

Ocena wpływu metabolizmu komórkowego na transmisję GABAergiczną w hodowli neuronów hipokampalnych szczura.

Streszczenie

Transmisja GABAergiczna jest główną formą hamowania synaptycznego, która występuje w ośrodkowym układzie nerwowym ssaków. Za tą formę komunikacji odpowiadają w głównej mierze receptory jonotropowe typu GABA_A. Dodatkowym aspektem w przypadku transmisji GABAergicznej jest także fakt, że pomimo tego że synapsy GABAergiczne są mniej liczne niż synapsy pobudzające to jednak ich aktywność jest decydująca przy synchronizacji aktywności sieci neuronalnych odpowiedzialnych za powstawanie odpowiednich rytmów mózgowych. Z tego też powodu uzasadnione stają się pytania: czy astrocyty czyli najliczniejsza grupa komórek glejowych ma ~~jakiś~~ jakiegokolwiek wpływ na kształtowanie aktywności GABAergicznej. Powyższy problem staje się tym bardziej intrygujący jako że sporo wiadomo na ten temat w przypadku transmisji pobudzającej – glutaminianergicznej.

W celu odpowiedzenia na postawione powyżej pytania skonstruowano dwa modele hodowli komórkowych. Pierwszym była pierwotna hodowla neuronów hipokampalnych szczura (NC) gdzie znacznie obniżono poziom zanieczyszczenia astrocytami do około 10%. W przypadku drugiego modelu kohodowli astrocytarno-neuronalnej (ANCC) ilość astrocytów znacznie podniesiono poprzez ich dosianie w takiej ilości aby była ona większa od liczby neuronów. Aby uzupełnić wyniki otrzymane z eksperymentów elektrofizjologicznych przeprowadzono dodatkowo serie eksperymentów immuno fluorescencyjnych oznaczając głównie elementy tworzące układ GABAergiczny: vGAT, GAD, gefiryna w tych samych układach modelowych. Uzyskane wyniki pokazały, że obecność astrocytów silnie zwiększała częstotliwość mIPSC, czemu towarzyszył wzrost ilości punktów synaptycznych wyznakowanych przez vGAT i GAD. Zablokowania aktywności fosforylasy glikogenu, transporterów monokarboksylianów, syntetazy glutaminy i akonitazy powodowało obniżenie częstotliwości mIPSC w przypadku ANCC pozostając bez wpływu na częstotliwość w NC. W przypadku plastyczności GABAergicznej protokół indukcji iLTP powodował zwiększenie amplitudy mIPSC jak i rozmiaru punktów gefirynowych w obu modelach. Jednakże w przypadku ANCC rozmiar iLTP był znacznie większy niż w przypadku NC. Dodatkowo zablokowanie wymienionych wcześniej elementów metabolizmu komórkowego, przed zaindukowaniem iLTP, znacząco wpłynęło na amplitudę mIPSC jak i morfologię punktów

gefirynowych szczególnie w przypadku ANCC. Brak zmian w morfologii punktów gefirynowych w przypadku zablokowania fosforylasy glikogenu jak i transporterów monokarboksylanów i późniejszej indukcji iLTP pozwala przypuszczać że, związki monokarboksylanowe (prawdopodobnie mleczań) uczestniczą w indukcji zmian plastycznych w neuronach jako cząsteczki sygnałowe. Dodatkowo zaobserwowano we wszystkich przypadkach, że zablokowanie aktywności fosforylasy glikogenu powoduje wzrost a w przypadku transporterów monokarboksylanów zmniejszenie amplitudy mIPSC. Mechanizm molekularny tych zmian amplitudy nie został jednak poznany, jednakże jak się wydaje jest dużo bardziej prawdopodobne, że zmiany te są skutkiem procesów związanych z utrzymywaniem równowagi GABA niż bezpośredniej modulacji receptorów GABA_A przez zastosowane inhibitory enzymu/transporterów.

Całość uzyskanych wyników ukazuje istotny udział astrocytów w kształtowaniu zarówno bazowej transmisji synaptycznej jak i jej plastyczności wpływając na układ GABergiczny zarówno na poziomie morfologicznym (wzrost ilości punktów synaptycznych vGAT, morfologia gefiryny) jak i funkcjonalnym (wzrost częstotliwości lub amplitudy mIPSC). Zaobserwowane efekty pozwalają dodatkowo na przypuszczenie, że cząsteczki monokarboksylanów są wykorzystywane jako cząsteczki sygnałowe w indukcji zmian plastycznych.

20.06.2017

Przemysław
Kacior

Evaluation of the effect of cell metabolism on GABAergic transmission in rat hippocampal neuron culture.

Summary

GABAergic transmission is a major form of synaptic inhibition in the adult mammalian central nervous system and is mediated primarily by GABA_A ionotropic receptors. GABAergic transmission is influenced by many mechanisms such as for example time duration of GABA transient in the synapse. Although GABAergic synapses are less numerous than excitatory ones, their activity is decisive in synchronizing neuronal networks activity in the form of brain rhythms. It seems thus interesting to ask whether astrocytes, the most numerous group of glial cells, affect the GABAergic activity. In particular, it seems appealing to investigate how classical astrocytic-neuronal cross-talk affects GABAergic activity, and whether the plasticity processes occurring at GABAergic synapses are dependent on astrocytes. Some of these problems have been addressed for the glutamatergic transmission but for GABAergic one they remain open questions.

To answer these questions, two models were used. The first one was the rat hippocampal neuronal culture (NC), where astrocytes were only at contamination level (ca. 10%). In the second model (neuronal-astrocytic co-culture- ANCC), the fraction of astrocytes was enriched. Electrophysiological recordings were made in the patch clamp technique and mIPSCs (miniature postsynaptic inhibitory currents) were recorded. In addition to electrophysiological experiments, series of immunostainings experiments were performed targeting the main components of the GABAergic system: vGAT, GAD, gephyrin. In the case of basal GABAergic activity, astrocytes greatly enhanced the mIPSC frequency and increased the number of vGAT- and GAD-positive puncta. Moreover, inhibition of glycogen phosphorylase, monocarboxylate transporters, glutamine synthetase or aconitase reduced mIPSC frequency in ANCC but not in NC. Induction of iLTP was associated with an increase in mIPSC amplitude as well in gephyrin morphology in both models, but in the case of ANCC, extent of these changes was larger than in NC. Also inhibition of mentioned earlier enzymes/transporters affected the extent of mIPSC increase upon iLTP induction. Finally, morphology of GABAergic synapses in ANCC was also influenced by inhibition of astrocytic cell metabolism but in case of blockade of monocarboxylate transporters and glycogen phosphorylase application of iLTP protocol didn't cause changes in gephyrin puncta morphology. These results point to monocarboxylates (presumably lactate) as a signaling compounds triggering plasticity changes. Moreover, inhibition of glycogen phosphorylase led

to increase in mIPSC amplitude and inhibition of monocarboxylate reduced mIPSC amplitude but these changes were less prominent. Although molecular mechanism responsible for these changes remain unknown it is likely that observed changes are connected to involvement of both mentioned proteins in maintaining neurotransmitter homeostasis than direct interaction of GABA_A receptors by these inhibitors.

In conclusion, these results show a remarkable contribution of astrocytes in shaping both synaptic transmission and its plasticity at the morphological level (numbers of vGAT puncta, gephyrin morphology) as well at the functional level (mIPSC frequency or amplitude). Moreover, observed changes in gephyrin morphology support idea about monocarboxylates that are used as signalization compounds in induction of plasticity changes.

20.06.2017

Przemysław
Kaczor