

PhD tézis

Az ösztrogén gyors hatása az AMPA receptorok mozgására: egyedi molekula detekciós vizsgálatok

Godó Soma

PhD témavezetők:

Prof. Dr. Ábrahám István

Dr. Barabás Klaudia

Phd Programvezető: Prof. Dr. Reglődi Dóra



Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Élettani Intézet

Pécs

2022

1. Bevezetés

1.1. 17 β -ösztrogén

Az ösztrogének gonadális szteroid hormonok melyek alapvető szerepet játszanak a reprodukív rendszerben azonban fontos a jelenlétük a csontképződés, szív-érrendszer működése, lipid anyagcsere és az idegrendszer számára is. (Ábrahám et al., 2009)

E2 elsősorban a petefészekben termelődik a menopauza előtti időszakban nőkben. A termelt E2 bekerül a vérkeringésbe ahol nemi hormon kötő fehérjékhez kapcsolódva szállítódik. Az E2 termelést a hipotalamusz-hipofízis-gonád tengely szabályozza. Az E2 nemcsak a petefészekben hanem az agyban is termelődik. Az E2 termelés utolsó enzimének az aromatáz enzim jelenlétét többek között kimutatták a hippokampuszban, amygdalában és a kéregben is. Aromatáz aktivitás és a neuroszteroid E2 szerepet játszik több élettani folyamatban mint például az idegfejlődés, szinaptikus plaszticitás, tanulás és a kognitív funkciók. Aromatáz aktivitás csökkenése jelen van az Alzheimer betegségben és az autizmusban is.

1.2. Ösztrogén receptorok

Az első ösztrogén receptort (ER), az ösztrogén receptor α -t (ER α) 1958-ban írták le először és a ligand aktivált sejtmagi receptorok családjába sorolták. ER α N-terminális domainből, DNS kötő domainből, összekötő domainből, ligand kötő domainből és C-terminális domainből épül fel. Három további izoformáját írták le, kettőnek hiányzik az N-terminális domainja ami csökkenti a receptor autoaktivációs képességét.

A második ER-t mely az ösztrogén receptor β (ER β) nevet kapta, 1996-ban sikerült először kimutatni. Ez a receptor is a ligand aktivált sejtmagi receptorok családjába tartozik és ugyanazokból a domaineiból épül fel mint az (ER α). Eddig 5 rövidebb izoformáját azonosították. Ezek az izoformák nem tudnak ligandot kötni és nincsen transzkripcionális hatásuk viszont képesek dimert alkotni az ER α -val amivel csökkentik annak a hatékonyságát. (Heldring et al., 2007)

1997-ben egy G-protein kapcsolt receptort fedeztek fel olyan sejtekben amik E2 érzékenyek voltak. (Carmeci et al., 1997; Thomas et al., 2005). GPER1 egy 7 transzmembrán receptor és a sejtembránban illetve az endoplazmatikus retikulumban található. E2 kisebb affinitással kötődik a GPER1-hez mint az ER α -hoz és a ER β -hoz

azonban a ligand kötés és elengedés sokkal gyakrabban történik meg. (Filardo és Thomas, 2012)

1.3. Klasszikus ösztrogén útvonal

A szabad hormon hipotézis elmélet szerint az E2 mint lipofil molekula diffúzióval a sejtmembránon keresztül jut be a sejtplazmába ahol kötődik a klasszikus genomiális receptorokhoz. Azonban több tudományos cikk is kimutatta, hogy az E2 felvételt specifikus transzport fehérjék irányítják. (Hammond és Bocchinfuso, 1995; Hammes et al., 2005) A klasszikus vagy genomiális E2 hatás alatt az ER α vagy az ER β ligand aktivált transzkripciósfaktorként viselkedik. (Marino et al., 2006) E2 kötődés után az ER-ok dimerizálódnak és a sejtmagba szállítódnak. (Le Dily and Beato, 2018) A sejtmagban az ER α és az ER β dimerek a célgének promóter régióihoz (Estrogen Responsive Elements; ERE) kapcsolódnak. ERE régiók a genom számos területén megtalálhatóak olyan proteinek kódoló génekhez kapcsolódva amelyek szerepet játszanak a szaporodásban, érrendszer kialakulásában illetve az idegrendszer fejlődésében és működésében. (Bourdeau et al., 2004)

1.4. Nem-klasszikus ösztrogén útvonal

E2 számos sejtleletani folyamatot befolyásol amit nem lehet a magyarázni a lassú klasszikus útvonallal. Ez utal arra, hogy létezik egy másik E2 útvonal amely direkt DNS kötődés nélkül képes modulálni különböző jelátviteli útvonalakat és génexpressziót. (Vrtačnik et al., 2014)

Az első bizonyítékot a nem-klasszikus útvonal meglétére Szegő és Davis szolgáltatta 1967-ben. Kísérletükben patkány méhben a cAMP szintje kétszeresére nőtt kevesebb mint egy perccel az E2 injekció után. Azóta számos kutatócsoport leírt nem-klasszikus E2 hatásokat. (Fujimoto és Kitamura, 2004; Glidewell-Kenney et al., 2007; McDevitt et al., 2008; Rudolph et al., 2016) A nem-klasszikus hatásokat főleg a GPER1 és a membrán asszociált ER α és ER β indítja el. E2 képes megváltoztatni ion csatornák működését (Kelly and Rønnekleiv, 2009), befolyásolni a sejtmembrán fizikai tulajdonságait (Kumar et al., 2011) vagy indukálni különböző jelátviteli útvonalakat vagy másodlagos hírvivő molekulákat mint a foszfolipáz C (Marino et al., 1998), adenyl cikláz, protein kináz A (PKA), (Gu and Moss, 1996) protein kináz C (PKC) (Marino et al., 1998), a foszfatidil

inozitol 3 kináz A kaszkád, az ERK útvonal (Dos Santos et al., 2002), az intracelluláris Ca^{2+} és cAMP szint. (Björnström and Sjöberg, 2005) Ezek a mechanizmusok végül génexpressziós változásokhoz fognak vezetni.

1.5. Glutamáterg neurotranszmisszió

Glutamát egy neurotranszmitter amely alapvető szerepet játszik a serkentő szinapszisokban. (Izquierdo, 1994) A glutamáterg neurotranszmisszió elengedhetetlen mechanizmusa szinte az összes érzékelő és mozgató funkciónak, idegrendszeri fejlődésnek, emlékképződésnek és kognitív képességeknek. (Niciu et al., 2012) A központi idegrendszerben az extra és intracelluláris glutamát szint nagy pontossággal van szabályozva több mechanizmus által. Ezek irányítják a glutamát expresszióját és kiürítését a szinapszisban illetve az elszállítását és lebontását.

A glutamát nem képes átlépni a vér-agy gátat ezért az agy saját maga állítja elő glükózból. A termelt glutamátot vezikuláris glutamát transzporterek szállítják a preszinaptikus oldalra ahol kiürülnek a szinaptikus részbe. Amikor az akciós potenciál glutamát kiürülést indukál a glutamátot tartalmazó vezikulumok egyesülnek a preszinaptikus membránnal. Majd a glutamát molekulák átdiffundálnak a szinaptikus résen és a posztzinaptikus membránban lévő receptorokhoz kapcsolódnak. (Pang and Südhof, 2010)

1.6. Glutamát receptorok

1.6.1. Metabotróp glutamát receptorok

Metabotróp glutamát receptorok (mGluR) a hét transzmembrán domainnel rendelkező receptorok családjába tartoznak. A legtöbb mGluR a szinapszisok aktív területén kívül helyezkednek el azonban megtalálhatóak glia sejteken is. Ezek a receptorok lassan reagáló receptorok és membrán kötött G-fehérjéket aktiválnak amik intracelluláris Ca^{2+} emelkedést vagy protein kináz A és C foszforilációt váltanak ki. (Niciu et al., 2012) Ezek a folyamatok precízen irányítják a serkentő és gátló szinapszisokat illetve segítik a szinapszis fejlődését. (Lesage és Steckle, 2010)

1.6.2. Ionotróp glutamát receptorok

Ionotróp glutamát receptorok ligandvezérelt ioncsatornák melyek glutamát hatására aktiválódnak. Ezek a receptorok a gyorsan reagáló alkotóelemei a legtöbb serkentő szinapszisnak. Az ionotróp glutamát receptorokat három kategóriába soroljuk a szelektív agonistájuk alapján: N-methyl-D-aspartate (NMDA), α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA) és kainát.

Az AMPA receptorok heterotetramer ioncsatornák amelyek a poszt és periszinaptikus területeken helyezkednek el és a preszinaptikus glutamát ürülés utáni gyors posztszinaptikus válaszáért felelősek. (Diering and Huganir, 2018) Négy AMPA alegység (GluA1-4) alkot egy AMPA ioncsatornát. A leggyakoribb AMPA alegység neuronokban a GluA2 ami GluA1 vagy GluA3-al alkot dimert. (Wenthold et al., 1996) Az AMPA ioncsatorna fő tulajdonságait az alegység összetétele de legfőképp a GluA2 alegység megléte határozza meg. GluA2 tartalmú receptor Ca^{2+} -t nem eresztenek át és lassú záródási kinetikát mutat. Azok az AMPA receptorok amik nem tartalmaznak GluA2 alegységet Ca^{2+} áteresztőek és gyors záródási kinetikát mutatnak.

Glutamát kötődésre az AMPA receptorok gyorsan nyitnak majd Na^+ , K^+ és Ca^{2+} áramlik át rajtuk egy rövid ideig (Collingridge et al., 2004; Traynelis et al., 2010). Ennek hatására a membrán depolarizálódik és ha a töltéskülönbség eléri a küszöbértéket akciós potenciál alakul ki. Ezután az AMPA receptor deaktiválódik és deszenzitizálódik.

A glutamát receptorok száma, típusa és lokalizációja a szinapszis aktív területén nem állandó. Glutamát receptorok gyors átrendeződése hozzájárul a szinapszis kialakulásához, fejlődéséhez, normális működéséhez illetve a szinaptikus plaszticitás alapjául szolgál. (Diering és Huganir, 2018)

1.7. Szinaptikus plaszticitás

A felnőtt agy egyik legkomplexebb tulajdonsága a szinaptikus plaszticitás, a képesség, hogy külső és belső hatásokhoz alkalmazkodjon. Először Eric Kandel írta le ezt a jelenséget aki tengeri csigán figyelte meg, hogy a tanulás hatására megerősödnek a már meglévő szinapszisokat. (Castellucci et al., 1970) Szinaptikus plaszticitást sejt és molekuláris szintű változások és interakciók összességéként írhatjuk le. A legnagyobb mértékű változás a már

meglévő szinapszisok megerősödése vagy gyengülése. Ez a folyamat lehet átmeneti (néhány ezred másodperces) vagy tartós (órák vagy napok) és alakítja, irányítja a viselkedést, tanulást és a kognitív funkciókat. Emellett a szinaptikus plaszticitás fontos a központi idegrendszer fejlődésében, ha a működése zavart szenved komoly neurológiai betegségek alakulhatnak ki.

1.7.1. Hosszú távú szinaptikus plaszticitás

Hosszú távú szinaptikus plaszticitás egy tartósan fennálló válasz egy külső vagy belső stimulusra. Ez a hatás a neuronális hálózat szintjén alakul ki és a tanulás és memóriaképződés alapjául szolgál. (Bliss and Gardner-Medwin, 1973; Fusi et al., 2005) A két leggyakoribb glutamát receptor az AMPA és NMDA az elengedhetetlen elemei a hosszú távú szinaptikus plaszticitásnak.

Hosszú távú szinaptikus depresszió (LTD) akkor alakul ki, ha percekig tartó alacsony frekvenciájú stimuláció éri a szinapszist. Ekkor posztszinaptikusan Ca^{2+} szint növekedés jelentkezik (Mulkey és Malenka, 1992) amit különböző kalcium vagy calmodulin függő foszfatázok aktivációja követ (Lisman, 1989) Ezen jelátviteli útvonalak aktivációja vezet az AMPA receptorok szinapsziszból való kivonásához. (Bredt és Nicoll, 2003; Malenka és Bear, 2004) Az AMPA receptorok a periszinaptikus területekre diffundálnak ahol chlatrin és dynamin mediálta endocitózissal a sejtbe jutnak. (Ashby et al., 2004; Groc et al., 2004)

Az LTP az egyik leggyakrabban vizsgált idegéletteni jelenség, amely bármelyik szinapszisban kialakulhat, hogy hatásával elensúlyozza az LTD-t. Hasonlóan az LTD-hez az LTP létrejöttéhez is felelős az NMDA és AMPA receptorok. LTP kialakulhat magas frekvenciájú tetánias stimulálás következtében, ami aztán depolarizálja a posztszinaptikus membránt és aktiválja az NMDA receptorokat. (Malenka, 1991) Ezzel a posztszinaptikus membrán aktív területén megnövekszik az AMPA receptorok száma. Az új AMPA receptorok a periszinaptikus területekről illetve endoszómákból származnak. Ezt a folyamatot a membrán alatti aktinhálózat irányítja, ennek a dinamikus és folytonos átrendeződése alapvető szereppel bír. (Hanley, 2014; Baglietto-Vargas et al., 2018) A megnövekedett AMPA receptor mennyiség miatt megnő a posztszinaptikus membrán depolarizációjának valószínűsége. Ezt a megnövekedett szinaptikus erősséget a proteinexpressziós változások fenntartják órákig vagy napokig is. (Citri és Malenka, 2008)

1.8. Transzmembrán fehérjék felszíni mozgása

Mivel az NMDA és AMPA receptorok membránfelszíni mozgása alapvető az LTP folyamatában sok tanulmány célozza meg a fehérjék membránbeli mozgását. Az egyedi molekula detekciós technikák fejlődésével a kutatók képesek vizsgálni az egyedi receptorok mozgását élő sejtekben. (Kusumi et al., 1993) A kutatások kimutatták, hogy a receptorok szabadon mozognak apró és körülhatárolt kompartmentekben és gyakran másik kompartmentbe ugranak. (Sako és Kusumi, 1994) Egy valószínű magyarázat a nem teljesen szabad mozgásra, az, hogy a fehérjék intracelluláris részei interakcióba lépnek a membrán alatt elhelyezkedő aktinhálózattal ami befolyásolja, kötöttebbé teszi a mozgásukat. Ezt az elméletet kerítés modellnek nevezték el, és arra utal, hogy az aktinszálak kerítésként viselkednek ezáltal kompartmenteket hoznak létre. A receptor egyik ilyen kompartmentből a másikba való átjutását hop diffúciónak hívják. (Kusumi et al., 1993) Az aktin által körülhatárolt területek 40 nm-től akár 300 nm-es átmérőjűek is lehetnek.

1.8.1. A glutamát receptorok mozgása a szinapszisokban

Az elmúlt évtizedben egyedi molekula detekciós módszerekkel jellemezték a glutamát receptorok mozgását a szinapszisokban. LTP során az AMPA receptorok szinaptikus és periszinaptikus területek közötti átrendeződése sokkal gyorsabb mint az NMDA receptorok laterális diffúziója. A szinapszis aktív zónájában az AMPA receptorok vagy mozdulatlanok vagy Brownian diffúziót mutatnak (Lee et al., 2017), miközben az extraszinaptikus AMPA receptorok szinte kizárólag Brownian diffúziót mutatnak és csak ritkán mozdulatlanok. (Borgdorff és Choquet, 2002) Ezek a mozgékony AMPA receptorok szolgálnak tartalékként, hogy LTP során belépjenek a szinapszisba ahol horgonyzófehérjék megkötik őket. (Triller és Choquet, 2005) Ez a tartalék aztán endoszómákban raktározott AMPA receptorokkal frissül meg.

1.9 Az E2 hatása a szinaptikus plaszticitásra

Az elmúlt évtizedekben több kutatás is leírta, hogy az E2 erősíti a glutamáterg neurotranszmissziót a hippocampusban. (Teyler et al., 1980; Maggi et al., 1989; Gould et

al., 1990; Wong és Moss, 1992) Ennek az élettani hatása ismeretlen volt mindaddig amíg fel nem fedezték, hogy az agy is termel ösztrogént mindkét nemben. (Roselli et al., 1985)

Az E2 szinaptikus plaszticitásra kifejtett hatása komplex és neuron specifikus feltételezhetően a neuronok különböző ER profilja miatt. (Kramár et al., 2009; Kumar et al., 2015) Az E2 hatás magában foglal pre és posztszinaptikus változásokat is. E2 megnöveli a glutamát kibocsátás valószínűségét és magasabb EPSC-t indukál. (Smejkalova és Wooley, 2010) A posztszinaptikus oldalon az E2 befolyásolja a dendritképződést, szinapszis méretét és a benne elhelyezkedő receptorok minőségét és mennyiségét. A szinapszis ingerületátvivő képessége megerősödik azáltal, hogy a periszinaptikus területekről AMPA receptorok kerülnek át az aktív területre. Összességében az E2 erősíti, stabilizálja az aktív szinapszisokat és gyengíti vagy lebontja az inaktív szinapszisokat. (Xie et al., 2007; Srivastava et al., 2008)

A glutamát receptorok folyamatos átrendeződése a szinapszisokban alapvető része az E2 szinaptikus plaszticitásra kifejtett hatásában, azonban élő sejtekben ennek a folyamatnak a pontos molekuláris mechanizmusát még nem ismerjük. Leírták már, hogy az E2 befolyásolja az NMDA receptorok mozgását és a glükokortikoidok az AMPA receptorok diffúziójára vannak hatással (Groc et al., 2008; Potier et al., 2016), azonban az E2 hatása az AMPA receptorok membránbeli mozgására mindaddig ismeretlen.

2. Célkitűzések

A jelen tanulmány fő célja, hogy jellemezze az E2 hatását a az AMPA és mGluR1 receptorok membránbeli mozgására, hogy jobban megértsük az E2 szerepét a szinaptikus plaszticitásban.

Célok:

- 1.** meghatározni az E2 hatását az AMPA és mGluR1 receptorok diffúziós koefficiensére differenciált PC12 sejteken
- 2.** leírni mely ER a felelősek az E2 hatás közvetítéséért
- 3.** jellemezni a membrán alatti aktinhálózat szerepét az E2 hatásban
- 4.** megmérni az E2 hatását az AMPA receptorok D értékére és a szinapszisban eltöltött időre primer hippocampális neuronokban

3. Eredmények

3.1. E2 gyorsan csökkenti az AMPA receptorok mozgását

A glutamát receptorok mozgását differenciált PC12 (dPC12) sejtek plazmamembránjában mértük meg. Mindkét receptor diffúziós koefficiense (D , $\mu\text{m}^2/\text{s}$) magasabb a sejtnyúlványon mint a sejttesten.

100 pM, 1 nM és 100 nM E2 kezelés dózisfüggően csökkentette a D_{AMPA} értéket a sejtnyúlványon a kezeléstől számított első 20 percen belül. A sejttesten a 100 pM E2 csökkenti a D_{AMPA} -t míg 1 nM és 100 nM hatástalan. Ennek ellenére E2 egyik koncentrációban sem változtatta meg az mGluR1 mozgását.

Az E2 hatás időbeli lefolyásának vizsgálatához megmértük a D_{AMPA} -t különböző időpontokban E2 kezelés után. 100 pM E2 5 percen belül csökkentette a D_{AMPA} -t a sejttesten, ez a hatás fennmaradt 10, 15 és 20 percnél is. Azonban a sejtnyúlványokon a 100 nM E2 hatása 10, 15 és 20 percnél volt mérhető. Ennek ellenére az 100 pM vagy 100 nM E2 egyik időpontban sem változtatta meg a D_{mGluR1} értéket.

3.2. Az E2 hatást a GPER1 és ER β közvetíti

PCR eredményeink alapján a dPC12 sejtek GPER1 és ER β -t expresszálnak, azonban ER α -t nem. Egyedül alkalmazva a GPER1 (G1; 100 nM) és ER β (DPN; 10 pM) agonista nem voltak hatással az AMPA receptorok mozgására a sejttesten, azonban a kettő agonista együttes alkalmazása csökkentette a D_{AMPA} -t hasonló mértékben mint a 100 pM E2. G1 hasonló hatást fejtett ki a D_{AMPA} -on mint 100 nM E2 DPN nélkül és a jelenlétében is. Azonban a DPN egyedül nem volt hatással a D_{AMPA} -t értékre a sejtnyúlványokon. GPER1 antagonist (G15, 1 μM) előkezelés megszüntette az E2 hatását mind a sejttesten és a nyúlványon is. A G15 önálló alkalmazása nem befolyásolta a receptorok D értékét.

Eredményeink azt mutatják, hogy a GPER1 irányítja az E2 AMPA receptorra kifejttet hatását mind a sejttesten és a nyúlványon is. A GPER1 és AMPA receptorok között lévő kölcsönhatás részletesebb vizsgálatához STORM szuperrezolúciós mikroszkópiát alkalmaztunk. A GPER1 mennyiségét normalizáltuk az AMPA receptorok számára (GPER1/AMPA). A szuperrezolúciós felvételek alapján a GPER1/AMPA arány magasabb a sejttesten mint a sejtnyúlványokon.

E2 alkalmazására a GPER1 rövid időn belül internalizálódik. (Filardo és Thomas, 2012) Ez az internalizáció lehet magyarázata az E2 különböző hatásának a sejttesten és a sejtnyúlványon. Annak érdekében, hogy megfigyeljük a GPER1 internalizációját E2 alkalmazása után STED szuperrezolúciós képalkotást alkalmaztunk. A felvételek alapján a GPER1 immunfestés intenzitása kétszer magasabb a sejtmembránban mint a sejtplazmában a vivőanyaggal kezelt dPC12 sejtekben. 100 nM E2 kezelés után 10 perccel a GPER1 immunfestés intenzitása lecsökkent a sejtmembránban. Ellenben a GPER1 molekulák nagy része a citoplazmában volt detektálható a 100 nM E2 kezelés után ami gyors internalizációra utal. A sejtnyúlványokban nem tapasztaltunk GPER1 internalizációt E2 kezelés után.

3.3. A kortikális aktinhálózat szerepe az E2 AMPA receptorok mozgására kifejtett hatásában dPC12 sejtekben

Kortikális aktinhálózat egy aktin fonalokból álló hálózat ami vékony rétegben rendeződik és közvetlenül a sejtmembrán alatt található. Ez a rendszer elengedhetetlen része az idegsejtek struktúrájának kialakításának és fontos szerepe van a membránreceptorok mozgásában is. (Schevzov., 2021) Ebből következtettünk arra, hogy az aktin hálózatnak lehet szerepe az E2 receptormozgásra kifejtett hatásában is. A szakirodalomban már leírták, hogy az E2 a GPER1-en keresztül serkenti az aktin szerkezet felépülését a ROCK-cofilin és a JNK-cofilin útvonalak befolyásolásával. (Wang et al., 2019; Kim et al., 2019). Annak érdekében, hogy meghatározzuk a kortikális aktin szerepét a dPC12 sejtekben blokkoltuk az aktin polimerizációját latrunculinA reagenssel (latA; 1 μ M). A ROCK-cofilin és JNK-cofilin útvonalak szerepének vizsgálatához ROCK inhibitor (GSK429285; 1 μ M) és JNK inhibitor (SP600125) alkalmaztunk.

Először ellenőriztük, hogy a latA, ROCK és a JNK inhibitorok befolyásolják-e a kortikális aktin struktúráját. Phalloidin immunfestéssel látható, hogy a kortikális aktin hálózat sűrűsége csökkent a latA és az inhibitorokkal történő kezelés után is dPC12 sejtekben. Az egyedi molekula detekciós kísérletekben 10 perc latA kezelés vagy az inhibitorokkal történő 60 perces előkezelés megnövelte a D_{AMPA} értéket, a sejttesten, azonban a sejtnyúlványokon nem tapasztaltunk változást. Az E2 D_{AMPA} -ra kifejtett hatását a latA illetve az inhibitorokkal való előkezelés is csökkentette mind a sejttesten és a sejtnyúlványon is.

3.4. E2 gyorsan csökkenti az AMPA receptorok diffúzióját és növeli a szinapszisban eltöltött idejét hippokampális neuronokban

Annak érdekében, hogy megerősítsük az E2 hatását az AMPA receptorok mozgására egy másik *in vitro* rendszerben is, primer hippokampális neuronokon végeztünk egyedi molekula detekciós vizsgálatokat.

Egyedi molekula detekcióval kimutattuk az AMPA receptorokat szinaptikus és extraszinaptikus területeken. Az AMPA receptorok D értéke alacsonyabb volt a szinapszisban mint az extraszinaptikus területen.

Mind a 100 pM és 100 nM E2 csökkentette a szinaptikus és extraszinaptikus AMPA receptorok D értékét. Hasonlóan az E2 hatáshoz, a szinapszisok kémiai megerősítése (kémiai LTP) is csökkentette a szinapszisban lévő AMPA receptorok D értékét. 100 nM E2 megnövelte az AMPA receptorok szinapszisban eltöltött idejét hasonlóan mint a kémiai LTP. Azonban 100 nM E2 nem befolyásolta a kémiai LTP hatását. E2 nem volt hatással a szinapszisokban lévő AMPA receptorok mennyiségére.

4. Diszkusszió

Kísérleteink alapján kimutattuk, hogy az E2 rövid időn belül csökkenti az AMPA receptorok D értékét élő dPC12 sejtekben. Ezt a hatást a GPER1 közvetíti a sejtnyúlványokon de szükség van a GPER1 és az ER β együttes jelenlétére, hogy a hatás létrejöjjön a sejttesten. Továbbá az E2 különböző koncentrációban volt hatásos a sejttesten és a sejtnyúlványon. A sejttesten 100 pM E2, míg a nyúlványokon az 1 nM és 100 nM csökkentette az AMPA receptorok D értékét. Ez a különbség feltételezhetően a sejttesten lévő GPER1 receptorok 100 nM hatására bekövetkezett internalizációja miatt alakult ki. Kimutattuk, hogy a D_{AMPA} -t befolyásolja a kortikális aktinhálózat dPC12 sejtekben. Az E2 D_{AMPA} -ra kifejtett hatását a ROCK-cofilin és JNK-cofilin útvonalak mediálják az aktinhálózat struktúrájának irányításával. Ezenkívül megerősítettük az eredményeinket élő primer hippokampális neuronokon ahol az E2 csökkentette a D_{AMPA} -t. Hasonlóan a kémiai LTP-hez az E2 növelte az AMPA receptorok szinapszisban eltöltött idejét.

4.1. E2 kompartment specifikus hatása

Kísérleteink alapján az E2 koncentráció specifikusan csökkenti az AMPA receptorok D értékét különböző mértékben a sejttesten és a sejtnyúlványokon. Azonban az E2 csak az $D_{\text{AMPA}}-t$ csökkentette a $D_{\text{mGluR1}}-et$ nem, ami arra utal, hogy az E2 gyors hatása a glutamáterg receptorok mozgására receptor specifikus. Az E2 5 percen belül fejtette ki hatását ami a nem-klasszikus útvonal aktivációját feltételezi.

Kísérleteinkben az ER agonisták és antagonisták kompartment specifikus hatással rendelkeztek, különbözőleg hatottak az AMPA receptorokra a sejttesten és a sejtnyúlványokon. Az ER β és a GPER1 is szükséges az E2 hatáshoz a sejttesten de a sejtnyúlványokon az E2 AMPA receptormozgást befolyásoló hatása egyedül a GPER1-en keresztül valósul meg. Tanulmányok bizonyítják, hogy a kortikális aktinhálózatot az ER β is befolyásolja. Ahogy később részletezve lesz, a dPC12 sejtekben a kortikális aktinhálózat különbözően befolyásolja az AMPA receptorok mozgását a sejttesten és a sejtnyúlványokon. Feltételezzük, hogy a sejttesten az ER β és a GPER1 befolyásolja a receptormozgást az aktinhálózatot keresztül, míg a sejtnyúlványokon a GPER1 egyedül hat a mozgásra egy aktinhálózattól független mechanizmus útján.

Az E2 hatás koncentrációfüggése különbözik a sejttesten és a sejtnyúlványokon dPC12 sejtekben. Míg 100 pM E2 csökkenti a $D_{\text{AMPA}}-t$ a sejttesten, míg magasabb koncentrációk (1 nM és 100 nM) voltak szükségesek, hogy csökkenjen a D_{AMPA} a sejtnyúlványokon. Egy lehetséges magyarázat a kompartment specifikus E2 hatásra a GPER1 receptorok különböző eloszlása a sejttesten és a sejtnyúlványokon. A STORM eredményeink megmutatták, hogy a GPER1/GluR2-AMPA arány magasabb volt a sejttesten mint a nyúlványokon, utalva arra, hogy a nyúlványokon kevesebb a GPER1 mennyiség mint a sejttesten.

Érdekes módon a magas koncentrációjú E2 (1 nM és 100 nM) nem befolyásolta a $D_{\text{AMPA}}-t$ a sejttesten. Több tanulmány is leírta, hogy a GPER1 inaktiválódik magas koncentrációjú ligand hatására. Ebből következtethetünk arra, hogy a magas koncentrációjú E2 kikapcsolja a GPER1 útvonalat a sejttesten. Előző kísérletek bebizonyították, hogy az E2 hatására a GPER1 a sejtmembránból a sejt plazmába helyeződik át, ami a funkcionalitását csökkenti. A STED képalkotással végzett kísérletünk megerősítette ezt az eredményt, miszerint 10 perc 100 nM E2 kezelés után a GPER1 nagyrészt a citoplazmában volt található. Ez a gyors GPER1 internalizáció lehet a magyarázata, hogy a magas koncentrációjú E2 miatt

nem befolyásolja az AMPA receptorok mozgását a sejttesten. Feltételezhető, hogy egy még magasabb E2 koncentráció lenen alkalmas a glutamát receptorok mozgásának változtatására.

4.2. A kortikális aktinhálózat szerepe az E2 hatásban

Bizonyított, hogy a membrán alatt elhelyezkedő aktinstruktúra kölcsönhatásba lép a membránreceptorok intracelluláris részeivel, ezáltal befolyásolva azok mozgását. Jelen eredményeink alátámasztják ezeket a megfigyeléseket, mivel a kortikális aktinhálózat megbontása latA reagenssel megnövelte az AMPA receptorok D értékét a sejttesten. Azonban a latA kezelés hatására a sejtnyúlványokon nem volt változás a D_{AMPA} -ban. Szuperrezolúciós vizsgálatok kimutatták, hogy a nyúlványokban más szerkezetű az aktinstruktúra mint a sejttestben. A sejttestben az aktin egy térhálót alakít ki míg a nyúlványokban ismétlődő rendszerben gyűrűket formál. Azt feltételezzük, hogy a glutamát receptorok eltérő D értékei a sejttesten és a sejtnyúlványon a különböző aktin struktúra miatt vannak. Ez a különbség lehet a magyarázata a latA kompartment specifikus hatásának is.

A kortikális aktinhálózat fontos szerepet játszik a szignálútvonalak közötti kölcsönhatásokban is. Cofilin egyike az aktin struktúrát irányító fehérjéknek, az F-aktin monomer tulajdonságait befolyásolja kötődésével és részt vesz a ROCK-cofilin és JNK-cofilin útvonalakban. Foszforiláció inaktiválja a cofilint és elősegíti az aktin szálak összeszerelődését. E2 megnöveli a cofilin aktivitását és stabilizálja az aktin vázat a GPER1-en keresztül. Tehát a cofilin befolyásolja az aktin átrendeződésének dinamikáját ezzel az AMPA receptorok átrendeződését a szinaptikus plaszticitás folyamán. Ezek alapján megvizsgáltuk az aktinhálózat szerepét az E2 AMPA receptorokra gyakorolt hatásában. Eredményeink mutatják, hogy a latA kezelés megszünteti az E2 hatást, ami arra utal, hogy az aktin alapvető szerepet játszik az E2 hatás közvetítésében. Az E2 szintén nincs hatással a D_{AMPA} értékre ha inhibitorral blokkoljuk a ROCK-cofilin vagy a JNK-cofilin útvonalakat. Feltételezzük, hogy az E2 GPER1-hez való kötődése aktiválja a ROCK-cofilin és JNK-cofilin útvonalakat, amik a kortikális aktinhálózat dinamikájának befolyásolásával megváltoztatják az AMPA receptorok mozgását.

4.3. Az E2 hatása az AMPA receptorokra hippokampális neuronokban

Annak érdekében, hogy megerősítsük az E2 D_{AMPA} -ra kifejtett hatását egy másik *in vitro* neuronális modellen illetve az E2 hatását a szinaptikus AMPA receptorokra egyedi molekula detekciós kísérleteket végeztünk primer hippokampális neuronokon. Eredményeink alátámasztják, hogy az E2 kezelés (100 pM és 100 nM) gyorsan csökkenti a szinaptikus és extraszinaptikus AMPA receptorok D értékét hasonlóan mit a dPC12 sejtekben. A serkentő szinapszisokban lejátszódó LTP az egyik legjobban jellemzett formája a szinaptikus plaszticitásnak és a tanulás és emlékezés alapjául szolgál. Számos tanulmány bebizonyította, hogy az E2 alapvető szerepet játszik az LTP kialakulásában és a memória keletkezésében azonban a pontos molekuláris mechanizmus mindmáig ismeretlen. Az AMPA receptorok a szinapszisok egyik legfontosabb elemei amik elengedhetetlenek az LTP kialakulásához, tanuláshoz és a memóriához. Egyedi molekula detekciós módszerekkel és AMPA receptor immobilizációs technikával kimutatták, hogy az AMPA receptorok membránfelszíni mozgása elengedhetetlen az LTP kialakulásához. Molekuláris szinten LTP után megfigyelhető, hogy a lassan mozgó AMPA receptorok száma megnő a posztszinaptikus membránban. Ezt megerősítik a kísérleteink, melyekben a kémiai LTP hatására a hippokampális neuronokban lecsökken a szinaptikus AMPA receptorok D értéke és nő a szinapszisban eltöltött idejük. Hasonlóan a kémiai LTP-hez, 100 nM E2 is csökkentette a D_{AMPA} -t és növelte a szinapszisban eltöltött időt. Ebből arra következtetünk, hogy az E2 gyorsan erősíti a szinaptikus hatékonyságot azáltal, hogy csökkenti a D_{AMPA} -t. Érdekes módon az E2 nem befolyásolta a kémiai LTP által a D értéken, szinapszisban eltöltött időn és a receptorok számán kiváltott hatást. Azonban az E2 valószínűleg növeli a kémiai LTP okozta fiziológiás változásokat azáltal, hogy a szinapszisban tartja az AMPA receptorokat.

Összegezve eredményeink azt mutatják, hogy az E2 gyorsan és dózis függően csökkent az AMPA receptorok membránfelszíni mozgását kompartment specifikus és ER irányította folyamatokon keresztül élő neuronokban. Ez a folyamat kísérleteink alapján feltételezhetően GPER1 mediált és a ROCK-cofilin és JNK-cofilin útvonalakon keresztül az aktin hálózat befolyásolásával valósul meg. Ez a tanulmány szolgáltatja az első bizonyítékot, hogy az E2 csökkenti az AMPA receptorok membránbeli mozgást és növeli a szinapszisban eltöltött idejét. Ezek az új eredmények hozzájárulnak, hogy molekuláris szinten is megértsük az E2 hatását a szinaptikus plaszticitásra és memória kialakulására.

5. Közlemények listája

A dolgozat alapjául szolgáló közlemények:

Godó, S., Barabás, K., Lengyel, F., Ernszt, D., Kovács, T., Kecskés, M., et al. (2021).
Single-Molecule Imaging Reveals Rapid Estradiol Action on the Surface
Movement of AMPA Receptors in Live Neurons. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 2698.

impakt faktor: 6.684

Barabás, K., Godó, S., Lengyel, F., Ernszt, D., Pál, J., and Ábrahám, I. M. (2018).
Rapid non-classical effects of steroids on the membrane receptor dynamics and
downstream signaling in neurons. *Horm. Behav.*, 0–1

impakt faktor: 3.949

Egyéb közlemények:

Payrits, M., Borbely, E., Godo, S., Ernszt, D., Kemeny, A., Kardos, J., et al. (2020).
Genetic deletion of TRPA1 receptor attenuates amyloid beta- 1-42 (A β (1-42))-
induced neurotoxicity in the mouse basal forebrain in vivo. *Mech. Ageing Dev.*
189, 111268.

impakt faktor: 4.304

Barabás, K., Kobolák, J., Godó, S., Kovács, T., Ernszt, D., Ábrahám, IM., et al (2021).
Live-Cell Imaging of Single Neurotrophin Receptor Molecules on Human
Neurons in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.* 2021 Dec 9;22(24):13260.

impakt faktor: 5.923

Összesített impakt faktor: 20.3059