

Zárójelentés

Élettudományok/F046407

„Új lipid-szenzitív receptorok szerepe a kérgi neuronhálózatok működésében”

Dr. Katona István, MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet

A fiatal kutatói OTKA pályázat fő célkitűzése volt, hogy azonosítsa azt a lipid-szenzitív szignálrendszert, amely az agykérgi serkentő szinapszisok glutamáterg neurotranszmisszióját retrográd úton szabályozza. A projekt indulásakor (2004-ben) elérhető tudományos irodalom alapján egy új, addig nem azonosított, de feltételezhetően lipidek által mediált szignál útvonal felderítését tűztük ki célul. Kísérleti munkánk során azonban egy korábban nem elérhető antitest segítségével a pályázat második évében sikerült bizonyítanunk, hogy - szemben az akkor általánosan elfogadott nézettel - a CB₁ kannabinoid receptor, amely addig csak a GABAerg szinapszisokból volt ismert, megtalálható a glutamáterg szinapszisokban is. Ezzel párhuzamosan felfedeztük, hogy az egyik endokannabinoid molekulát, a 2-arachidonoylglycerol-t szintetizáló enzim, a diacylglycerol lipase-alpha, a serkentő szinapszisok posztzinaptikus denzitása körül periszinaptikusan helyezkedik el. Ezeket az eredményeinket a Nature Reviews Neuroscience 2006. júliusában a hónap egyik legfontosabb felfedezéseként méltatta és az eredményekről beszámoló publikáciánk 2006-os megjelenése óta „Highly Cited” minősítést kapott az ISI-től. A téma jelentőségének megfelelően ezért kutatási kapacitásaink nagy részét ennek a szignálrendszernek a részletes vizsgálatára összpontosítottuk további munkánkban. Eredményeink 11 nemzetközi folyóiratban publikált cikkben és 1 hazai, angol nyelvű folyóiratban jelentek meg. A részletes zárójelentésben eredményeinket ezekre a tanulmányokra alapozva tematikusan csoportosítva mutatjuk be. Az egyes hivatkozott tanulmányok a beszámoló végén található irodalomlistában találhatóak, természetesen valamennyi publikáción szerepel az OTKA támogatása is.

I. Az endokannabinoid rendszer molekuláris felépítése a központi idegrendszer glutamáterg szinapszisaiban

Az endokannabinoid molekulák lipidszármazékok, amelyek az idegsejtek sejthártyájában található hosszú szénláncú többszörösen telítetlen zsírsavszármazékokat tartalmazó foszfolipidekből keletkeznek több enzimatikus lépésen keresztül. Az elsőként felfedezett anandamid mellett úgy tűnik, hogy egy másik, később felismert endokannabinoid, a 2-arachidonoylglycerol (2-AG) még jelentősebb élettani szerepet tölt be. Az anandamidnál 160-szor nagyobb mennyiségben termelődik az agyban és valószínűleg ez az endokannabinoid a klasszikus CB₁ receptor elsődleges endogén ligandja, mivel teljes agonistaként viselkedik, szemben az anandamiddal, amely parciális agonista. A 2-AG pontos keletkezési helye az idegrendszerben azonban korábban teljesen ismeretlen volt. In situ hibridizációs kísérleteinkben feltártuk, hogy a diacylglycerol lipase-alpha (DGL- α) gén, amely a 2-AG legfontosabb szintetizáló enzime, elsősorban a principális sejtípusokban expresszálódik a hippocampusban (11). Két független antitest segítségével (amelyek specificitását DGL- α knockout egérben is igazoltuk) immuncitokémiai kísérletekben kimutattuk, hogy az elkészült enzimfehérje a principális sejtek felszínén található dendrittüskék fejében koncentrálnak (11). Nagy felbontású, immunarany jelölést használó elektronmikroszkópos analízisben feltártuk, hogy ez az endokannabinoidot szintetizáló enzim speciálisan a posztzinaptikus denzitás oldalán helyezkedik el egy periszinaptikus gyűrűben (11). További immuncitokémiai kísérleteinkben pedig közvetlen bizonyítékot szolgáltatunk arra, hogy a CB₁ kannabinoid receptor preszinaptikusan megtalálható a hippocampális glutamáterg axon terminálisokon (11). A szintetizáló enzim posztzinaptikus lokalizációja és a receptor preszinaptikus pozíciója alátámasztja a korábbi élettani kísérletekből származó eredményeket, amelyek arra utaltak, hogy a 2-AG retrográd hírvivőként játszik szerepet a glutamáterg szinapszisaiban.

A 2-AG szignál útvonal fenti molekuláris és anatómiai szerveződése arra utal, hogy a 2-AG egy negatív visszacsatolási folyamatban játszhat szerepet a serkentő szinapszisaiban. Számos élettani kísérlet igazolta 2006-ban egymással párhuzamosan, hogy a CB₁ receptor aktiválása csökkenti a glutamát felszabadulását az axon

terminálisokból. Ez azt sugallja, hogy az endokannabinoid rendszer is potenciálisan érintett lehet olyan idegrendszeri megbetegedésekben, ahol a glutamát excitotoxicitás szerepet játszhat. Ezért az Országos Idegsebészeti Tudományos Intézet sebészeivel kollaborációban megvizsgáltuk, hogy az endokannabinoid rendszer működésében van-e változás temporális lebeny eredetű epilepsziás betegek hippocampusában (1). Komparatív expressziós vizsgálatainkban kiderült, hogy a CB₁ receptor mRNS-ének szintje a kontroll értékek harmadára zuhan az epilepsziás hippocampusban (1). Ezzel párhuzamosan csökkenést tapasztaltunk a DGL- α és a CRIP1a, a CB₁ receptor horgonyzó fehérjéjének expressziós szintjében is, ugyanakkor a DGL- β és a másik endokannabinoid molekula, az anandamid metabolikus enzimeinek mRNS mennyisége nem változott meg (1). További immuncitokémiai vizsgálataink és kvantitatív elektronmikroszkópos analízisünk feltárta, hogy ez a látványos csökkenés a CB₁ receptor fehérjeszintjében is bekövetkezik. Fontos ugyanakkor kiemelni, hogy a CB₁ receptor kizárólag a serkentő szinapszist formáló glutamáterg axon terminálisokból tűnt el, a GABAerg terminálisokon nem változott meg a mennyisége (1). Ezek az eredmények rendkívül jelentősek, mivel rámutatnak, hogy az endokannabinoid rendszer érintett egy olyan kórelletani folyamatban, amelyben a serkentő szinapszisok egy endogén csillapító mechanizmusa sérül, ezzel feltehetően hozzájárulva az epilepsziás neuronhálózatok magasabb excitabilitási szintjéhez (1).

További kísérleteinkben célul tűztük ki, hogy felderítsük, vajon az endokannabinoid rendszernek ez a jellegzetes molekuláris architektúrája mennyire általános tulajdonsága a központi idegrendszer serkentő szinapszisainak. Kísérleteinkben olyan agyterületekre fókuszáltunk, amelyek a kannabinoidok viselkedésre gyakorolt markáns hatásainak hátterében állhatnak. Számos agyterület esetében jelenleg is folyamatban vannak kísérleteink, közülük első megjelent munkáink (amelyek részben nemzetközi kollaborációban készültek) az agyi jutalmazórendszerben kiemelt szerepet játszó agyterületeken vizsgálták az endokannabinoid rendszer felépítését a serkentő szinapszisokban. In situ hibridizációs és immuncitokémiai kísérleteink egy nagyon hasonló neuroanatómiai képet tártak fel a középagyi ventrális tegmentális area (VTA) (3), a striatum (4) és a nucleus accumbens (7) területén. Kettős immunfestésekben kimutattuk, hogy a 2-AG-t szintetizáló DGL- α szintén a szinapszisok szélén

posztzinaptikusan fordul elő a VTA dopaminerg neuronjainak dendritjein, valamint a striatum és a nucleus accumbens GABAerg közepesen tüskés neuronok túskefejeiben. A CB₁ receptort minden esetben preszinaptikusan figyeltük meg a hippocampusban tapasztaltakhoz hasonlóan (3, 4, 7). Ezek az eredmények alapjául szolgálhatnak annak a megfigyelésnek, hogy az endokannabinoid rendszer működése szerepet játszik valamennyi addiktív potenciállal rendelkező kémiai anyag hatásának létrejöttében. Az addikció neurobiológiai alapjairól és az endokannabinoid rendszer szerepéről a fiatal kutatói OTKA pályázat témavezetője két könyvfejezetet írt, amelyek egy kábítószer-megelőzéssel foglalkozó szakkönyvben (Katona, 2006, Ifjú-kór) és egy új egyetemi tankönyvben (Katona, 2007, Az addiktológia alapjai I.) jelentek meg, valamint számos hazai drogmegelőzési konferencián és továbbképzésen tartott előadást a témáról.

Az endokannabinoid rendszer általános elterjedése a központi idegrendszer serkentő szinapszisaiban arra utal, hogy az endokannabinoidok számos más kóreltani folyamatban is szerepet játszhatnak a szenvedélybetegségek és az epilepszia mellett. Egy harmadik példa a nocicepció, több kutatócsoport igazolta korábban, hogy a 2-AG és a CB₁ receptor fontos élettani szerepet játszik a fájdalomérző pályák számos szinaptikus állomásán. Kísérleteinkben a pályázati munkatervben szereplő EGFP-vel taggelt CB₁ receptorokat készítettük el és hoztunk létre tranziensen transzfektált HEK293 sejtvonalakat (5). Az egyik sejtvonal segítségével német kollaborátorainkkal közösen sikerült igazolnunk, hogy egy GASP-1 nevű interakciós fehérje a lizoszomákba továbbítja a CB₁ receptort hosszan tartó agonista aktiváció hatására (5). A német kollaborátorok további in vivo fájdalomtesztekben feltárták, hogy ez a molekuláris mechanizmus játszik szerepet a tartós kannabinoid kezelés okozta toleranciában a fájdalomérzékelés során (5).

II. Az endokannabinoid rendszer szerepe az agykéreg GABAerg szinapszisainak működésében

A CB₁ kannabinoid receptor preszinaptikus lokalizációját elsőként csoportunk írta le 1999-ben, ebben az esetben hippocampális GABAerg axon terminálisokon sikerült kimutatnunk a receptort. Ezzel párhuzamosan 2001-ben ugyanezekben a szinapszisokban

mutatták ki amerikai és japán kutatócsoportok az endokannabinoidok retrográd hírvivő szerepét. Ezért számos kísérletben tovább vizsgáltuk, hogy vajon az endokannabinoid rendszer hogyan befolyásolja a GABAerg szinapszisok működését az agykéregben. Első kísérletsorozatunk célkitűzése volt, hogy felderítsük a CB₁ kannabinoid receptor celluláris és szubcelluláris lokalizációját, illetve élettani szerepét a neocorticális neuronhálózatokban (12). Kiderítettük, hogy két interneurontípus expresszálja a receptort, a cholecystokinin- és a calbindin-pozitív GABAerg sejtek (12). A receptor preszinaptikusan fordult elő, ahol csökkentette a GABA felszabadulását az axon terminálisokból (12). Kiderült az is, hogy az V. rétegbeli piramis sejtek heterogének CB₁-szenzitív bemenetük tekintetében (12).

A fenti kísérletek már érett, felnőtt neuronhálózatokban vizsgálták az endokannabinoid rendszer felépítését. Felmerült azonban a kérdés, hogy ha ez a kémiai szignálrendszer ilyen mértékben elterjedt az idegrendszerben, akkor vajon játszhat-e szerepet már embrionális korban is a fejlődő agy kapcsolatrendszerének kialakulásában. Ennek a kérdésnek a vizsgálatát egy nemzetközi konzorcium tagjaként végeztük (10). A kísérletek egérembriókban bebizonyították, hogy már embrionálisan, néhány nappal a születés előtt a kannabisznövény hatóanyagának idegrendszeri célpontja, a CB₁ kannabinoid receptor megtalálható az axonok növekedési kúpján és aktiválása megváltoztatja az anyaméhben fejlődő embrió agyában kialakuló GABAerg idegsejtek kapcsolatrendszerét a növekedési kúp összeomlása miatt. A további kísérleteinkben feltártuk ennek molekuláris mechanizmusait és neuroanatómiai alapjait. Ez az eredmény tudományos alapot szolgáltat arra a (józan ésszel is belátható) szabályra, hogy terhes édesanyáknak miért szigorúan tilos bármilyen kannabisz-tartalmú anyag fogyasztása.

Hippocampális GABAerg szinapszisok további vizsgálata során kiderítettük, hogy az endokannabinoid rendszer mellett egy másik, régóta ismert retrográd hírvivő rendszer, a nitrogén-monoxid (NO)-szolubilis guanilátcikláz (sGC)-cGMP kaszkád molekuláris elemei is megtalálhatóak GABAerg szinapszisokban (6, 8). Igazoltuk, hogy a neuronális NOS izoforma a hippocampális piramis sejtek sejttestén periszomatikus lokalizációban található GABAerg szinapszisokban posztzinaptikusan fordul elő (6). Ezzel szemben az NO egyik receptora, az sGC α 1 alegysége preszinaptikusan fordul elő a GABAerg axon terminálisokban (6). További kísérletekben kimutattuk, hogy az NO donor nátrium-

nitroprusside hatására keletkező cGMP elsősorban a CB₁-pozitív GABAerg axon terminálisokban akkumulálódik (8). Élettani vizsgálatokban pedig bizonyítottuk az NO és az endokannabinoid rendszer szinergesztikus hatását a GABAerg neurotranszmisszióra (8).

Végül, de nem utolsósorban a pályázati periódus utolsó évében a periszomatikus gátlás és az endokannabinoid rendszer kutatásában kapott eredményeink alapján a Neuron folyóirat felkérésére egy összefoglaló tanulmányt írtunk az agykéregi periszomatikus gátlás élettani és kórélettani szerepéről (9).

III. Új utakon az endokannabinoidok a szinapszisokban

Az elmúlt években végzett kísérleteink hozzájárultak, hogy az egyik endokannabinoid molekula, nevezetesen a 2-AG retrográd szinaptikus szignál szerepének molekuláris, anatómiai és élettani háttere feltáruljon és számos munkában világítottunk rá kórélettani jelentőségére is. Felmerült azonban, hogy mi lehet a többi endokannabinoid molekulának, például az elsőként felfedezett anandamidnak és kémiai rokonainak, a többi bioaktív N-acylethanolamin (NAE) molekuláknak az élettani feladata. Ebben a kutatási irányban az első lépést a pályázat utolsó évében tettük, amikor sikerült felderítenünk a NAPE-PLD enzim regionális, celluláris és subcelluláris lokalizációját (2). Ez az enzim az anandamid és a rokon NAE molekulák egyik szintetizáló enzime, tehát a pozíciójának azonosítása közelebb vihet bennünket egy új szignál útvonal kiinduló pontjához. In situ hibridizációs kísérleteink alapján számos idegsejt típus expresszálja a NAPE-PLD-t az agyban, de legnagyobb mennyiségben a gyrus dentatus szemcsesejtjeiben található meg (2). További immuncitokémiai kísérleteink alapján a NAPE-PLD fehérje az axon terminálisokban akkumulálódik, de szemben a 2-AG-t szintetizáló DGL- α -val nem a plazmamembránon, hanem intracelluláris membránciszternákon található (2). Ezeknek az eredményeknek számos fontos következménye van. Egyrészt arra utalnak, hogy a 2-AG-hoz hasonlóan az anandamid és a rokon NAE molekulák szintén szinaptikus szignálmolekulák. Másodsorban ugyanakkor kizárják azt, hogy az anandamid a 2-AG-hoz hasonlóan retrográd útvonalban vegyen részt, inkább egy anterográd vagy intracelluláris szignálfolyamat hírvivője lehet. Harmadsorban fontos kiemelni, hogy a

hippocampális szemcsesejtek axonján nem található CB₁ receptor (a szemcsesejtek a CB₁ mRNS-ét sem termelik), tehát az anandamid receptora valószínűsíthetően nem a CB₁ receptor. Végül, de nem utolsósorban a NAPE-PLD enzim aktivitásához kalciumra van szüksége, tehát az enzim lokalizációja az axonális kalciumraktárakon arra utal, hogy ezeknek a raktáraknak a működése élettani kapcsolatban áll az anandamid által mediált szignál útvonallal. A következő években ennek az útvonalnak további molekuláris elemeit és az élettani, valamint kórélettani jelentőségét igyekezünk felderíteni.

Irodalomlista

1. Ludányi A, Erőss L, Czirják S, Vajda P, Halász P, Watanabe M, Palkovits M, Maglóczky Z, Freund TF, Katona I. (2008) Down-regulation of the CB₁ cannabinoid receptor and related molecular elements of the endocannabinoid system in epileptic human hippocampus. *Journal of Neuroscience*, in press.
2. Nyilas R, Dudok B, Urbán GM, Mackie K, Watanabe M, Cravatt BF, Freund TF, Katona I. (2008) Enzymatic machinery for endocannabinoid biosynthesis associated with calcium stores in glutamatergic axon terminals. *Journal of Neuroscience*, 28: (5) 1058-1063.
3. Mátyás F, Urbán GM, Watanabe M, Mackie K, Zimmer A, Freund TF, Katona I. (2008) Identification of the sites of 2-arachidonoylglycerol synthesis and action imply retrograde endocannabinoid signaling at both GABAergic and glutamatergic synapses in the ventral tegmental area. *Neuropharmacology*, 54: 95-107.
4. 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. *Journal of Neuroscience*, 27: 3663-3676.

5. Tappe-Theodor A, Agarwal N, Katona I, Rubino T, Martini L, Swiercz J, Mackie K, Monyer H, Parolaro D, Whistler J, Kuner T, Kuner R. (2007) A molecular basis of analgesic tolerance to cannabinoids. *Journal of Neuroscience*, 27: 4165-4177.
6. Szabadits E, Cserep C, Ludanyi A, Katona I, Gracia Llanes J, Freund TF, Nyiri G. (2007) Hippocampal GABAergic synapses possess the molecular machinery for retrograde nitric oxide signaling. *Journal of Neuroscience*, 27: (30) 8101-8111.
7. Mátyás F, Watanabe M, Mackie K, Katona I, Freund TF. (2007) Molecular architecture of the cannabinoid signaling system in the core of the nucleus accumbens. *Ideggyógyászati Szemle*, 60: 187-191.
8. Makara JK, Katona I, Nyiri G, Nemeth B, Ledent C, Watanabe M, de Vente J, Freund TF, Hajos N. (2007) Involvement of nitric oxide in depolarization-induced suppression of inhibition in hippocampal pyramidal cells during activation of cholinergic receptors. *Journal of Neuroscience*, 27: (38) 10211-10222.
9. Freund TF, Katona I. (2007) Perisomatic inhibition. *Neuron*, 56: (1) 33-42.
10. Berghuis P, Rajnicek AM, Morozov YM, Ross RA, Mulder J, Urbán GM, Monory K, Marsicano G, Matteoli M, Canty A, Irving AJ, Katona I, Yanagawa Y, Rakic P, Lutz B, Mackie K, Harkány T. (2007) Hardwiring the brain: Endocannabinoids shape neuronal connectivity. *Science*, 316: 1212-1216.
11. Katona I, Urbán GM, Wallace M, Ledent C, Jung KM, Piomelli D, Mackie K, Freund TF. (2006) Molecular composition of the endocannabinoid system at glutamatergic synapses. *Journal of Neuroscience*, 26: 5628-5637.
12. Bodor AL, Katona I, Nyíri G, MacKie K, Ledent C, Hájos N, Freund TF. (2005) Endocannabinoid signaling in rat somatosensory cortex: laminar differences and involvement of specific interneuron types. *Journal of Neuroscience*, 25: 6845-6856.