

Központi idegrendszeri szinapszisok molekuláris összetétele

Nusser Zoltán



MTA “Lendület” Celluláris Idegélettan Laboratórium
Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet
Budapest

Fő kutatási témák az MTA KOKI Celluláris Idegélettani Laboratóriumában; 2016. november

1. A központi idegrendszer serkentő (glutamáterg) és gátló (GABAerg) szinapszisai molekuláris, struktúrális és funkcionális diverzitásának megértése (**MTA Lendület Pályázat**)

Watt et al., 2009, *Nature Neurosci*; Holderith et al., 2012, *Nature Neurosci*; Lenkey et al., 2015, *Nature Comm*

2. Feszültség- és ligand-függő ioncsatornák sejtfelszíni eloszlásának feltérképezése és speciális eloszlási mintázatok funkcionális következményeinek meghatározása (**ERC Advanced Grant**)

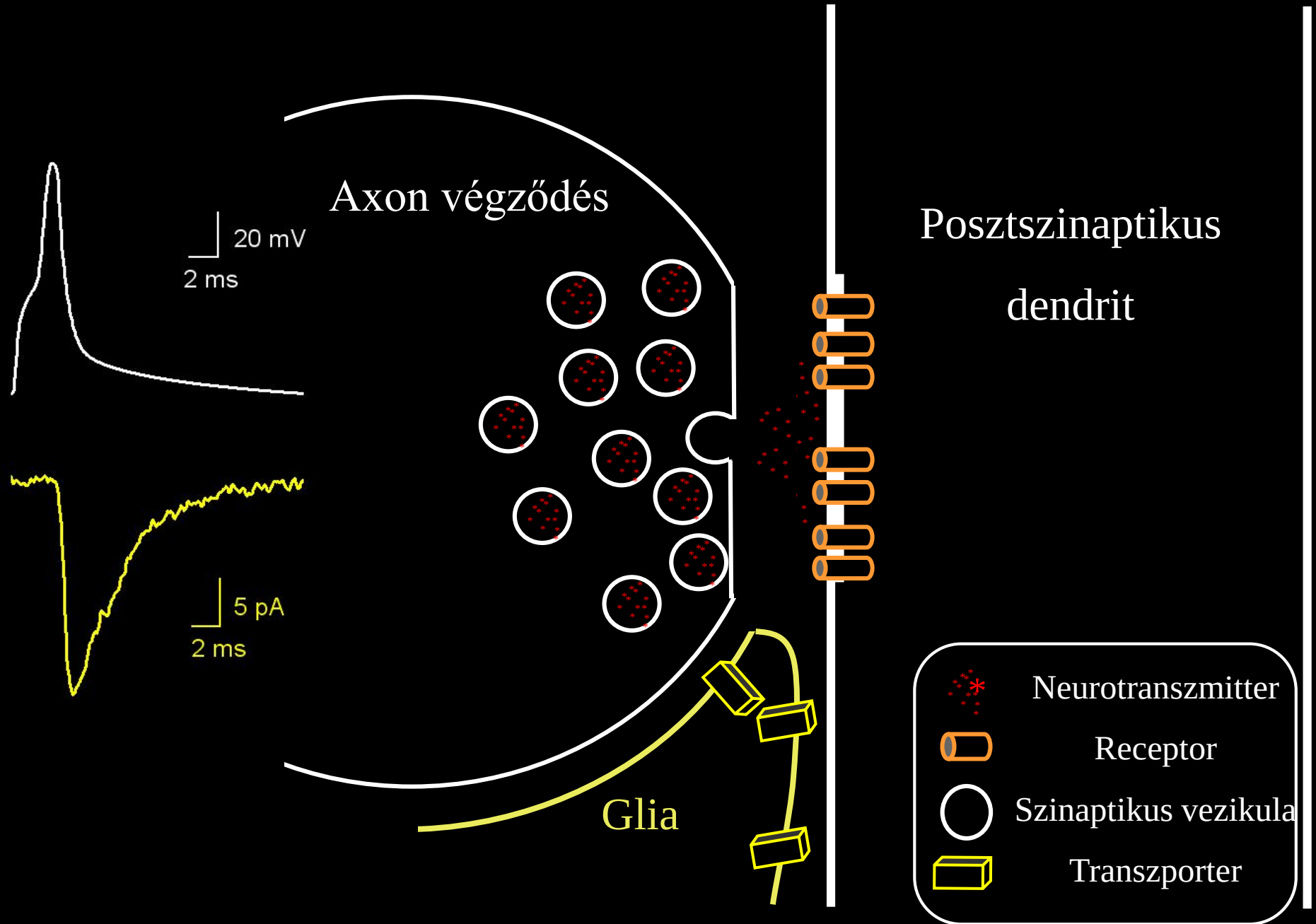
Lorincz & Nusser, 2010, *Science*; Vervaeke et al, 2012, *Science*; Billings et al., 2014, *Neuron*, Szoboszlay et al., 2016, *Neuron*

3. Azonosított idegsejtek aktivitásának meghatározása különböző viselkedés alatt

Fő megközelítési módszerek az MTA KOKI Celluláris Idegélettani Laboratóriumában

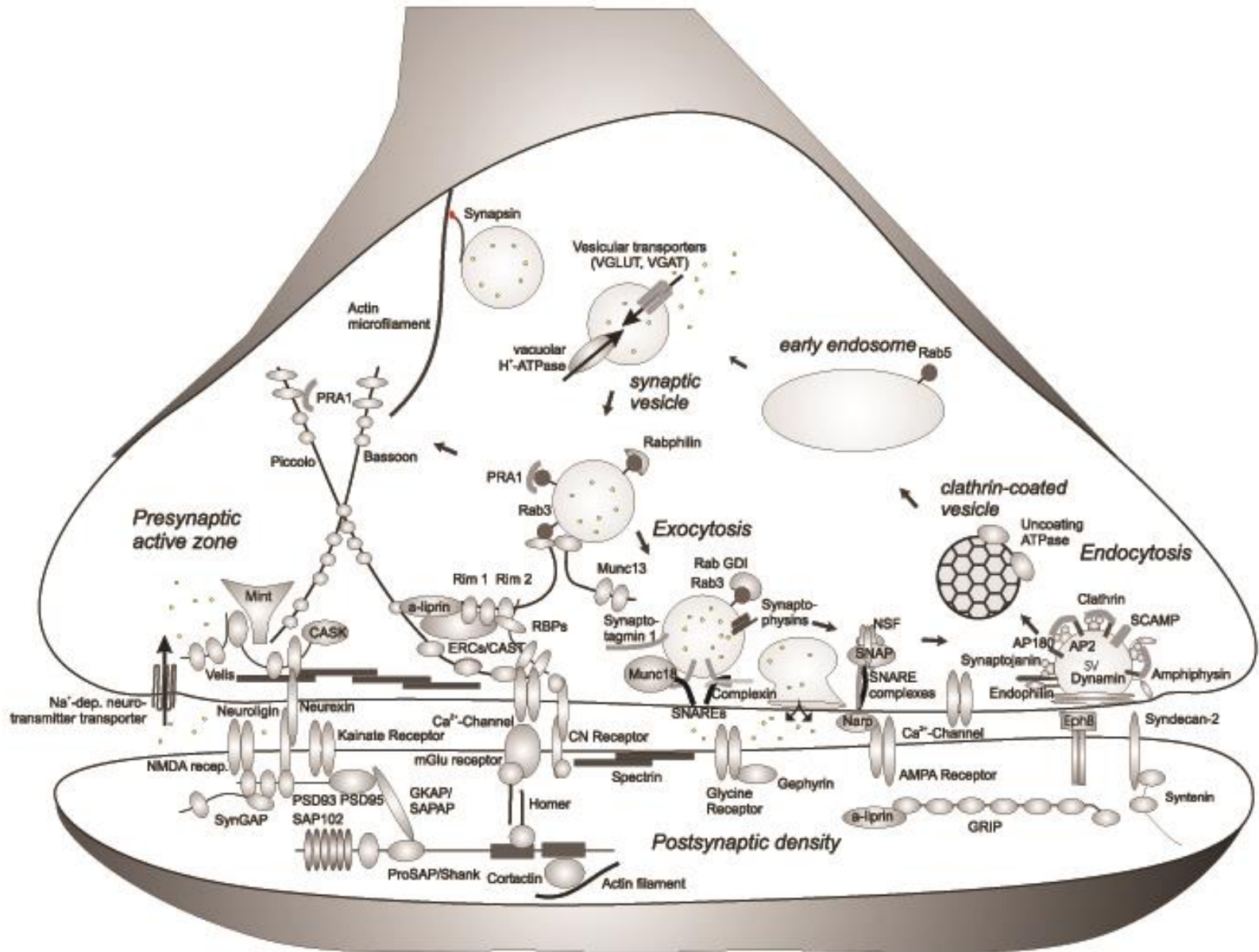
- *In vitro* patch-clamp elektrofiziológia
- *In vitro* két-foton pásztázó mikroszkópia
- Az elvezetett/képalkotott sejtek korrelált LM és EM analízise
- Molekuláris neuroanatómia LM és EM szinten (SDS-FRL)
- Egy-sejt és neuronhálózat számítógépes modellezése
- *In vivo* két-foton pásztázó mikroszkópia
- Viselkedés (pl. szaglás diszkrimináció, kontextuális memória)

Kémiai szinaptikus neurotranszmisszió



The diagram illustrates the molecular organization of a synapse, showing the presynaptic active zone, synaptic vesicle cycle, and postsynaptic density. Key components and processes include:

- Presynaptic Active Zone:** Contains proteins like PRA1, Piccolo, Bassoon, and Mint, which are involved in organizing the release machinery.
- Synaptic Vesicles:** Contain neurotransmitters and transporters (VGLUT, VGAT). They are loaded with neurotransmitters by vesicular transporters and released into the synaptic cleft.
- Vesicle Trafficking and Fusion:** Rab proteins (Rab3, Rab5, Rabphillin) and SNARE complexes (Syntaxin, SNAP-25, Synaptobrevin) mediate the fusion of synaptic vesicles with the presynaptic membrane.
- Endocytosis:** Includes clathrin-coated vesicle formation and bulk endocytosis, mediated by proteins like AP-2, Dynamin, and Amphiphysin.
- Postsynaptic Density:** Contains receptors (NMDA, AMPA, Glycine, GABA, etc.) and scaffolding proteins (PSD-95, SAP-97, etc.) that anchor the receptors to the actin cytoskeleton.
- Signaling and Regulation:** Various signaling molecules and structural proteins (e.g., Ca²⁺-channel, mGlu receptor, Gephyrin, Syntrophin) are involved in regulating synaptic transmission and plasticity.



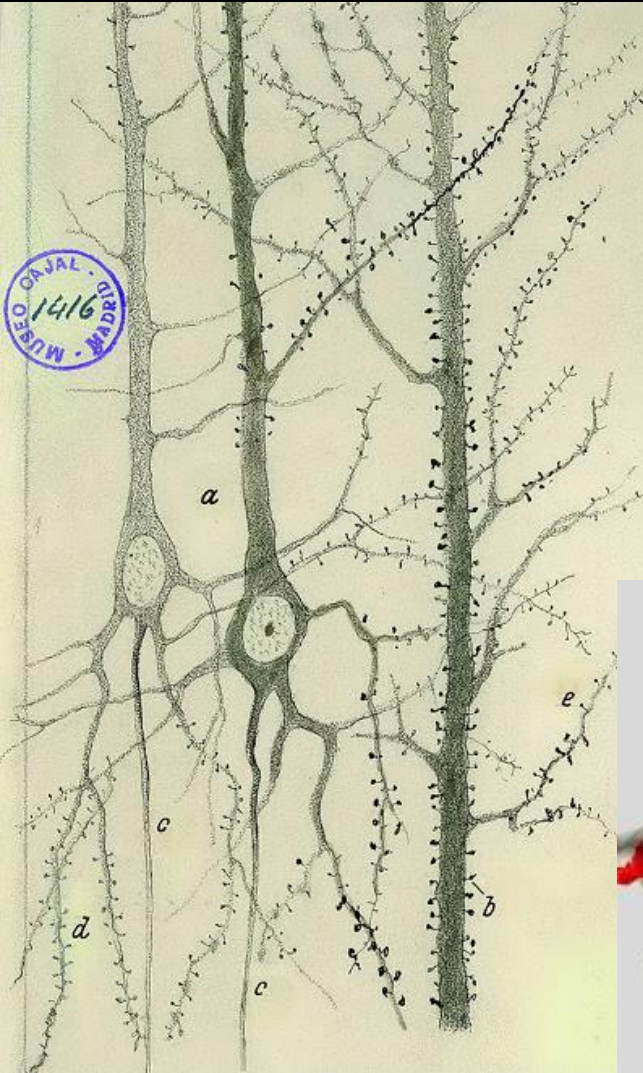
A szinapszisok funkcionális plaszticitása a neuronhálózatok információ tároló képességének az alapja (Hebb, 1949). Ha egy neuronhálózatban információ lett eltárolva akkor a hálózatban lévő szinapszisok különböző funkcionális állapotban kell legyenek.

Hipotézisünk: kvantitatív molekuláris különbségek felelősek a serkentő (glutamáterg) szinapszisok funkcionális diverzitásáért.

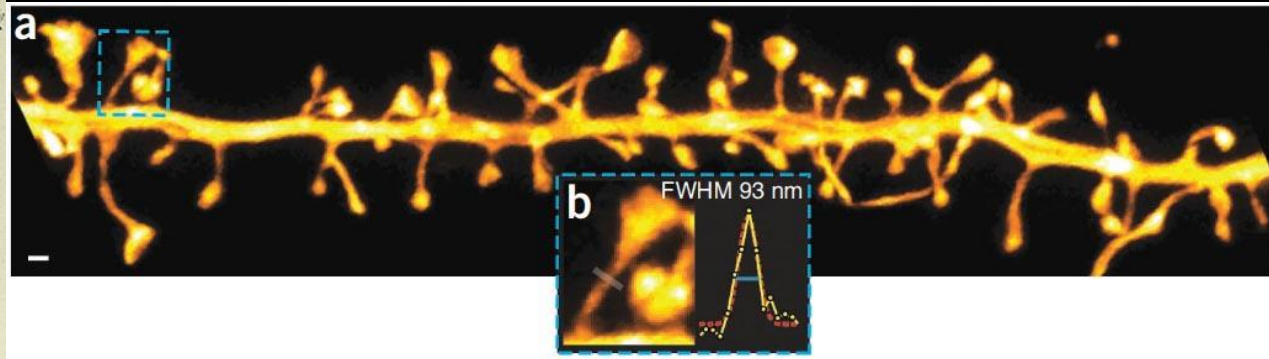
Dendrites of cortical pyramidal cells contain spines with diverse morphology

Drawing by Cajal showing pyramidal cells. Dendritic spines are clearly depicted.

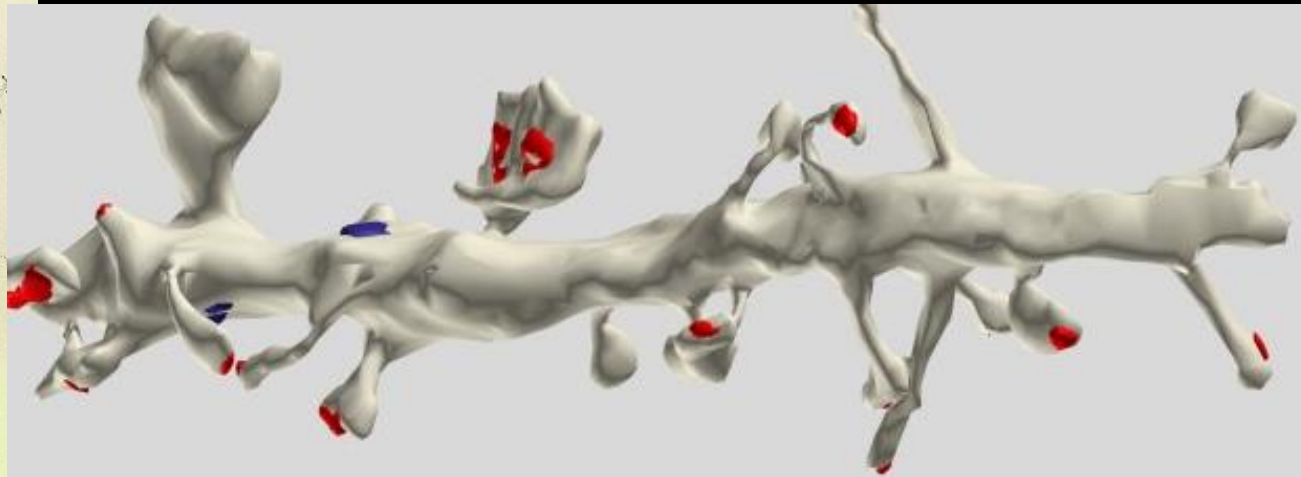
Instituto Cajal (1896)



Visualization of spines with superresolution LM (STED, Tonnesen, 2014, Nat Neurosci)

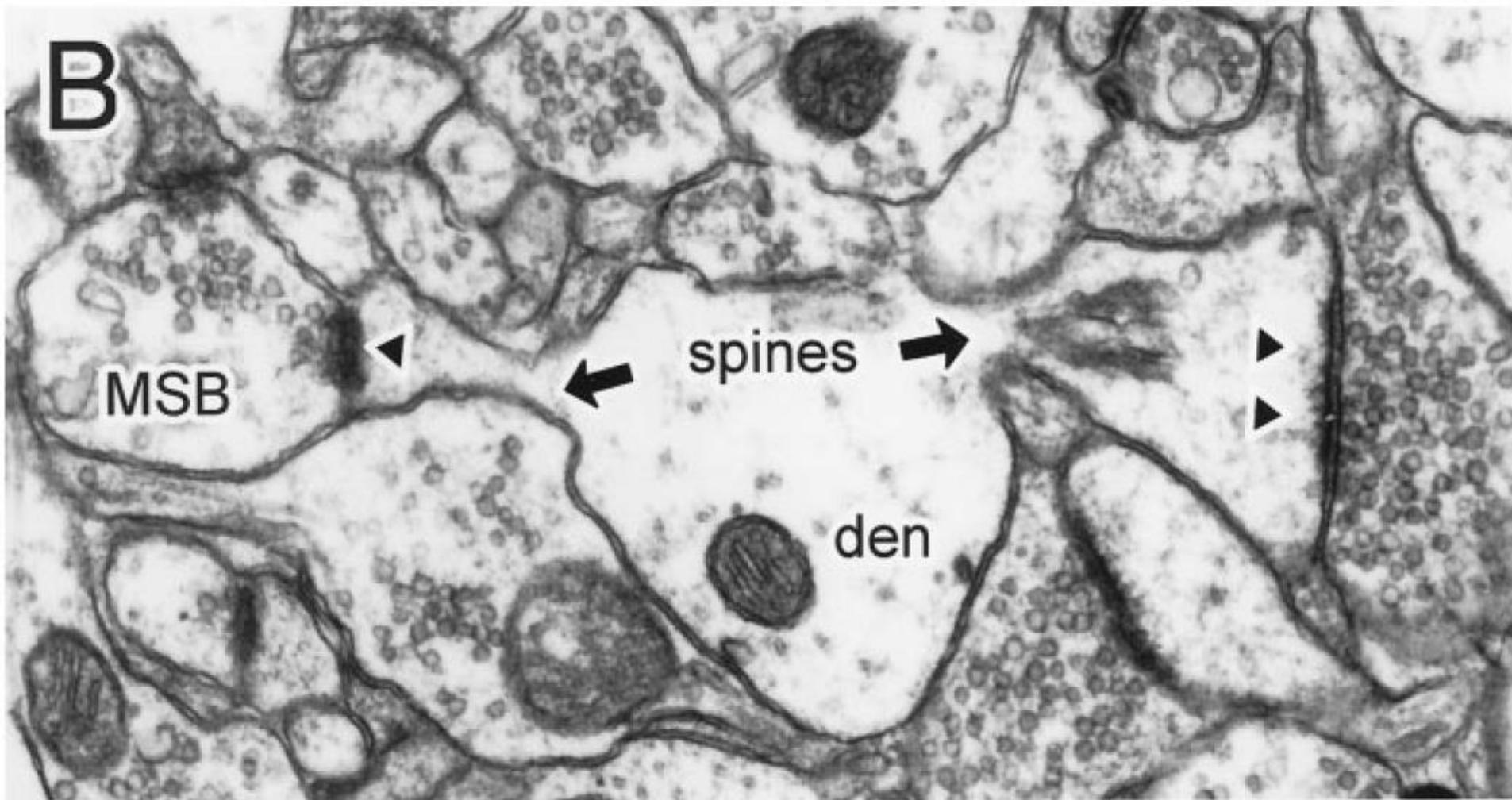


Visualization of spines with serial section EM



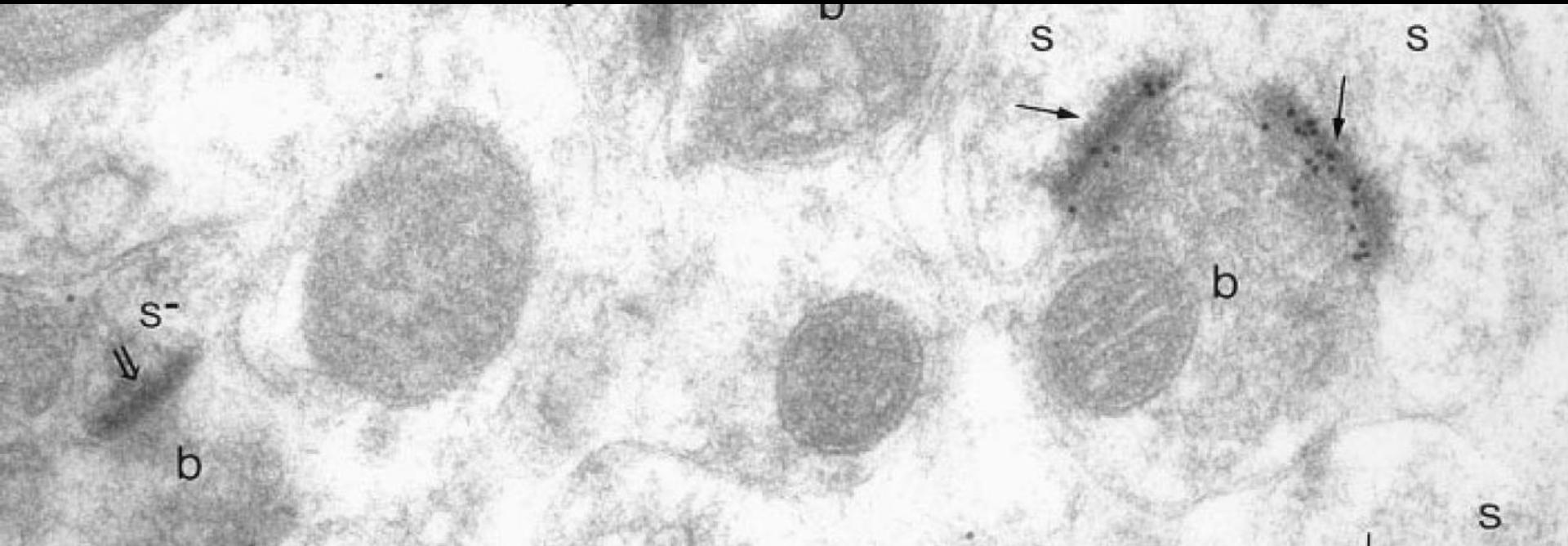
A hippocampális Schaffer kollaterális szinapszisok ultrastrukturális diverzitása

(Shepherd and Harris, 1998, J Neurosci)



A nagy Schaffer kollaterális szinapszisok sok posztzinaptikus AMPA receptort tartalmaznak

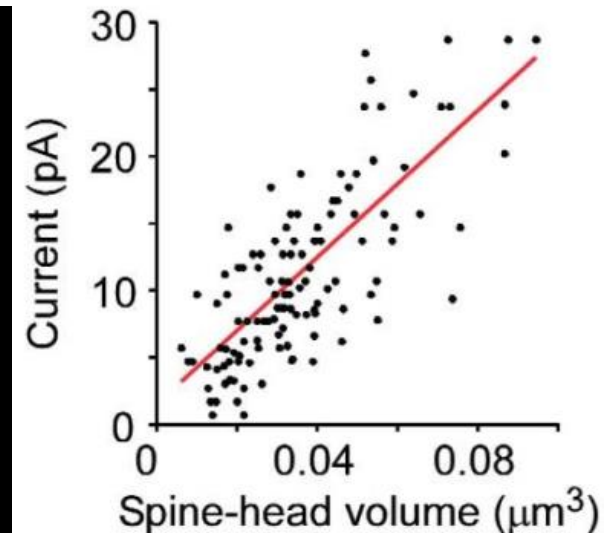
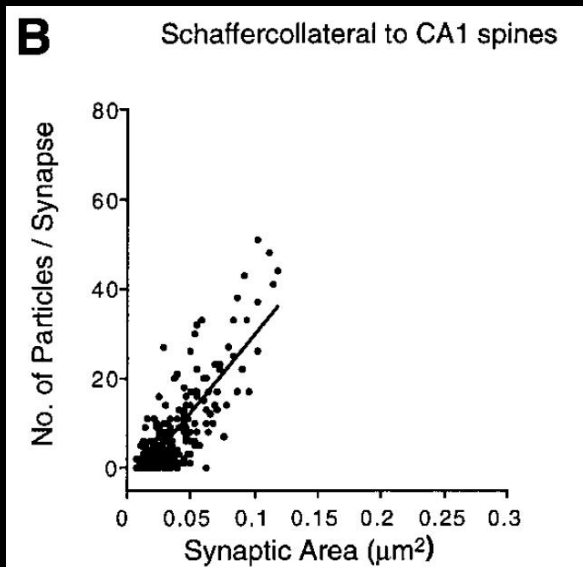
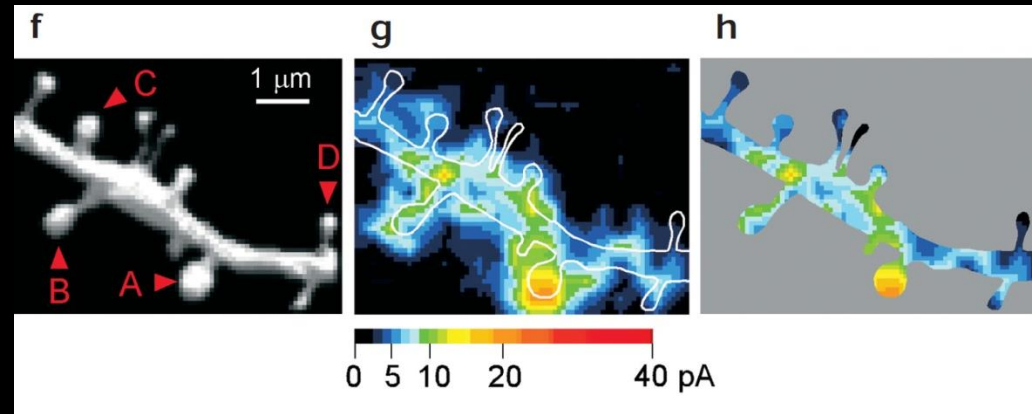
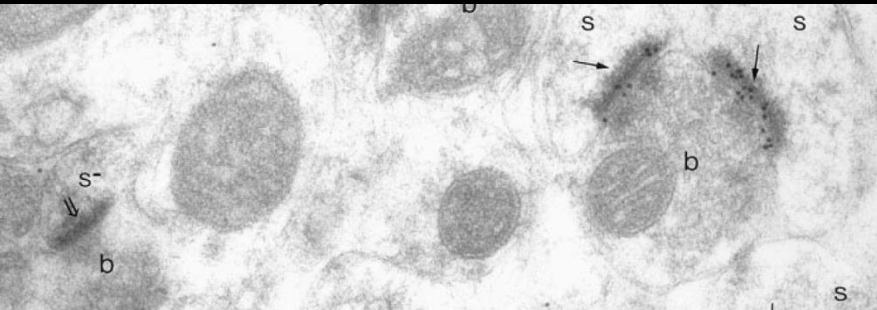
Nusser et al., 1998, Neuron



A nagy Schaffer kollaterális szinapszisok sok posztzinaptikus AMPA receptort tartalmaznak és nagy posztzinaptikus áram keletkezik rajtuk

Nusser et al., 1998, Neuron

Matsuzaki et al., 2001, Nat Neurosci

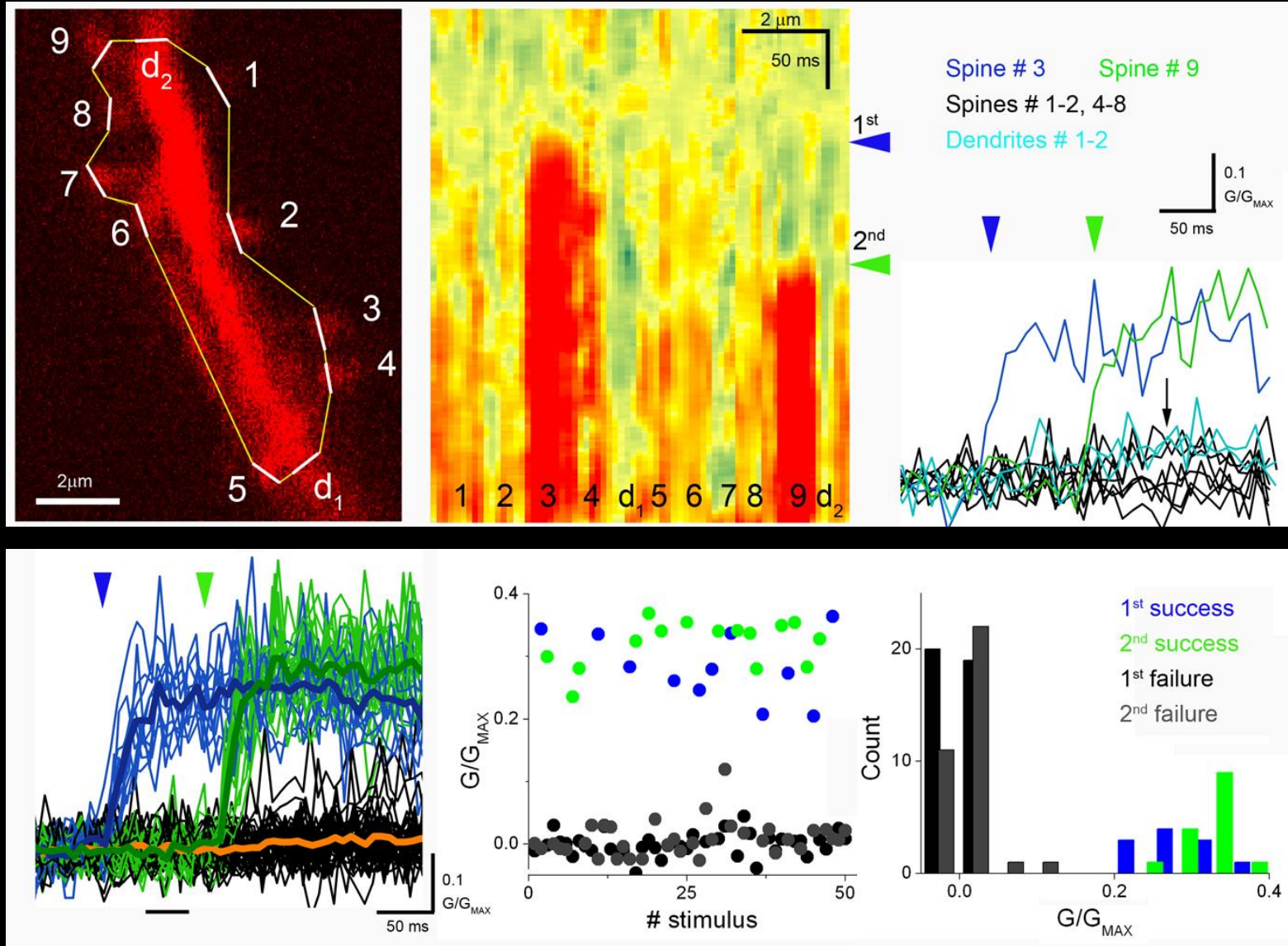


A Schaffer kollaterális szinapszisok mérete jól megjósolja a posztzinaptikus válaszok nagyságát.

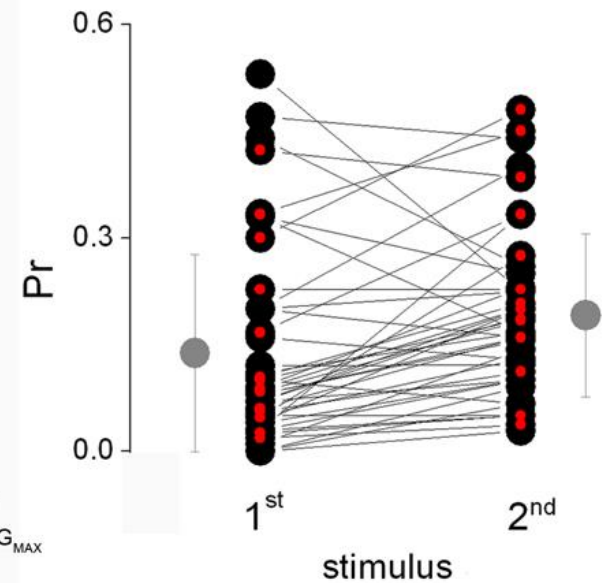
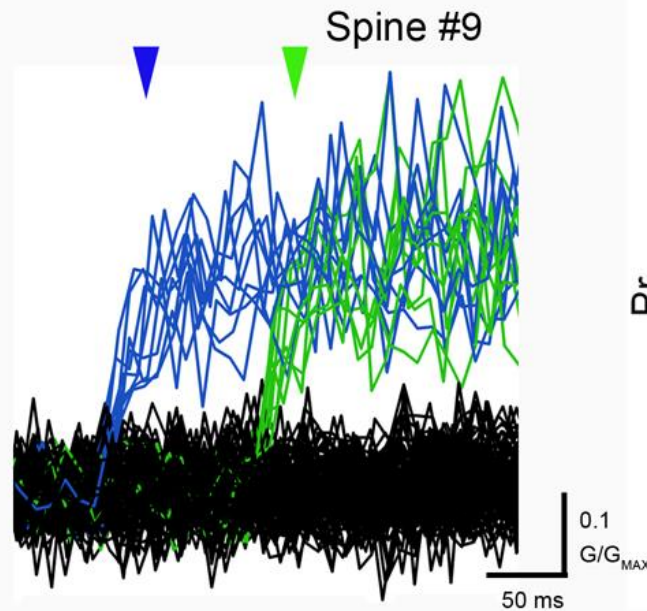
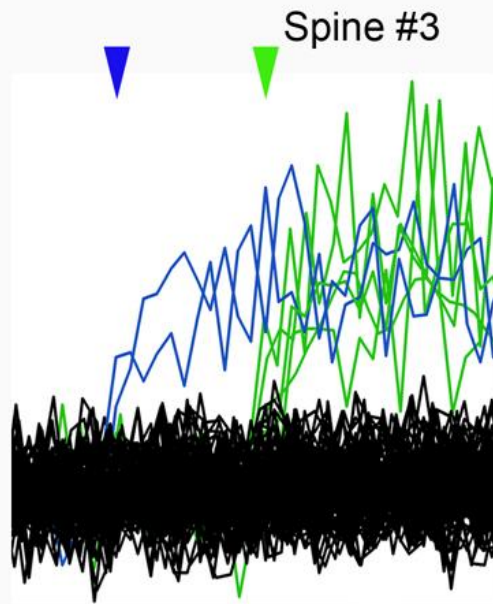
A méretnek magának valójában nincs lényegi hatása a posztzinaptikus válasz (áram) nagyságára, de mivel a méret arányos a posztzinaptikus receptorok számával ami meghatározza a posztzinaptikus áram nagyságát, így a méret jól használható a funkció jóslására.

A preszinaptikus terminális milyen molekuláris specializációja reflektálódik a struktúrában ami meghatározza a funkciót?

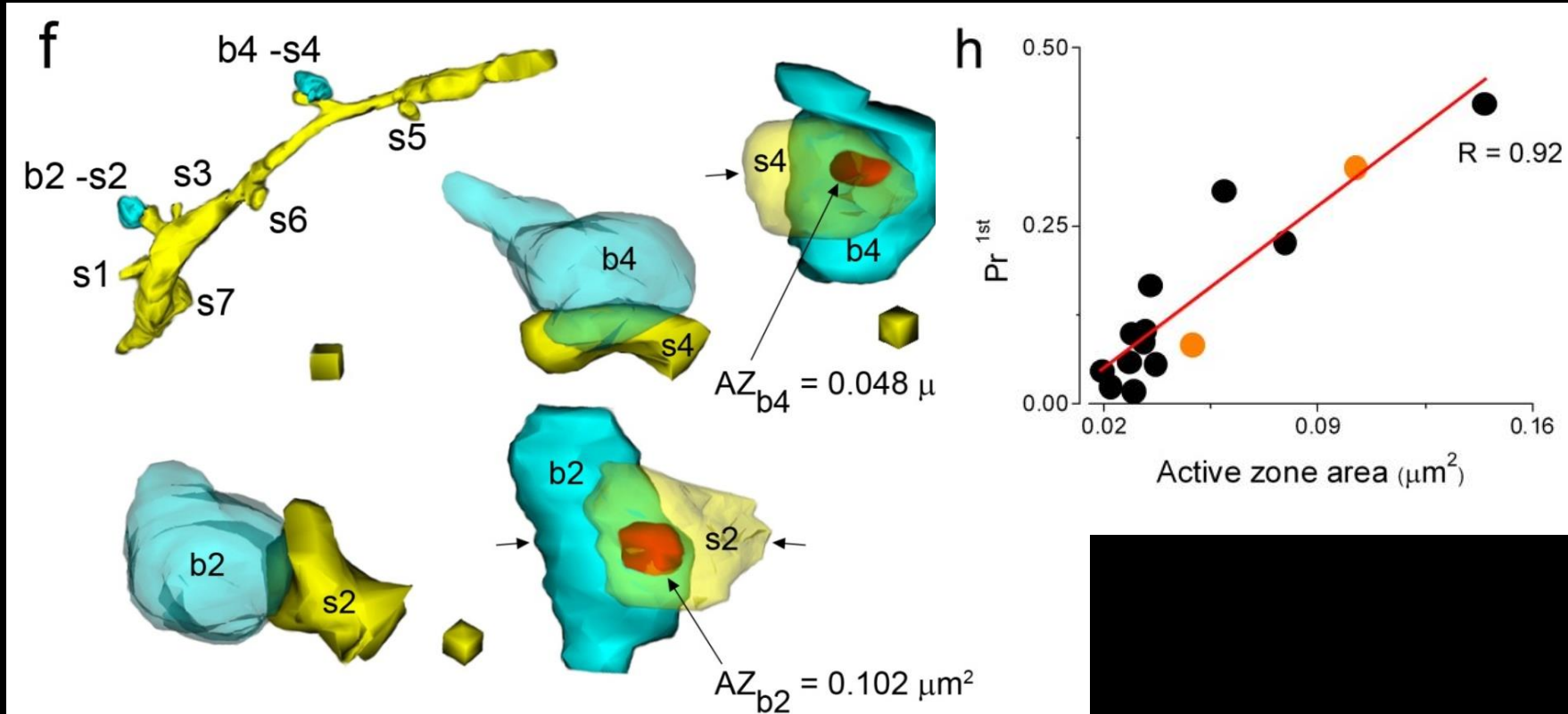
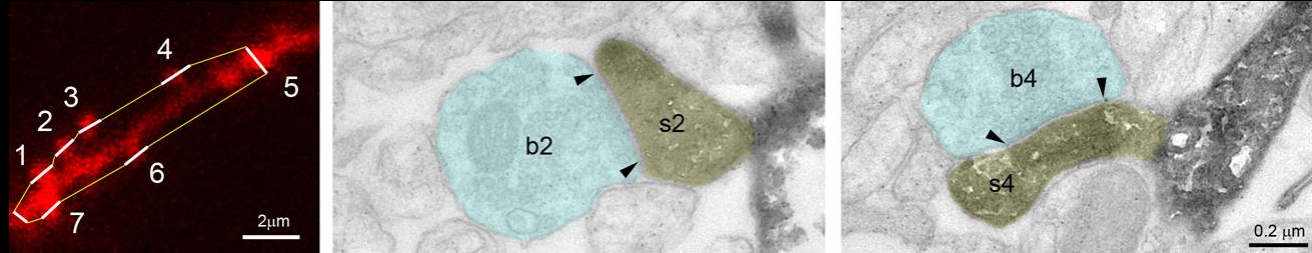
Optikai kvantális analízis lehetővé teszi a transzmitter felszabadulási valószínűség (Pr) meghatározását.



A transmitter felszabadulási valószínűség (Pr) nagy variabilitást mutat különböző axon végződések között.



Ismert funkciójú axonok ultrastrukturális analízisa



Mi az a molekula ami valószínűleg meghatározza a transzmitter felszabadulási valószínűségét?



SDS-emésztett fagyasztva tört
replica immunjelölés (SDS-FRL)

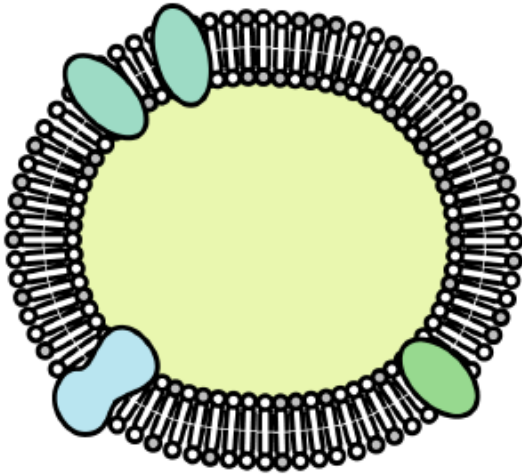
Kazushi Fujimoto
5 Feb 1954 - 28 Nov 2003

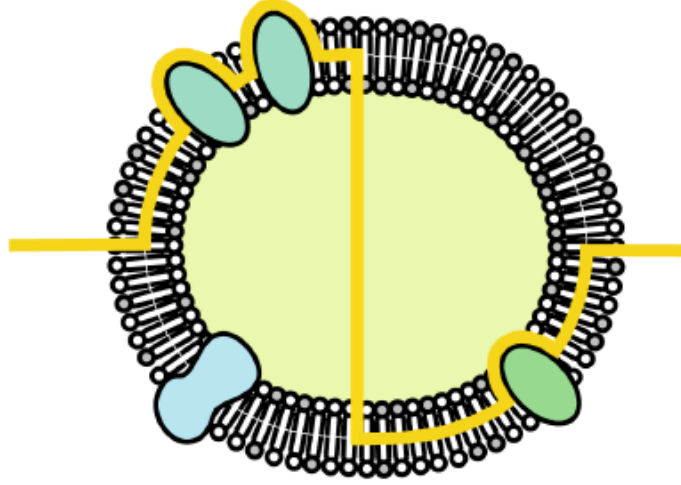
Ryuichi Shigemoto
Yugo Fukazawa

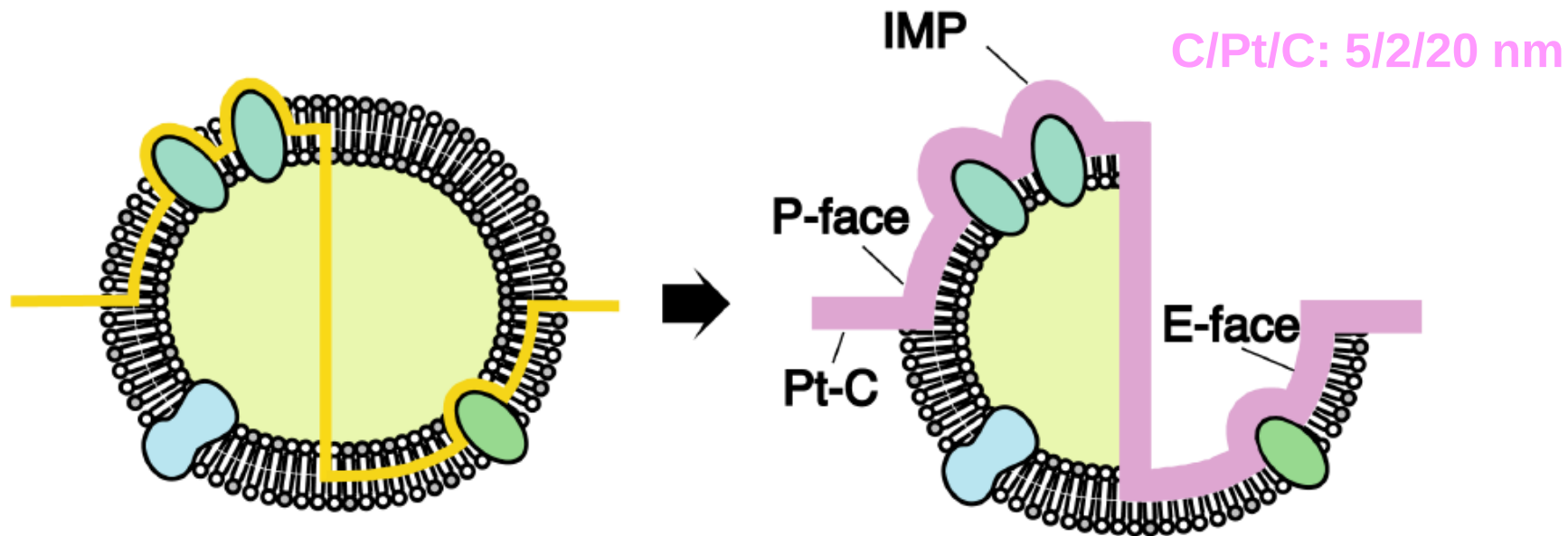
National Institute for Physiological
Sciences, Okazaki, Japan

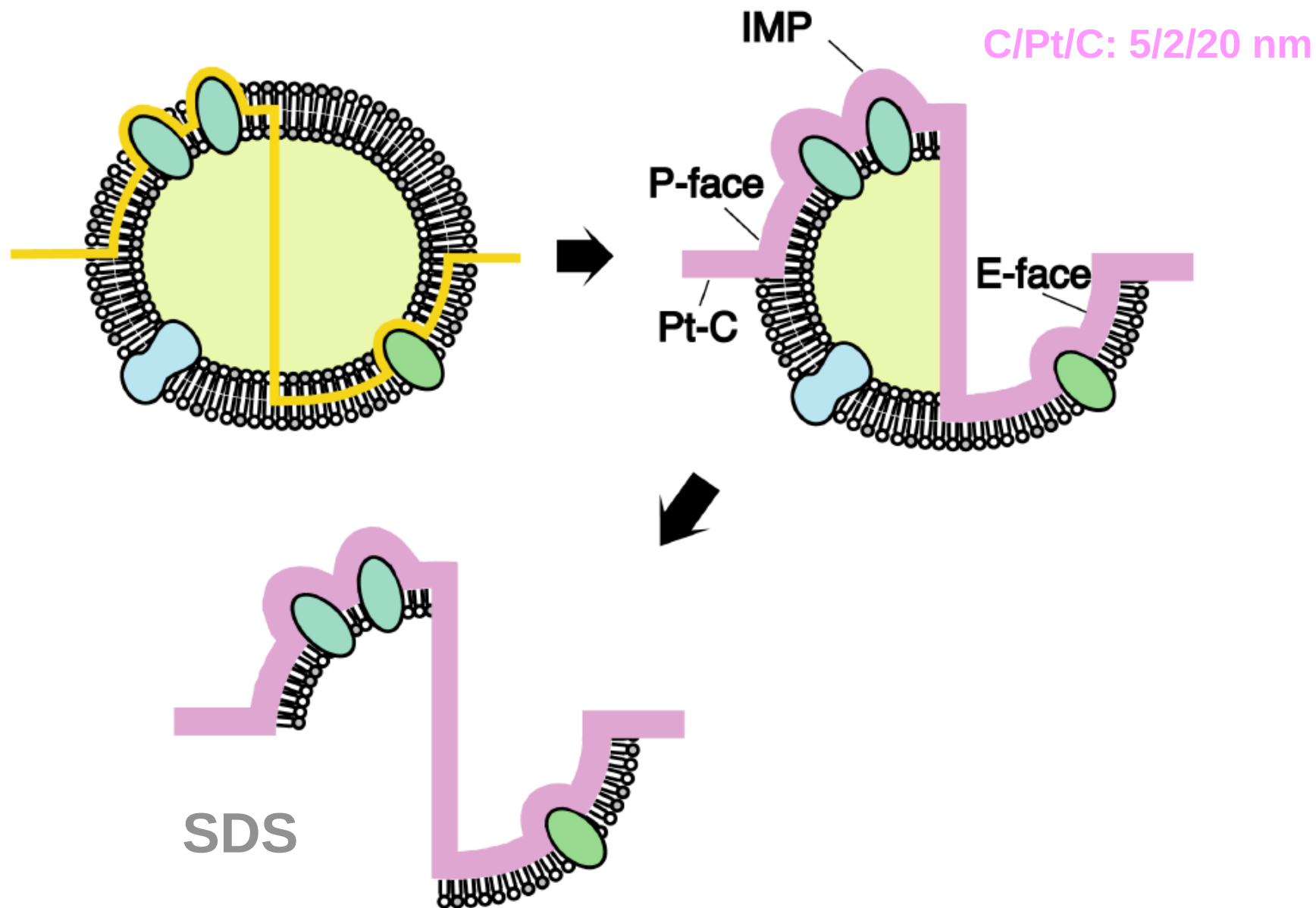
Lőrincz Andrea
MTA KOKI, Budapest

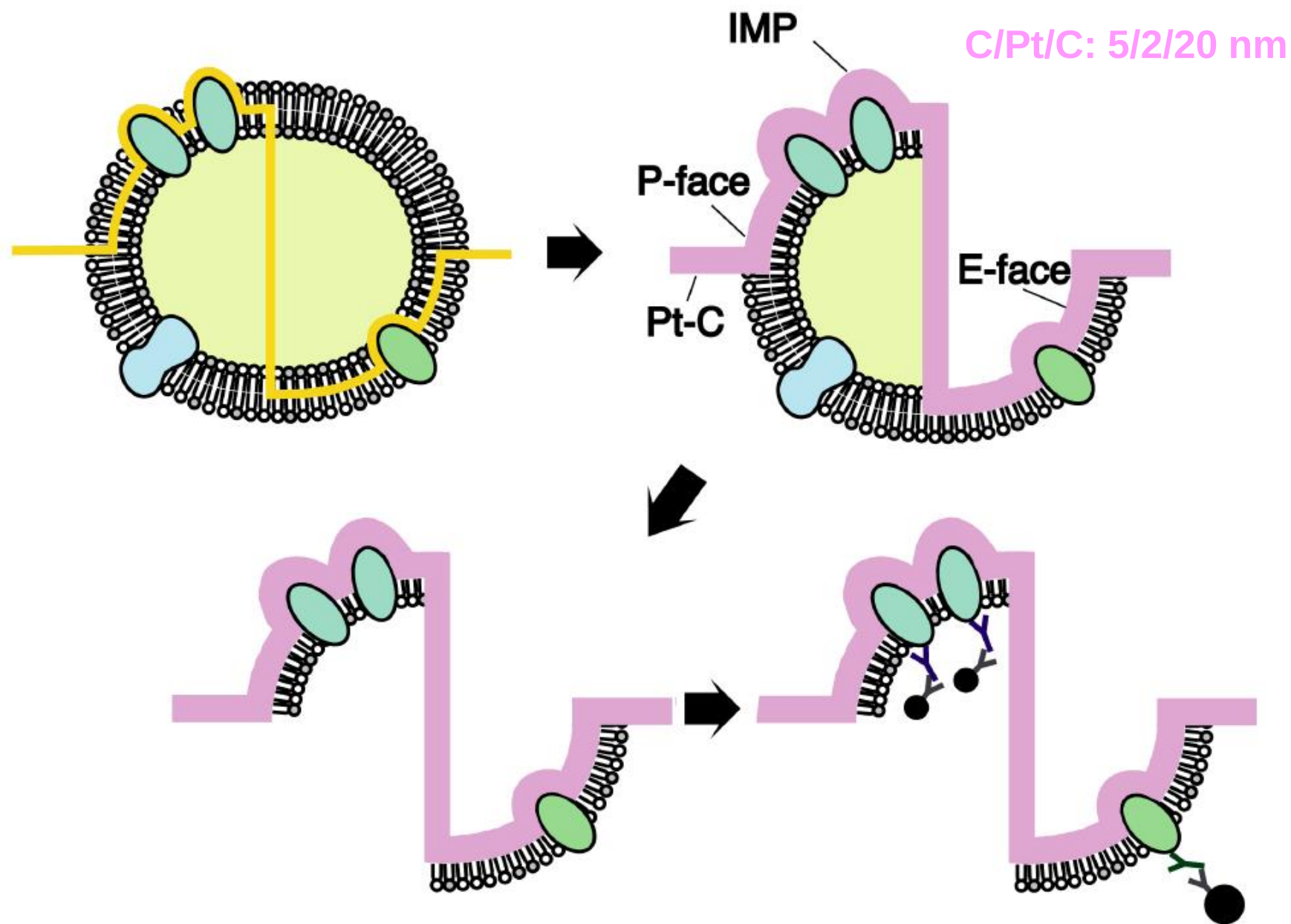
SDS-emésztett fagyasztva tört replica immunjelölés (SDS-FRL)



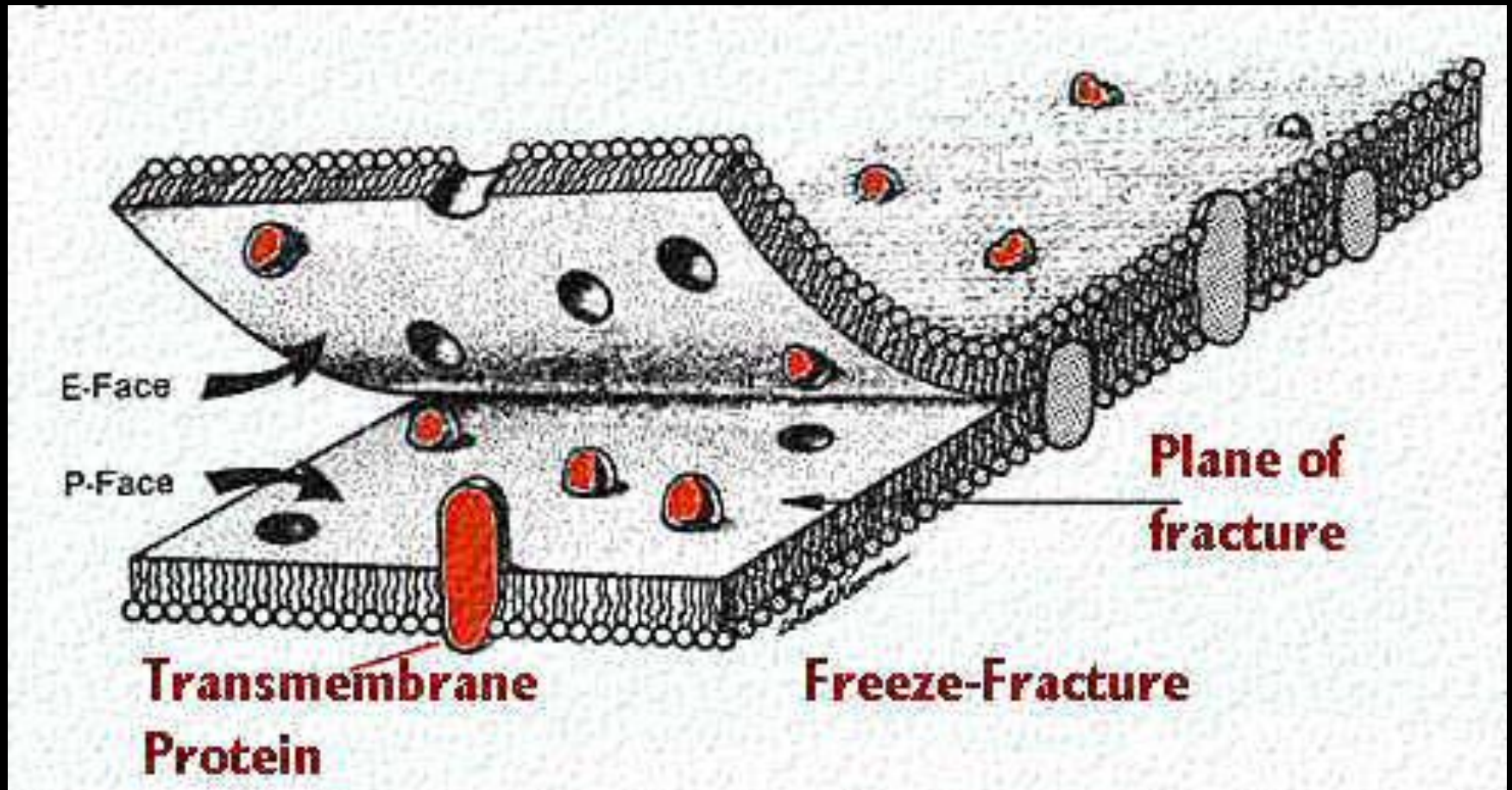




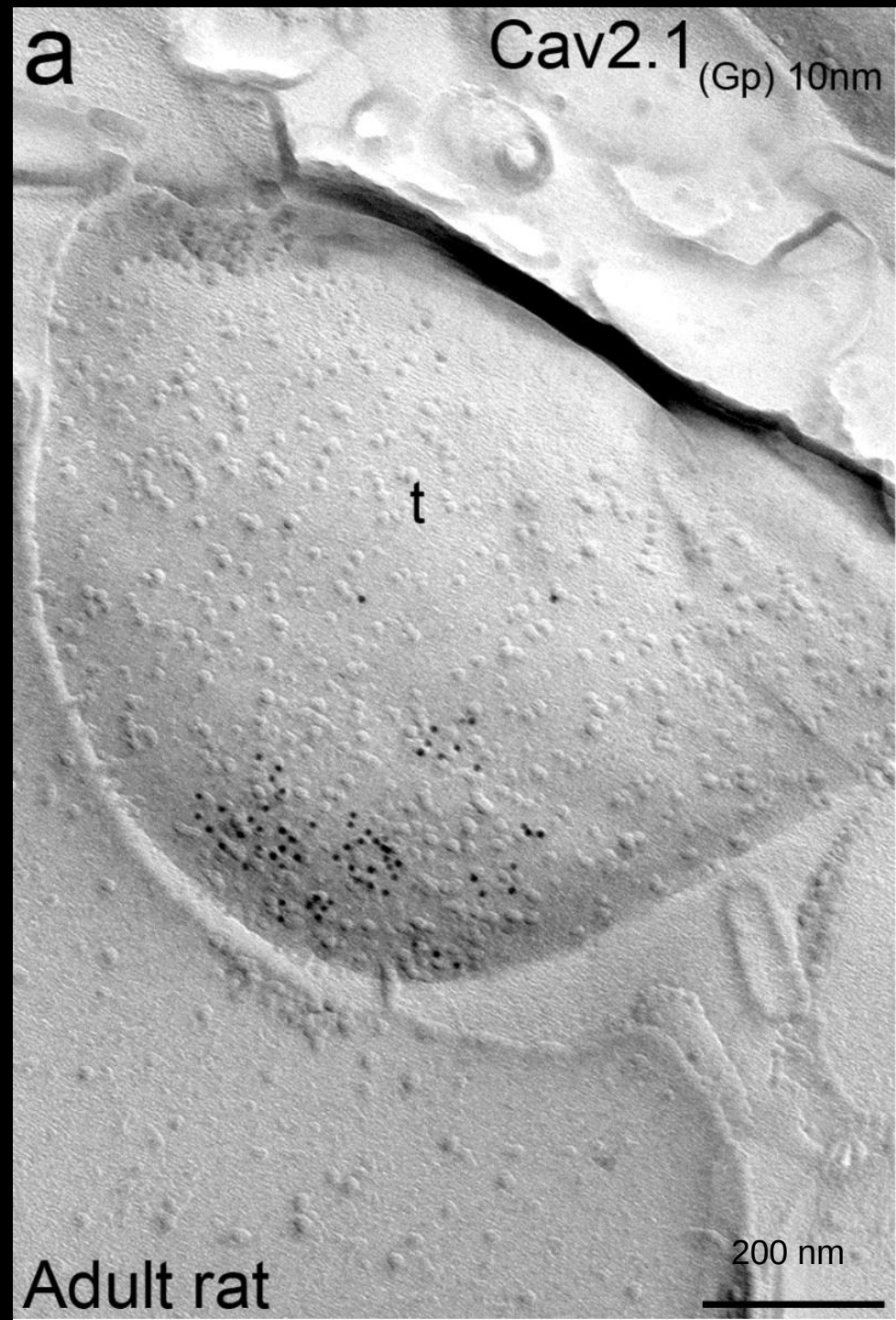


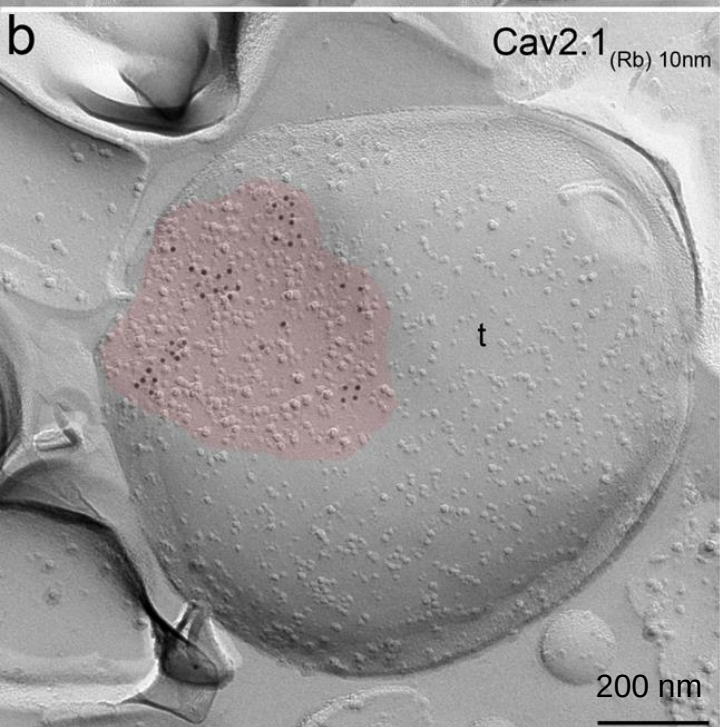


Fagyasztva tört replika jelölés (SDS-FRL)

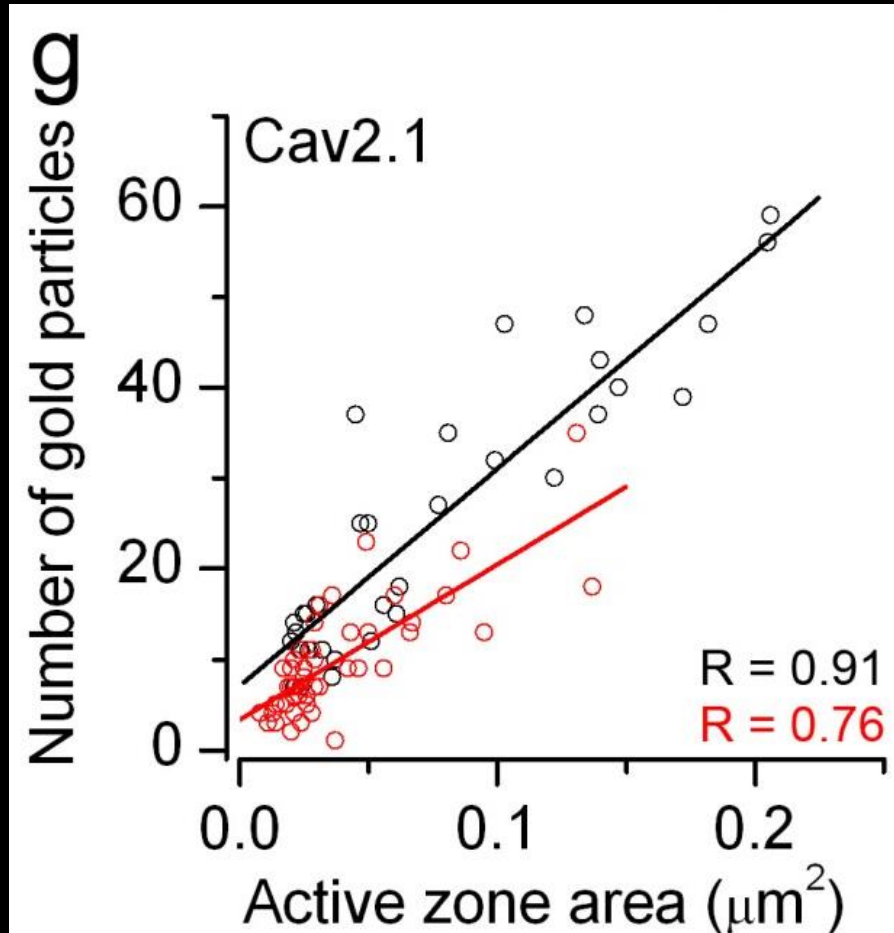


A feszültség-függő Ca^{2+}
csatorna Cav2.1-es alegység
az axon terminálisok aktív
zónájában található meg





A Cav2.1-es alegységek száma pozitív lineáris korrelációt mutat az aktív zónák méretével



Konklúzió

Kvantitatív molekuláris különbségek felelősek a
hippokampális serkentő szinapszisok funkcionális
sokszínűségéért.

Az eddigi munkáinkban indirekt módszert használtunk arra, hogy a funkciót összehasonlítsuk a szinapszisok molekuláris összetételével.

Hogy tudnánk direkt módon meghatározni egy funkcionálisan megvizsgált szinapszis fehérje összetételét?

A funkcionális jellemzés után:

- Láthatóvá kell tenni a vizsgált sejtet és azon belül is meg kell találni a jellemzett szinapszist.
- Ezen a szinapszisok meg kell határozni nagyszámú fehérje mennyiségét (relatív elvileg elég).
- Majd korrelációt kell keresni bizonyos funkcionális paraméterek valamint a fehérjék mennyisége között.

Milyen módszerrel lehet ezt elérni?

- Fagyasztva-tört replika jelölés alkalmatlan erre. Azonosított struktúrák jelölése lehetetlen a törés random volta miatt.
- Beágyazás utáni immunjelölés potenciálisan jó: nincs diffúzió a szövetbe és minden szubcelluláris kompartmentben képes az ellenanyag hozzákapcsolódni a célfehérjéhez. Kvantitatív összehasonlítás lehetséges. Azonban, a módszer érzékenysége nem a legideálisabb.

Egy funkcionálisan jellemzett és feltöltött hippocampális CA1 piramissejt Epoxi gyantába való beágyazás után

