a különböző sejtektől származó axonok és dendritek elkülönítését. Amennyiben valamely feltétel nem teljesül nem, vagy csak részlegesen tudunk morfológiai elemzést végezni. Patkányokban az elvezetett sejtek (n=19) csupán 37 %-át tudtuk anatómia alapján egyértelműen azonosítani, melyek közül n=1 axo-axonikus sejt és n=6 kosársejt volt. Ezért a modell állatokban végzett kísérleteink során a gyorsan tüzelő interneuronokat és az axo-axonikus sejteket egy csoportként kezeltük mivel a kettőt kizárólag elektrofiziológiai paramétereik alapján nem lehet szétválasztani (Szabadics, 2006).



9. ábra, mGluR1/5 aktiváció indukált potencírozódás kosár sejtre érkező serkentő szinapszison rágszáló agykéregben. A, A kísérlet során biocytinnel feltöltött sejtek fény mikroszkópos képe (nyíl: piramis, nyílhegy: kosársejt) B, Preszinaptikus piramis sejt (felül) és a posztzinaptikus kosársejt tüzelési mintázata (alul). C, Elektrofiziológiai kísérleti protokoll. Preszinaptikus sejtbe injektált áram (fekete) és az ezzel kiváltott akciós potenciálok (narancssárga). Alatta a posztzinaptikus interneuronból elvezetett individuális áramválaszok (fekete), majd azok átlaga kontroll periódus alatt (kék) és DHPG applikációt követően (piros). D, Az EPSC amplitúdók változása az idő függvényében DHPG bemosás hatására. Az egyes körülmények között mért EPSC amplitúdók átlaga (kis négyzet a boks belsejében), mediánja (boks középső vonala), 25,75% percentilis (alsó és felső keret), SD (bajusz). E, EPSC amplitúdók kontroll és agonista applikáció alatt. Az egyes körülmények között mért EPSC amplitúdók átlaga (kis négyzet a boks belsejében), mediánja (boks középső vonala), 25,75% percentilis (alsó és felső keret), SD (bajusz). Az agonista aktiváció hatására az EPSC amplitúdók megnövekedését figyelhetjük meg.

A kosár és axo-axonikus sejteket magába (Kullmann és Lamsa, 2011a) foglaló FS interneuronok DHPG hatására szignifikáns potencírozódást ($n=8$) mutattak (10. ábra), vagy nem befolyásolta az erősségüket az mGluR1/5 receptorok aktivitása ($n=11$). Voltak sejt párok, ahol bár láttunk változást a kapcsolat erősségében az agonista bemosás hatására, az nem érte el a szignifikancia szintet. Együtt nézve az összes

FS interneuronnak a két körülmény, kontroll és DHPG alatt mért EPSC amplitúdóik átlagát azt találtuk, hogy az mGluR1/5 aktiváció szignifikáns potencírozódást ($p=0.007448$, Wilcoxon Signed-Rank teszt) vált ki az interneuronokra érkező serkentő szinapszisokon (10. ábra).



10. ábra: mGluR1/5 aktiváció hatása gyorsan tüzelő interneuronokra érkező serkentő szinapszisokon rágszáló agykéregben. A, bal felső sarokban egy reprezentatív FS tüzelési mintázatot láthatunk. Alatt a kördiagram a potencírozódó (Pot.) és változatlan (NS) erősségű szinaptikus kapcsolatok arányát és számát mutatja. Jobb oldalt az individuális kísérletek farmakon applikáció előtti és utáni átlagolt EPSC amplitúdóit mutatja. A hosszú vízszintes vonal a vonal a két kondíció alatt mért átlagolt EPSC amplitúdók átlaga.

A szinaptikus potencírozódás rágszáló agykéregben is akutnak bizonyult, DHPG kimosás illetve antagonisták alkalmazása esetén a kontroll értékhez csökkentek vissza az EPSC-k amplitúdók.

Patkányban is megfigyeltük a negyedik elektrofiziológiai csoportba tartozó interneuronok serkentő szinapszisainak DHPG indukálta modulációját, mint például Martinotti- és szabályosan tüzelő (*regular spiker*) sejtek. Ezeket a sejteket többnyire nem módosította az mGluR-ok aktiválása $n=5$ -ből egy darab szignifikáns potencírozódást találtunk.

Kísérleteinkből kiderült, hogy a rágsáló agykéregben az 1-es típusú mGlu receptorok a gyorsan tüzelő interneuronokra érkező serkentő szinapszisok potencírozódását mediálják, és vannak ebben a csoportban sejtek, melyek szinapszissai nem mennek keresztül változáson az agonista jelenlétében.

Disszkusszió

Amióta 1894-ben Ramon y Cajal először vetette fel a szinaptikus plaszticitás ötletét, azzal a hipotézissel, hogy a memória kialakítása meglévő idegsejtek közötti kapcsolatok megerősödésével tud megvalósulni (Ramirez és Arbuckle, 2017) a plaszticitás és annak különböző formái számos kutatás fókuszát képezte és képezi továbbra is, és megannyi jelentős felfedezés született belőle, nagyban hozzájárulva a jelenlegi tudásunkhoz és megértésünkhöz az idegrendszerrel kapcsolatban. Azonban az interneuronok plaszticitásának feltárása lemaradt a principális sejteké mögött (Kullmann és Lamsa, 2011b, 2011a), ennek egyik oka a GABAerg sejtek heterogenitásában rejlik, illetve további akadályt képez vizsgálatukban, hogy a serkentő sejteket meghaladó diverzitásuk mellett az agykéreg neuronjainak csupán kisebb hányadát teszik ki, így az egyes interneuron típusoknak a különálló vizsgálata időigényes. A mi célunk az volt, hogy kísérleteinkkel megfigyeljük elektrofiziológiailag azonosított interneuronokra érkező serkentő szinapszisok erősségének modulációját az 1-es típusú metabotróp glutamát receptorok aktivációjának hatására.

Eredményeinket összefoglalva azt találtuk, hogy az 1-es típusú mGluR receptorok farmakológiai aktiválása ember agykéregben képes a komplex szinaptikus események facilitálására a latenciák csökkentésével és azok depresszállására azok frekvenciájának csökkentésével.

A receptor aktiváció akut potencírozódás kiváltására képes humán kortikális 2 és 3-ik rétegi piramis sejtekről interneuronokra; kosár sejtekre, axo-axonikus sejtekre érkező szinapszisokon, mely hatás az agonista kötődése nélkül, DHPG kimosása illetve antagonisták alkalmazását követően, redukálódik, vagy teljesen meg is szűnik. A hosszan tartó hatás hiányát eredményezheti, hogy a receptor aktiváció nem vezet transzkripciós és fehérje szintézisbeli változásokhoz, hanem membrán-függő moduláló mechanizmusok (*Membrane-delimited Modulatory Mechanism*) alakítják ki a jelenséget, azaz a receptor aktivációt követően a G-fehérje egy alegysége diffundál a membránban és ott aktivál vagy éppen gátol más ion- és metabotróp csatornákat. Egy további potenciális mechanizmus az NMDA receptorok mediálta áramok potencírozódása (Mannaioni és mtsai., 2001).

Továbbá megfigyeltük, hogy az ISI adaptáló sejteken jellemzően szinaptikus depresszió alakul ki, melynek fenntartásához nem szükséges az agonista jelenléte. E sejtek tüzelési mintázatuk alapján leginkább a VIP-tartalmú idegsejtekre hasonlítanak melyekre a rágsáló idegrendszerben is a gyors interspike intervallum adaptáció a jellemző (Prönncke és mtsai., 2015). A hosszan tartó mGluR indukálta

depresszálo hatásnak a háttérében állhat az endocannabinoid jelút aktivációja, ahol a preszinaptikus sejtől felszabaduló retrográd transzmittermolekula egy preszinaptikus cannabinoid receptorhoz kötve az ott lévő Ca^{2+} csatornákat gátolja és az ezáltal lecsökkent vezikula felszabadulás valószínűsége keresztül gyengíti a kapcsolat erősségét (Heifets és Castillo, 2009; Lüscher és Huber, 2010). A jövőben célunk ennek a jelútvonalnak a szinapszis modulációjában való szerepét feltárni a preszinaptikus sejteken elhelyezkedő 1-es típusú cannabinoid receptorok (CB1R) blokkolásával.

Wistar patkányok agykérgében végzett vizsgálataink során, a humán kísérletekhez hasonlóan, átmeneti potencírozódást és változatlan erősségű szinapszisokat figyeltünk meg az mGluR1/5 aktivációját követően a gyorsan tüzelő interneuronokon, azonban nem találtunk depressziót mutató kapcsolatokat. Korábbi egér vizuális kéregben végzett vizsgálatok a kosársejtek mGluR5 -mediált LTP indukcióját mutatták ki 4. rétegi extracelluláris aktivációval kiváltott serkentő potenciálokon (Sarihi és mtsai., 2008). Méréseinkben azonban csak akut potencírozódás és nem hosszú tartó potencírozódás volt kiváltható. A különbség oka feltehetőleg az eltérő bemenetek különbözősége lehet.

Egyes sejtek nem voltak érzékenyek ezeknek a receptoroknak az aktivációjára, amelyet feltételezhetőleg az egyik vagy mindkét 1-es típusú mGluR hiánya okoz. Ennek vizsgálatára érdemes lehet immunhisztokémiai vizsgálatokat folytatni és ezeket a receptorokat a fluoreszcensen jelölni, az elvezetett sejtekbe töltött biocytinnel együtt majd kollokalizációt keresni.

Az mGluR1-nek és mGluR5-nek különböző plaszticitást befolyásoló hatását írták le (Mannaioni és mtsai., 2001). A két receptor alosztály individuális blokkolásával az egyes receptorok egyedi hozzájárulását tervezzük majd megvizsgálni a szinaptikus erősség modulációjában.

Az mGluR-ok mint főként periszinaptikus elhelyezkedésű receptorok a preszinaptikus sejt erős aktivitásának hatására aktiválódnak a szinaptikus részből kidiffundáló (*spillover*) glutamát hatására. Működésük mögött számos molekuláris mechanizmus áll, mint például a protein kináz C mediált folyamatok vagy az ioncsatornák kalcium függő modulációja. Hiányukat, túlműködésüket és diszregulációjukat számos kutatás hozta összefüggésbe különböző idegrendszeri megbetegedésekkel. Temporális lebeny epilepsziával küzdő páciensekben ezeknek a receptoroknak a túlzott hippocampális expresszióját figyelték meg. továbbá hippocampális agyszeletekben in vitro növelni tudták az epileptikus aktivitást a mGluR-ek aktivációjával (Meredith, 2019). A glutamát túlzott felszabadulása, betegség vagy trauma hatására, ismerten hozzájárul az excitotoxicitáshoz, ami neurodegradációhoz vezethet. Ezekben a folyamatokban szerepet kaphat az 1-es típusú mGluR-ok működésének vagy regulációjának hibája. Ennek a neurotoxikus folyamatnak az indukálásával vagy mediálásával részt vehetnek olyan kórképek kialakításában, mint a Parkinson kór, Alzheimer kór és Huntington kór.

Azonban ezen receptorok a számos neurotoxikus hatásuk mellett, neuroprotekciós folyamataikat irányító szerepüket is bizonyították mind in vitro, mind in vivo modellekben. Mindezen okokból kifolyólag az mGluR receptorok ígéretes targetjei a neurodegeneratív és neuropszichiátriás megbetegedések kezelését illetve gyógyítását célzó gyógyszerek és terápiák fejlesztésének, melyhez elengedhetetlen ezen receptorok működésének feltárása, különösen az emberi agyban.

Az neokortex dinamikusan változó hálózatai kritikus szerepet játszanak a tudat és komplex gondolkodás és magasabb kognitív kapacitás kialakításában, melyekről úgy tartjuk, hogy kiemelnek minket az állatvilágból. Azonban a nagy felbontású kísérleti vagy vizsgálati technikák gyakran invazívak és így nem alkalmazhatóak élő emberekben, míg a post mortem szövetekben a fiziológiás működés sérült. Különböző modellállatokra támaszkodva azok agykéregének strukturális és funkcionális homológiái révén is közelebb kerülhetünk a saját agyunk működésének megértéséhez. Azonban biztos és klinikailag releváns következtetéseket az emberi agy egészséges és patológiás folyamatairól csak élő humán szövetekből vonhatunk le. Ez volt a célunk nekünk is kísérleteinkben, ahol humán agyszeletekben, in vitro fiziológiás környezetben tudtuk vizsgálni az intaktan maradt kortikális mikrohálózatokat.

Irodalomjegyzék

Arendt, D., Musser, J.M., Baker, C.V.H., Bergman, A., Cepko, C., Erwin, D.H., Pavlicev, M., Schlosser, G., Widder, S., Laubichler, M.D., és mtsai. (2016). The origin and evolution of cell types. *Nat. Rev. Genet.* 17, 744–757.

Ascoli, G.A., Alonso-Nanclares, L., Anderson, S.A., Barrionuevo, G., Benavides-Piccione, R., Burkhalter, A., Buzsáki, G., Cauli, B., DeFelipe, J., Fairén, A., és mtsai. (2008). Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 557–568.

Atwood, H.L., és Karunanithi, S. (2002). Diversification of synaptic strength: Presynaptic elements. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 497–516.

Bartos, M., Alle, H., és Vida, I. (2011). Role of microcircuit structure and input integration in hippocampal interneuron recruitment and plasticity. *Neuropharmacology* 60, 730–739.

Boldog, E., Bakken, T.E., Hodge, R.D., Novotny, M., Aevermann, B.D., Baka, J., Bordé, S., Close, J.L., Diez-Fuertes, F., Ding, S.L., és mtsai. (2018). Transcriptomic and morphophysiological evidence for a specialized human cortical GABAergic cell type. *Nat. Neurosci.* 21, 1185–1195.

Brock, J.A., Thomazeau, A., Watanabe, A., Li, S.S.Y., és Sjöström, P.J. (2020). A Practical Guide to Using CV Analysis for Determining the Locus of Synaptic Plasticity. *Front. Synaptic Neurosci.* 12, 1–16.

Crupi, R., Impellizzeri, D., és Cuzzocrea, S. (2019). Role of metabotropic glutamate receptors in neurological disorders. *Front. Mol. Neurosci.* 12, 1–11.

DeFelipe, J. (2011). The evolution of the brain, the human nature of cortical circuits, and intellectual creativity. *Front. Neuroanat.* 5, 1–17.

DeFelipe, J., Alonso-Nanclares, L., és Arellano, J.I. (2002). Microstructure of the neocortex: Comparative aspects. *J. Neurocytol.* 31, 299–316.

Džaja, D., Hladnik, A., és Bi, I. (2014). Neocortical calretinin neurons in primates : increase in proportion and microcircuitry structure. 8, 1–6.

Ferraguti, F., és Shigemoto, R. (2006). Metabotropic glutamate receptors. 483–504.

Fitzjohn, S.M., Kingston, A.E., Lodge, D., és Collingridge, G.L. (1999). DHPG-induced LTD in area CA1 of juvenile rat hippocampus; characterisation and sensitivity to novel mGlu receptor antagonists. *Neuropharmacology* 38, 1577–1583.

Gouwens, N.W., Sorensen, S.A., Baftizadeh, F., Budzillo, A., Lee, B.R., Jarsky, T., Alfiler, L., Baker, K., Barkan, E., Berry, K., és mtsai. (2020). Integrated Morphoelectric and Transcriptomic Classification of Cortical GABAergic Cells. *Cell* 183, 935–953.e19.

- Heifets, B.D., és Castillo, P.E. (2009). Endocannabinoid signaling and long-term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Physiol.* **71**, 283–306.
- Hennig, M.H. (2013). Theoretical models of synaptic short term plasticity. *Front. Comput. Neurosci.* **7**, 1–10.
- Hodge, R.D., Bakken, T.E., Miller, J.A., Smith, K.A., Barkan, E.R., Graybuck, L.T., Close, J.L., Long, B., Johansen, N., Penn, O., és mtsai. Conserved cell types with divergent features in human versus mouse cortex. *Nature*.
- Korn, H., és Faber, D.S. (1991). perspectives Quantal analysis and synaptic efficacy in the CNS. 439–445.
- Krienen, F.M., Goldman, M., Zhang, Q., C. H. del Rosario, R., Florio, M., Machold, R., Saunders, A., Levandowski, K., Zaniewski, H., Schuman, B., és mtsai. (2020). Innovations present in the primate interneuron repertoire. *Nature* **586**, 262–269.
- Krubitzer, L.A., és Seelke, A.M.H. (2012). Cortical evolution in mammals : The bane and beauty of phenotypic variability. *109*, 10647–10654.
- Kullmann, D.M., és Lamsa, K.P. (2011a). LTP and LTD in cortical GABAergic interneurons: Emerging rules and roles. *Neuropharmacology* **60**, 712–719.
- Kullmann, D.M., és Lamsa, K.P. (2011b). Interneurons go plastic. *Neuropharmacology* **60**, 711.
- Lüscher, C., és Huber, K.M. (2010). Group 1 mGluR-Dependent Synaptic Long-Term Depression: Mechanisms and Implications for Circuitry and Disease. *Neuron* **65**, 445–459.
- Mannaioni, G., Marino, M.J., Valenti, O., Traynelis, S.F., és Conn, P.J. (2001). Metabotropic Glutamate Receptors 1 and 5 Differentially Regulate CA1 Pyramidal Cell Function. *21*, 5925–5934.
- Meredith, R.M. (2019). Group I mGluR-Mediated Activation of Martinotti Cells Inhibits Local Cortical Circuitry in Human Cortex. *13*, 1–13.
- Molnár, G., Oláh, S., Komlósi, G., Füle, M., Szabadics, J., Varga, C., Barzó, P., és Tamás, G. (2008). Complex events initiated by individual spikes in the human cerebral cortex. *PLoS Biol.* **6**, e222.
- Molnár, G., Rózsa, M., Baka, J., Holderith, N., Barzó, P., Nusser, Z., és Tamás, G. (2016). Human pyramidal to interneuron synapses are mediated by multi-vesicular release and multiple docked vesicles. *Elife* **5**, 1–12.
- Northcutt, R.G., és Kaas, J.H. The emergence and evolution mammalian neocortex. 373–379.
- Ola, S., Komlo, G., és Varga, C. (2008). Complex Events Initiated by Individual Spikes in the Human Cerebral Cortex. *6*.
- Prönneke, A., Scheuer, B., Wagener, R.J., Möck, M., Witte, M., és Staiger, J.F. (2015). Characterizing VIP Neurons in the Barrel Cortex of VIPcre / tdTomato Mice Reveals Layer-Specific Differences. 4854–4868.
- Ramirez, A., és Arbuckle, M.R. (2017). HHS Public Access. *80*, 1–6.

Sarihi, A., Jiang, B., Komaki, A., Sohya, K., Yanagawa, Y., és Tsumoto, T. (2008). Metabotropic Glutamate Receptor Type 5-Dependent Long- Term Potentiation of Excitatory Synapses on Fast-Spiking GABAergic Neurons in Mouse Visual Cortex. *28*, 1224–1235.

Shepherd, G.M. (2004). The Human Sense of Smell : Are We Better Than We Think ? *2*, 572–575.

Soukup, J., Zauner, A., Doppenberg, E.M.R., Menzel, M., Gilman, C., Young, H.F., és Bullock, R. (2002). The importance of brain temperature in patients after severe head injury: relationship to intracranial pressure, cerebral perfusion pressure, cerebral blood flow, and outcome. *J. Neurotrauma 19*, 559–571.

Szabadics (2006). Excitatory Effect of GABAergic. *Science (80-.)*. *311*, 233–235.

Szegedi, V., Molnár, G., Paizs, M., Csakvari, E., Barzó, P., Tamás, G., és Lamsa, K. (2017). High-precision fast-spiking basket cell discharges during complex events in the human neocortex. *eNeuro 4*, 1–13.

Takada, N., Pi, H.J., Sousa, V.H., Waters, J., Fishell, G., Kepecs, A., és Osten, P. (2014). A developmental cell-type switch in cortical interneurons leads to a selective defect in cortical oscillations. *Nat. Commun. 5*, 1–8.

Wang, B., Ke, W., Guang, J., Chen, G., Yin, L., Deng, S., He, Q., Liu, Y., He, T., Zheng, R., és mtsai. (2016). Firing frequency maxima of fast-spiking neurons in human, monkey, and mouse neocortex. *Front. Cell. Neurosci. 10*, 1–13.

Woodruff, A., és Yuste, R. (2008). Of mice and men, and chandeliers. *PLoS Biol. 6*, 1833–1836.

Tételes szerzői hozzájárulás

A 36. OTDK

BIOLÓGIA SEKCIÓ FELHÍVÁSÁNAK

2. SZÁMÚ MELLÉKLETE

TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS*

Alulírott Sandle Joanna Grace nyilatkozom, hogy a 36. OTDK-ra benyújtott *1-es típusú mGluR aktiváció hatása a serkentő szinaptikus jelátvitelre emberi és rágcsáló agykéregben* című dolgozatomban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt:

Rész/feladat*	Felkészítés után önállóan végeztem a dolgozathoz szükséges mennyiségben (%-ban megadva)	Folyamatos segítséggel végeztem a dolgozathoz szükséges mennyiségben (%-ban megadva)
<i>Humán kísérletek - elektrofiziológia</i>	30%	
<i>Humán kísérletek - analízis</i>	30%	
<i>Rágcsáló kísérletek - elektrofiziológia</i>	100%	
<i>Rágcsáló kísérletek - analízis</i>	100%	
<i>Hisztológia és rekonstrukció</i>	0%	

Magyarázat: -

Kelt: 2022.04.14.



Sandle Joanna Grace

Pályamunkát benyújtó hallgató aláírása

Anyilatkozatbanfoglaltakhelyességétmegerősítem:



Dr. Molnár Gábor

SZTE TTIK Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék
Témavezető aláírása