

STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Wpływ interakcji macierzy zewnątrzkomórkowej, białek adhezyjnych i proteaz na plastyczność GABAergicznej transmisji hamującej w hipokampie

Zachodzące w mózgu procesy takie jak uczenie się i przechowywanie informacji jest jednym z najbardziej fascynujących zagadnień we współczesnej neuronauce. Rozwikłanie i zrozumienie mechanizmów tych procesów opiera się przede wszystkim na założeniu, że siła połączeń synaptycznych pomiędzy neuronami współtworzącymi obwody neuronalne, może być regulowana. Ta niezwykła zdolność do modyfikacji siły połączeń określana jest jako plastyczność synaptyczna i stanowi substrat dla procesów pamięciowych. Dla prawidłowego funkcjonowania tych procesów niezbędne jest zachowanie odpowiedniej równowagi pomiędzy pobudzeniem a hamowaniem, we współtworzonej zarówno przez neurony pobudzające jak i hamujące, sieci neuronalnej. Z całą pewnością, dotychczas zdecydowanie mniej wiadomo na temat zaangażowania interneuronów GABAergicznych (neurony hamujące) w tworzenie śladów pamięciowych (engramów), w porównaniu do neuronów pobudzających. Odpowiedź na pytanie jak kontrolowana jest aktywność neuronalna za pośrednictwem długotrwałych zmian w obrębie synaps GABAergicznych, wymaga zatem dogłębnego zrozumienia molekularnych mechanizmów sterujących zjawiskami plastycznymi w synapsach hamujących.

W niniejszej pracy skupiono się na zbadaniu zaangażowania odmiennych elementów wchodzących w skład synapsy, na zjawisko długotrwałego wzmocnienia w synapsach GABAergicznych (zjawisko iLTP, *ang. inhibitory long-term potentiation*). Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP) są zaliczane do składników macierzy komórkowej. Struktura ta, ze względu na istotne zaangażowanie w wiele procesów zachodzących w obrębie synaps, uważana jest za jej nieodłączną część. Dzięki zastosowaniu techniki rejestracji z pojedynczych komórek (*ang. whole-cell patch-clamp*) a także wykorzystując oznaczenia immunofluorescencyjne, wykazano po raz pierwszy, że aktywność metaloproteinazy-3 (MMP-3) jest kluczowa dla indukcji i utrzymania zjawiska iLTP. Mając więc na uwadze, że zmieniona aktywność wielu metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej, w tym MMP-3, jest obserwowana w różnorodnych zaburzeniach neurologicznych (choroba Alzheimera, Parkinsona), poznanie roli MMP-3 w plastyczności hamującej może przyczynić się do lepszego zrozumienia funkcjonowania mózgu w warunkach patologicznych.

W czasie intensywnej przebudowy układu nerwowego, np. podczas zjawisk plastycznych, jednym z kluczowych etapów jest aktywacja wewnątrzkomórkowych ścieżek sygnałowych zależnych od integrzyn. Rozpoczyna ona m.in. reorganizację struktury synaps, dzięki czemu możliwe jest utrzymanie długotrwałych zmian. O ile funkcja integrzyn w synapsach pobudzających jest dobrze poznana, to ich zaangażowanie w zjawiska obecne w synapsach hamujących nie jest dogłębnie wyjaśnione. W niniejszych badaniach posłużono się oznaczeniami immunofluorescencyjnymi, w których wykorzystano specyficzne przeciwciała rozpoznające integrzyny z podjednostką $\beta 1$ i $\beta 3$ ale tylko w ich aktywnej, otwartej konformacji. Wykazano tym samym, że podczas zjawiska iLTP, w sąsiedztwie synaps hamujących, dochodzi wyjątkowo do aktywacji integrzyn $\alpha \beta 1$. Może to zatem wskazywać na kluczową rolę tego typu integrzyn w molekularnym mechanizmie indukcji zjawiska długotrwałego wzmocnienia w synapsach GABAergicznych.

Cząsteczki adhezji międzykomórkowej koordynują funkcjonowanie sieci neuronalnych, będąc zaangażowane zarówno w tworzenie jak i przebudowę połączeń synaptycznych. Neuroligina-2 jest postsynaptycznym białkiem adhezyjnym, które poprzez oddziaływania z presynaptyczną neureksyną, uczestniczy specyficznie w tworzeniu synaps hamujących na komórkach

piramidowych. Wykazano, że zablokowanie możliwości tworzenia międzysynaptycznego kompleksu neureksyna-neuroligina-2 podczas reorganizacji synapsy GABAergicznej, istotnie zmniejsza prawdopodobieństwo wystąpienia zjawiska iLTP. Taka intensywna przebudowa synapsy, po indukcji badanego zjawiska iLTP, trwa około 12 min, zaś jej efektem jest m.in. utworzenie stabilnych kompleksów neureksyny z neuroliginą-2 w powiększonej synapsie GABAergicznej. Ponieważ zaburzenia związane z brakiem funkcjonalnej neuroliginy-2 w układzie nerwowym są coraz częściej dokumentowane, odpowiedź na pytanie o zaangażowanie neuroliginy w zjawiska plastyczne a tym samym wyższe funkcje poznawcze, może stanowić podstawę dla rozwoju terapii w kierunku leczenia zaburzeń neuropsychiatrycznych.

Z uwagi na fakt, że transmisja GABAergiczna stanowi kluczowy element kształtujący aktywność sieci neuronalnych, poznanie molekularnych podstaw zjawisk plastycznych w synapsach hamujących pozwoli na lepsze zrozumienie funkcjonowania układu nerwowego w warunkach fizjologicznych jak i patologicznych.

1.04.2022r.

Anna Lech

ABSTRACT OF DOCTORAL THESIS

Impact of the interaction between the extracellular matrix, adhesion proteins, and proteases on the inhibitory GABAergic transmission in the hippocampus

Brain processes such as learning and memory are one of the most fascinating issues in modern neuroscience. Understanding the mechanisms of these processes is based on the assumption that the strength of synaptic connections can be regulated. This remarkable ability to modify the strength of connections is known as synaptic plasticity and is a substrate for memory formation. For the proper functioning of the brain, it is crucial to maintain an appropriate balance between excitation and inhibition in the neural circuits. Currently, much less is known about the involvement of GABAergic interneurons (inhibitory neurons) in the formation of memory traces (engrams) compared to excitatory neurons. Therefore, the answer to the question of how neuronal activity is controlled through long-term changes within GABAergic synapses requires an in-depth understanding of the molecular mechanisms controlling plasticity phenomena in inhibitory synapses.

The present study focuses on analyzing the involvement of different elements of the GABAergic synapse in the phenomenon called long-term potentiation (iLTP). Matrix metalloproteinases (MMPs) are components of the extracellular matrix, which is considered as an integral part of synapses. The experiments were carried out using the whole-cell patch-clamp technique and immunofluorescence assays. The current studies found that the activity of metalloproteinase-3 (MMP-3) is crucial for the induction and maintenance of the iLTP. Therefore, bearing in mind that the altered activity of different matrix metalloproteinases, including MMP-3, is observed in a variety of neurological disorders (Alzheimer's disease, Parkinson's disease), an understanding of the role of MMP-3 in inhibitory plasticity may lead to a better insight into the brain under pathological conditions.

During the intensive remodeling of the nervous system, e.g. after plasticity induction, one of the key steps is the activation of integrin-dependent intracellular signaling pathways. It gives rise to the reorganization of the synaptic structure, making it possible to maintain long-term changes. While the function of integrins at excitatory synapses is well understood, their involvement in the phenomena observed at inhibitory synapses is not fully understood. In this study, immunofluorescence assays were used. The experiments were run using specific antibodies recognizing integrins with the $\beta 1$ and $\beta 3$ subunit only in their active, open conformation. This analysis shows that during the iLTP, in the vicinity of inhibitory synapses, the $\alpha \beta 1$ integrins are exceptionally activated. Taken together, these results suggest a crucial role of $\alpha \beta 1$ integrins in the molecular mechanism of the long-term potentiation in GABAergic synapses.

Trans-synaptic adhesion molecules coordinate the functioning of neural circuit, being involved in both the formation and remodeling of synaptic connections. Neuroligin-2 is a postsynaptic adhesion protein that, through interactions with presynaptic neurexin, is involved in the formation of inhibitory synapses on pyramidal cells. It has been shown that blocking the possibility of the formation of the trans-synaptic neurexin-neuroligin-2 complex during the reorganization of the GABAergic synapse significantly reduces the likelihood of the iLTP occurrence. Such an intensive reconstruction of the synapse, after induction of the iLTP, takes about 12 minutes, and its effect is, among others, the formation of stable complexes of neurexin with neuroligin-2 in an enlarged GABAergic synapse. Since neurological disorders related to the lack of functional neuroligin-2 are increasingly documented, understanding the role of neuroligin in plasticity phenomena and therefore in higher cognitive functions

is important. Additionally, it might be crucial for the development of new therapies concerning neuropsychiatric disorders.

Because GABAergic transmission is a key element shaping the activity of neural circuit, understanding the molecular basis of plasticity phenomena in inhibitory synapses will extend our knowledge of the functioning of the nervous system in physiological and pathological conditions.

1.04.2022

Anne Lech