

## **Szakmai zárójelentés**

A kutatás eredményeinek összefoglalása

OTKA nyilvántartási szám: T 046820

A téma címe: Az endocannabinoid-mediált szignalizáció funkciója a hippocampus neuronhálózatainak normális és kóros működésében

Témavezető: Dr. Freund Tamás

A kutatás időtartama: 4 év (2004. ápr. 1-től 2007. dec. 31-ig)

Az endokannabinoid rendszer egy új kémiai szignálrendszer. A teljes központi idegrendszer területén megtalálhatóak molekuláris alkotóelemei, amelyek speciális szinaptikus jelátviteli folyamatokban játszanak szerepet számos különböző típusú szinapszisban, de legfőképpen a serkentő, glutamáterg és a gátló, GABAerg szinapszisokban. Ennek köszönhetően az endokannabinoid rendszer regulációja több idegrendszeri megbetegedésben, mint például szorongásban, PTSD-ben, skizofréniában, epilepsziában, addikcióban és krónikus fájdalomban potenciális terápiás célpontként szerepel, ezért alapkutatási jelentőségén túl a közeljövő egyik legígéretesebb gyógyszerkutatói témakörének bizonyult.

Az elmúlt 4 évben, a pályázat célkitűzéseinek megfelelően, az endokannabinoid rendszer molekuláris és anatómiai szerveződésével, élettani és kórélettani jelentőségének vizsgálatával foglalkoztunk, valamint eredményeket értünk el az endokannabinoidok által szabályozott GABAerg gátlósejt típusok anatómiai és élettani vizsgálatában is. Az alább felsorolt 4 fő témakör mindegyike e vizsgálati szintek valamelyikéhez tartozik. A címek után zárójelben adjuk meg a témában született nemzetközi, referált folyóiratokban megjelent publikációk sorszámát (hivatkozva a pályázati támogatásból született 23 közlemény mellékelt listájára).

## **1) Az endokannabinoid rendszer molekuláris és anatómiai szerveződése (3, 7, 8, 10, 11, 14, 20, 22):**

Jelentős előrelépést sikerült elérni a GABAerg és a glutamáterg szinapszisokban található endokannabinoid szignálrendszer kvalitatív és kvantitatív jellemzésében. Igazoltuk, hogy preszinaptikus CB<sub>1</sub> kannabinoid receptorok szabályozzák a GABA felszabadulását a neocortex és a törzsdúci magok területén (3, 11). Előbbi esetben a CB<sub>1</sub> receptor-pozitív elemek eloszlása pontosan egyezett a somatoszenzoros kéreg rétegzettségével. A receptor legnagyobb mennyiségben a CCK-tartalmú periszomatikus gátló interneuronok sejttestében és axonvégződéseiben fordult elő. A funkcionális CB<sub>1</sub> receptorok axonterminálisokon preszinaptikusan lokalizálódtak. A II. és a V. rétegi piramissejtek, melyek sejtteste nagy mennyiségű, CB<sub>1</sub>-pozitív periszomatikus GABAerg bemenetet kaptak, erős depolarizáció-indukálta gátláscsökkenést (depolarization-induced suppression of inhibition, azaz DSI) mutattak, szemben az V. rétegi nagy piramissejtekkel, melyek nem vagy alig részesültek kannabinoid modulálta gátlásban. Eredményeink alapján pontosan megadható, mely gátló neuronkörök állnak endocannabinoid–mediált retrográd szinaptikus moduláció alatt, illetve melyek közvetítik a cannabis pszichoaktív hatásait az agykérgi funkciókra (3). Ezzel párhuzamosan a striato-nigralis axonokban lévő receptorok is a külső plazmamembránban helyezkedtek el, azonban elektrofiziológiai méréseink szerint valószínű, hogy ezek pusztán csak szállítódnak a substantia nigra felé, az akciós potenciál vezetését nem befolyásolják. Sikerült meghatároznunk a törzsdúci magok területén leírt fiziológiai és farmakológiai kannabinoid hatások pontos subcelluláris hatáspontjait, melyek hozzájárulhatnak az endocannabinoid rendszer működésének megfejtéséhez az addikciós és mozgáskoordinációs funkciókban, illetve pathofiziológiai folyamatokban (11). Azért, hogy pontosabb jóslatokat tehessünk a preszinaptikus lokalizáció élettani jelentőségéről, nanométeres pontossággal meghatároztuk a CB<sub>1</sub> kannabinoid receptorok pontos subboutonális eloszlását a szinaptikus specializációhoz, illetve a transzmitter felszabadulási helyekhez viszonyítva (8). A periszinaptikus membránban (preszinaptikusan) magasabb receptor sűrűséget találtunk, mint a bouton membrán egyéb területein, ami a transzmitter ürülés kontrolljában betöltött endocannabinoid funkcióra utal. Ugyanakkor jelentős receptor bedúsulást tapasztaltunk a preterminális axon szakaszokon is, ami azt jelzi, hogy a neurotranszmitter felszabadulás szabályozásán kívül más feladata is lehet a CB<sub>1</sub> receptoroknak (8).

További kísérleteinkben egy új, tengerimalacban készült CB<sub>1</sub> receptor elleni antitesttel sok korábbi ellentmondásos eredmény után végre sikerült minden kétséget kizáróan

igazolnunk, hogy a CB<sub>1</sub> receptor kis mennyiségben a serkentő, glutamáterg rostokon is megtalálható (10). Ezt a megfigyelést legújabb közleményeinkben kiterjesztettük a nucleus accumbens és a középagyi ventrális tegmentális area területére is (14, 20). Egy másik tanulmányunkban pedig igazoltuk, hogy a mediális septum (mely a hippocampalis theta oszcilláció pacemaker sejtjeit tartalmazza) kolinerg neuronjainak egy alcsoportja is expresszálja a CB<sub>1</sub> cannabinoid receptort (7). Ezek az eredmények együttesen magyarázatul szolgálhatnak számos korábbi paradoxonra, amelyek hasonló kísérleti paradigmákban ellentétes kannabinoid hatásokról számoltak be. Eredményeink alapján ugyanis mind az exogén cannabis, mind az endokannabinoidok ugyanazon a receptoron, de sokszor ellentétes hatású neurobiológiai struktúrákon, mint például a GABAerg, glutamáterg és kolinerg szinapszisokon egyaránt hatnak.

Miután a kannabinoidok támadáspontját sikerült lokalizálnunk számos agyterületen, a következő fontos kérdés az endokannabinoidok keletkezési helye volt. Elsőként a legismertebb endokannabinoid molekulát, a 2-arachidonilglicerolt (2-AG) készítő enzimet, a diacilglicerol-lipáz-alfát (DGL- $\alpha$ ) vizsgáltuk celluláris és szubcelluláris szinten a hippocampusban. In situ hibridizációs kísérleteink kimutatták, hogy a DGL- $\alpha$  nagy mennyiségben expresszálódik a hippocampális szemcsesejtekben és piramisisejtekben. Az immunfestések egy apró szemcsés festést eredményeztek fénymikroszkópos szinten, amely az elektronmikroszkópban dendrittüskéknek bizonyult. Nagy felbontású immunarany technikát használva kvantifikáltuk a DGL- $\alpha$  pontos szubcelluláris lokalizációját, amely feltárta, hogy az enzim a serkentő szinapszisok posztszinaptikus denzitásának két oldalán periszinaptikus gyűrűben helyezkedik el. Ezek az eredmények a világon elsőként mutatták meg, hogy pontosan hol található a retrográd szinaptikus szignálmolekulának tartott 2-AG keletkezési helye. A felfedezést a Nature Reviews Neuroscience kiemelte 2006. júliusi számában, mint a hónap egyik legfontosabb neurobiológiai felfedezését és azóta az ISI „Highly Cited” minősítését is kiérdemelte. További kísérleteinkben hasonló posztszinaptikus előfordulást tapasztaltunk a nucleus accumbens core régiójában, valamint a középagyi ventrális tegmentális area glutamáterg és GABAerg szinapszisaiban egyaránt (14, 20). Ezek az eredményeink arra utalnak, hogy a 2-AG retrográd szinaptikus szignál útvonal molekuláris és anatómiai szerveződése egy alapvető általános alkotóeleme lehet a legtöbb központi idegrendszeri szinapszisnak.

A 2-AG mellett egy másik jelentős endokannabinoid molekula, az anandamid, amelyet elsőként írtak le az irodalomban, mint a CB<sub>1</sub> receptor potenciális endogén ligandját. Ennek a lipid mediátornak az egyik lehetséges bioszintetikus enzime az N-acil-ethanolamide-

hidrolizáló foszfolipáz D (NAPE-PLD). Legújabb tanulmányunkban kimutattuk, hogy ez a kalcium-függő enzim a hippocampális glutamáterg axon terminálisokban preszinaptikusan, az idegrostban előforduló kalcium-raktárak felszínén található (22). Érdekes módon a legnagyobb mennyiségű NAPE-PLD immunreaktívítást a hippocampális szemcsesejtek mohaterminálisaiban figyeltük meg, amelyeken nem található CB<sub>1</sub> receptor. Ez a karakterisztikus anatómiai lokalizáció nem egyeztethető össze az anandamid eddig feltételezett retrográd szinaptikus hírvivő szerepével és felhívja a figyelmet, hogy a különböző endokannabinoid molekulák eltérő szinaptikus szignálfolyamatokban vehetnek részt, akár eltérő molekuláris támadáspontokon hatva (22).

## **2) Az endokannabinoid rendszer élettani jelentősége (6, 15, 16, 19, 21):**

Az anatómiai projektekkal párhuzamosan haladó élettani kísérleteinkben elsőként azt vizsgáltuk, hogy a két legismertebb endokannabinoid molekula, az anandamid és a 2-AG közül melyik játszik szerepet a hippocampális GABAerg szinapszisok retrográd plaszticitásában (6). Vizsgálatunkhoz új gátlószereket alkalmaztunk, melyek specifikusan gátolják az egyes endokannabinoidok lebontását, így azok hatásai szelektíven felerősíthető. Biokémiai és elektrofiziológiai módszerekkel kimutattuk, hogy a 2-AG lebontásának gátlása megnöveli a patkány agyszeletekben a 2-AG koncentrációját, és elnyújtja a depolarizáció-indukált gátláscsökkenés hatását. Ezzel szemben az anandamid lebontásának gátlása (bár növeli az anandamid koncentrációt) nem okoz változást a jelenségben. Az anatómiai eredményekkel összhangban kísérleteink alapján a depolarizáció-indukált gátláscsökkenés során a CB<sub>1</sub> receptoroknak az endogén ligandja a 2-AG és nem az anandamid (6). Ez a munkánk megjelenése óta szintén kiérdemelte az ISI „Highly Cited” minősítését.

A szinaptikus gátlás endokannabinoidok által mediált retrográd szabályozása során egy váratlan kísérleti eredményt is sikerült elérnünk, amely új, rendkívül ígéretes kutatási irányokat indított el kutatócsoportunkban (15, 16). Kiderült, hogy a nitrogén-monoxid (NO) szignál útvonal elemeinek blokkolása szintén megszünteti a GABAerg neurotranszmisszió retrográd szabályozását. Az egyes inhibitorok direkt posztzinaptikus applikációja, illetve a nátrium-nitroprusside, egy NO-donor molekula kiváltotta cGMP szint növekedés a hippocampális GABAerg axon terminálisokban arra utal, hogy a 2-AG mellett az NO szintén retrográd hírvivőként játszik szerepet a GABAerg szinapszisok működésében (15). Ezeket a farmakológiai és élettani eredményeket támogatják anatómiai kísérleteink, amelyekben nagy felbontású elektronmikroszkópos módszerekkel igazoltuk, hogy a NO egyik bioszintetikus

enzime az nNOS szelektíven akkumulálódik a GABAerg szinapszisokban a posztzinaptikus oldalon, ezzel szemben az NO egyik receptora a szolubilis guanilát-cikláz  $\alpha 1$  alegysége preszinaptikusan fordul elő a GABAerg axon terminálisokban (16). A NO a 90-es években az egyik legnépszerűbb kutatási irányzat volt, de a rengeteg ellentmondásos kísérleti eredmény miatt évek óta visszaszorult szinaptikus szerepének kutatása. Ezeknek az ellentmondásoknak lehet az egyik feloldása eredményünk, amely elsőként bizonyítja, hogy a GABAerg szinapszisokban is létezik retrográd NO szignál, szemben a korábban egyeduralgó nézettel, amely az NO glutamáterg neurotranszmissziót reguláló szerepével próbált minden kísérleti eredményt magyarázni.

A GABAerg szinapszisok mellett új eredményeket értünk el a glutamáterg szinapszisok kannabinoid és vanilloidok által mediált preszinaptikus szabályozásával kapcsolatban is (19, 21). Kísérleteinkben tisztáztuk, hogy a  $CB_1$  receptor agonista WIN 55212-2 nanomólos koncentrációban specifikusan a  $CB_1$  receptorok aktiválásával blokkolja a glutamáterg posztzinaptikus áramokat CA1 piramissejtekben. Kimutattuk ugyanakkor, hogy létezik ennek a korábban szelektívnek tartott  $CB_1$  agonistának egy aspecifikus hatása is, egy nagyságrenddel nagyobb (mikromólos) koncentrációterületben adagolva, amely számos szakirodalomban található kísérleti megfigyelés érvényességét megkérdőjelezi (21). Hasonló eredményt tapasztaltunk a szelektív TRPV1 receptor agonistának tartott capsaicin esetében is, ugyanis a TRPV1 knockout egerekben nem változott a capsaicin hatása a kiváltott posztzinaptikus áramok amplitudójára (19).

A GABAerg interneuronok sokféleségéről, endocannabinoid szabályozásáról, élettani szerepéről és epilepszia során átalakuló kapcsolatrendszereikről két rangos nemzetközi folyóirat felkérésére (*Neuron* és *TINS*) írtunk összefoglaló tanulmányokat (5, 18).

### **3) Az endokannabinoid rendszer patofiziológiás jelentősége (2, 4, 12, 13, 23):**

Anatómiai és élettani kísérleteink rámutattak, hogy az endokannabinoidok, különösen a 2-AG, a  $CB_1$  receptor aktiválásával egy negatív szinaptikus visszacsatolási folyamat részei. Ezzel párhuzamosan további kísérleteinkben igazoltuk, hogy a  $CB_1$  receptorok blokkolása a posztinatális első öt napban epilepsziás rohamok kialakulásához vezet, mivel a serkentő szinapszisokban, illetve a korai fejlődési stádiumokra jellemző még depolarizáló hatású GABAerg szinapszisokban a  $CB_1$  receptor antagonistá gátolja ezt a fontos negatív visszacsatolási útvonalat (2). A  $CB_1$  agonista ezzel szemben csökkenti a spontán neuronhálózati aktivitást és ezzel az új szinaptikus kapcsolatok kialakulását. Ezek az

eredmények felhívják a figyelmet, hogy a terhes édesanya cannabis fogyasztása károsan befolyásolja a fejlődő idegrendszer érési folyamatait, a szélsőséges mértékű obezitás kezelésére engedélyezett CB<sub>1</sub> antagonistá rimonabant használata pedig fokozottan hajlamosítja a magzatot epilepszia kialakulására (2).

További kísérleteinkben temporális lobectomia során eltávolított hippocampus mintákban kimutattuk, hogy a CB<sub>1</sub> receptor expressziójának mennyisége harmadára csökken a kontroll hippocampusban mérhető értékekhez képest (23). Hasonló, bár mértékében kisebb csökkenést tapasztaltunk a CB<sub>1</sub> fehérjét horgonyzó CRIP és a DGL- $\alpha$  mRNS szintjében is. Ezzel szemben az anandamid metabolikus enzimeit nem mutattak expressziós változást. Kvantitatív elektronmikroszkópos analízis segítségével bizonyítottuk, hogy az endokannabinoid rendszer molekuláris elemeinek eltűnése elsősorban a serkentő szinapszisokban történik. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a serkentő szinapszisok 2-AG által mediált negatív visszacsatolási útvonala károsodik az epilepsziás neuronhálózatokban és ez hozzájárulhat az epilepsziás rohamok küszöbének további csökkenéséhez (23).

A szerteágazó eloszlási mintázattal összhangban igazoltuk az endokannabinoid rendszer szerepét más idegrendszeri betegségekben is. Vad típusú és CB<sub>1</sub> knockout egereket összehasonlítva a skizofrénia phencyclidine-indukálta szociális interakciós modelljében kimutattuk, hogy a cannabinoid receptor szerepet játszik a szociális interakciók mértékének szabályozásában, mivel hiányában nem okoz a phencyclidine csökkenést az interakciók számában (4). Ezzel szemben a sztereotip viselkedés phencyclidine kezelés hatására kialakuló növekedése még fokozottabb volt a CB<sub>1</sub> receptor knockout egerekben (4). Ez arra utal, hogy a CB<sub>1</sub> receptor szelektíven fokozza a skizofrénia negatív szimptomájának kialakulási esélyét és csökkenti a pozitív szimptomák megjelenését. Hasonló eredményeket kaptunk a szorongással kapcsolatos állatmodellekben is. Elsőként elektromos sokk modellt alkalmaztunk CB<sub>1</sub> knockout és kontroll vad típusú egereken és a viselkedési válaszukat tanulmányoztuk 24 óra múlva. A vad típusú egerek megmerevéssel reagáltak a tesztben és csökkent a lokomóciós aktivitásuk. Ezzel szemben a CB<sub>1</sub> knockout egerek nem mutattak válaszreakciót. Hasonlóképpen, a CB<sub>1</sub> receptor antagonistá AM251 szintén kivédte a merevési válaszreakció létrejöttét. Végül, de nem utolsósorban a CB<sub>1</sub> receptor agonista WIN 55212-2 fokozta a válaszreakció mértékét. Figyelembe véve a korábbi modelleket is, eredményeink arra utalnak, hogy a CB<sub>1</sub> receptorok a kontextuális félelem tanulásában komoly szerepet játszanak (12). Egy további kísérletünkben tisztáztuk az egér és patkány szorongás modellekben tapasztalt különbségek neurobiológiai hátterét is (13). Kiderült, hogy egerekben

a gátló posztszinaptikus áramokat könnyebben lehet  $CB_1$  agonistával csökkenteni, ezzel szemben a patkányokban a  $CB_1$  receptor arányaiban nagyobb mértékben csökkentette a serkentő áramokat. Feltételezésünk szerint ez magyarázhatja, hogy a  $CB_1$  receptor agonista egerekben anxiolitikumként viselkedik, patkányokban pedig anxiogén hatású (13).

**Összességében megállapítható, hogy az endocannabinoid szignálrendszer molekuláris felépítésével, funkciójával, kórélettani szerepével kapcsolatban számos jelentős megfigyelést tettünk, ezek az eredmények új gyógyszercélpontokat jelölnek ki, amelyek számos idegrendszeri megbetegedésben vezethetnek hatékonyabb és szelektívebb farmakoterápia kidolgozásához.**

#### **4) Egyéb, az endokannabinoid kutatásokhoz közvetve kapcsolódó eredmények (1, 9, 17):**

Az endokannabinoidok populációs aktivitást (a GABAerg interneuronok által generált gamma oszcillációt) szabályozó szerepének vizsgálata során in vitro hippocampalis szeletben kiváltott gamma aktivitás közben azonosítottuk az egyes interneuronok fáziskapcsoltságát, késését a piramissejtek tüzeléséhez képest (1). A korreláció során megállapíthattuk, hogy az egyes interneuron típusok a gamma jellegzetes fázisaiban tüzelnek, a kosársejtek 2-3 msec-al a piramissejtek után. Az oszcilláció során tehát a piramissejtek feed-forward módon hajtják az interneuronokat (1). Az egyes interneurontípusok általános aktivitását egy másik módszerrel, a citokróm C szintet jelző immuncitokémiával is vizsgáltuk (9). A legmagasabb citokróm C szint a parvalbumin-pozitív periszomatikus gátlósejtekben és a calbindin-pozitív hippocampo-septális interneuronokban volt megfigyelhető. A somatostatin és cholecystokinin-immunreaktív interneuronok heterogén citokróm C szintet mutattak, a calretinin-pozitív sejtek pedig alig voltak citokróm C-vel jelölhetőek. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az egyes hippocampális interneurontípusokban eltérő mennyiségű mitokondrium található, amely eltérő gyakoriságú aktivitásra utalhat (9). Végül elektronmikroszkópos térbeli rekonstrukció segítségével megvizsgáltuk, hogy milyen paraméterek alapján lehetséges a különböző interneurontípusok axon terminálisait csoportosítani (17). A septo-hippocampális GABAerg idegvégződések minden paraméterükben szignifikánsan nagyobbak bizonyultak a lokális interneuronoktól származó boutonokhoz képest. Ugyanakkor ez utóbbi csoportban nem lehetett további felosztást végezni az egyes paraméterek értékeinek nagyfokú korrelációja miatt (17).