

**mgr Joanna Sowa,**

Zakład Fizjologii

Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk

Promotor: **prof. dr hab. Krzysztof Tokarski**

Promotor pomocniczy: **dr Magdalena Kusek**

Tytuł pracy doktorskiej:

***The involvement of chosen chemokines in neuronal properties and synaptic transmission in central and basolateral complex of the rat amygdala***

**Abstract**

Chemokines are emerging as key players in a broad array of biological responses in the brain under physiological, non-inflammatory conditions. They can be found in all brain cells - from brain-blood barrier endothelium, through all types of glia, to neurons and neural stem cells. Neuron-glia crosstalk is also suggested to be modulated by chemokines. It should be noted that glial cells not only express chemokine receptors but also can dynamically release them, thus influencing the activity of neurons or other brain cells. This orchestration of neuron-glia communication is believed to be essential in maintaining brain homeostasis. Among them, CX3CL1 and CXCL12 have attracted much attention by demonstrating their role in such phenomena as neurogenesis, neuroprotection, as well as modulation of synaptic transmission

and plasticity. The relatively high expression of their receptors, i.e., CX3CR1 and CXCR4, in limbic brain structures supports the association between them and neuropsychiatric diseases, such as anxiety or depression. Consistently, the impairment of CX3CL1/CX3CR1 and/or CXCL12/CXCR4 signaling led to behavioral and neurobiological consequences, such as impaired learning or anxiety. Despite this, mechanisms of chemokines in the regions involved in anxiety (such as the amygdala) remain largely unknown. It would provide critical insight into the physiological mechanisms underlying neuroimmunological interactions in the amygdala.

The aim of this study was to dissect the underlying mechanisms and effects of activation of CX3CR1 and CXCR4 receptors on synaptic transmission and electrophysiological property of neurons in two nuclei of the amygdala - basolateral (BLA) - the main input nucleus, and central (CeA) - the main output nucleus.

To this end, by using a combination of electrophysiological and pharmacological approaches, the actions of two chemokines (CX3CL1 and CXCL12) on neuronal properties as well as synaptic transmission were determined. Moreover, the involvement of microglia or astrocytes was measured by using minocycline or fluorocitrate, respectively. In order to confirm the neuronal expression of CX3CR1, immunohistochemical staining was used.

In the BLA, CX3CL1 increased the threshold for spike generation, reducing the neuronal excitability of principal cells (PCs). This effect was accompanied by the impaired LTP at cortico-BLA synapses and attenuated GABAergic transmission manifested as a decreased frequency of spontaneous inhibitory synaptic currents (sIPSCs). These effects were blocked in the presence of the CX3CR1 antagonists, AZD8797. The treatment of the inhibitor of microglial activity, minocycline, eliminated the CX3CL1-triggered effects. These results suggest that the CX3CR1 activation might modulate the memory and emotional processing *via* its involvement in the GABAergic transmission and the attenuation of the PCs firing and synaptic plasticity.

In the CeA, CX3CL1 decreased the input resistance of Regular-Spiking neurons (RS), resulting in the attenuation of their spiking. The firing reduction of RS neurons consequently reduced the frequency of sIPSCs in Late-Firing cells (LF). Those effects were eliminated in the presence of the antagonist of the CX3CR1 receptor, AZD8797, or minocycline, the inhibitor of microglial

activity. Thus, the network activity in the CeA is suggested to be, at least in part, modulated by the CX3CR1 activation.

The treatment of CXCL12 in the BLA triggered a nonsignificant increase in the PCs excitability and dual changes in the inhibitory synaptic transmission. These changes are in line with the CXCL12-induced increase in glutamatergic transmission observed by other group.

CXCL12 enhanced firing in both types of CeA neurons. The application of this chemokine facilitated the sEPSCs frequency preferentially onto Regular-Spiking neurons. Those effects were eliminated in the presence of the CXCR4 antagonist, AMD3100. The CXCR4 activation triggered an increased frequency of sIPSCs onto Regular-Spiking neurons, whereas the amplitude of these events in Late-Firing neurons was reduced. Those effects were blocked in the presence of a CXCR4 receptor antagonist and by inhibition of astrocytic activity by fluorocitrate.

Altogether, findings from this study highlight the neuromodulatory role of CX3CL1 and CXCL12 in both nuclei of the amygdala, which is a consequence of their regulation of local neuron-glia communication. Further investigation in this area will lead to a better understanding of neuroimmunological mechanisms in the amygdala and provide novel insights into neuro-immune mechanisms in the amygdala and yield new targets for developing treatments of amygdala-related disorders.

## Streszczenie

Coraz więcej badań wskazuje na rolę chemokin w szeregu biologicznych odpowiedzi w warunkach fizjologicznych. Obecność chemokin wykazano we wszystkich komórkach mózgowych - od komórek śródbłonna bariery krew-mózg, przez wszystkie typy komórek glejowych, po neurony i nerwowe komórki macierzyste. Sugeruje się także, że komunikacja pomiędzy neuronami a komórkami glejowymi jest również modulowana przez chemokiny. Należy podkreślić, że komórki glejowe nie tylko wykazują obecność receptorów chemokinowych ale także potrafią w sposób dynamiczny uwalniać poszczególne typy chemokin, tym samym wpływając na aktywność neuronów lub innych komórek w mózgu. Przypuszcza się, że te interakcje są jednym z kluczowych czynników odpowiedzialnych za utrzymanie w szerokim rozumieniu homeostazy OUN. Dwie z chemokin, CX3CL1 i CXCL12, wzbudziły zainteresowanie przez ich szczególnie istotną rolę w modulacji neurogenezy, neuroprotekcji, a także modulacji transmisji synaptycznej oraz plastyczności. Szczególnie wysoka ekspresja receptorów dla tych dwóch chemokin, tj. CX3CR1 i CXCR4, w obszarach limbicznych sugeruje związek pomiędzy nimi a chorobami psychicznymi, takimi jak lęk czy depresja. Potwierdzają to badania w których wykazano, że zablokowanie sygnalizacji CX3CL1/CX3CR1 i/lub CXCL12/CXCR4 prowadzi w testach behawioralnych na zwierzętach do upośledzenia uczenia się oraz nasilenia reakcji lekowych. Mimo to mechanizm działania chemokin w obszarach mózgu związanymi z zaburzeniami lękowymi (ciało migdałowe) pozostaje w zasadzie niezbadany. Określenie wpływu chemokin na regulację aktywności struktur ciała migdałowego wniosłoby znaczący wkład w dalsze zrozumienie powiązania pomiędzy układem nerwowym a odpornościowym.

Celem przeprowadzonych badań, było określenie mechanizmów i efektów aktywacji receptorów CX3CR1 i CXCR4 na przekaźnictwo nerwowe oraz właściwości elektrofizjologiczne neuronów w dwóch jądrach ciała migdałowego - w podstawnobocznym (BLA) - głównym wejściu oraz środkowym (CeA) - głównym wyjściu z obszaru kompleksu jąder migdałowych.

Dzięki połączeniu elektrofizjologicznych i farmakologicznych metod, te efekty zostały zbadane. Co więcej, wpływ mikrogleju i astrocytów był zmierzony przez użycie minocykliny lub

fluorocytrynianu. W celu określenia neuronalnej lokalizacji receptora CX3CR1 wykonano także barwienia immunohistochemiczne.

W BLA, podanie chemokiny CX3CL1 zwiększyło prąd progowy, prowadząc tym samym do zmniejszonej pobudliwości neuronów głównych (ang. *principal cells*, PCs). Temu efektowi towarzyszyła osłabiona plastyczność synaptyczna w synapsach korowo-podstawnobocznych oraz zmniejszona częstotliwość spontanicznych hamujących prądów postsynaptycznych (sIPSCs). Efekty te blokowane były w obecności antagonisty receptora CX3CR1, AZD8797. Również zastosowanie inhibitora aktywności mikrogleju, minocykliny, blokowało efekty podania chemokiny CX3CL1. Uzyskane wyniki mogą sugerować, że aktywacja receptorów CX3CR1 poprzez wpływ na przekaźnictwo GABAergiczne oraz osłabienie pobudliwości komórek podstawowych i procesów plastyczności synaptycznej może modulować pamięć i reakcję emocjonalną.

W CeA, CX3CL1 zmniejszała oporność błony komórkowej neuronów regularnie wyładowujących się (ang. *Regular-Spiking neurons*; RS), co skutkowało spadkiem ich pobudliwości. Spadek aktywności tych neuronów spowodował zmniejszenie sIPSCs rejestrowanych w neuronach o późnym początku wyładowania (ang. *Late-Firing neurons*; LF). Efekty te były blokowane w obecności antagonisty receptorów CX3CR1 AZD8797 lub po zahamowaniu aktywności komórek mikroglejowych minocykliną. Sugeruje to, że aktywność sieciowa CeA jest przynajmniej w części modulowana przez aktywację receptorów CX3CR1.

Podanie chemokiny CXCL12 w BLA wywoływało nieznaczny wzrost pobudliwości PCs oraz dwukierunkowe zmiany w hamującej transmisji synaptycznej, chociaż oba te efekty nie uzyskały istotności statystycznej. Kierunek zarejestrowanych efektów aktywacji receptora CXCR4 jest zgodny z wynikami uzyskanymi przez inną grupę badawczą, która wykazała wzrost przekaźnictwa pobudzającego w BLA po podaniu CXCL12.

Podanie CXCL12 zwiększyło pobudliwość zarówno neuronów RS jak i LF w CeA. Podanie tej chemokiny nasilało również częstotliwość spontanicznych pobudzających prądów synaptycznych rejestrowanych z neuronów RS. Efekty te blokowane były przez antagonistę receptora CXCR4, AMD3100. Aktywacja receptorów CXCR4 zwiększała także częstotliwość

sIPSCs rejestrowanych z neuronów RS. Natomiast rejestracja z neuronów LF wykazała hamujące działanie CXCL12 na amplitudę prądów GABAergiczných. Efekty te były blokowane przez antagonistę receptora CXCR4, jak i przez zablokowanie aktywności astrocytów podaniem fluorocytrynianu. Podsumowując, uzyskane wyniki sugerują neuromodulacyjną rolę chemokin w obu badanych jądrach obszaru ciała migdałowatego, co wynika z ich regulacji komunikacji pomiędzy neuronami a komórkami glejowymi. Dalsze badania w tym zakresie mogą prowadzić do lepszego zrozumienia mechanizmów neuroimmunologicznych w ciele migdałowatym i dostarczyć nowych kandydatów dla rozwoju leczenia zaburzeń związanych z funkcjami tej struktury.