

# Gátló Szabályozás és Integráció a Thalamusban

Doktori (Ph.D) értekezés tézisei

**Plattner Viktor**

Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola  
Semmelweis Egyetem



Témavezető:

Dr. Acsády László, DSc, tudományos tanácsadó

A PhD disszertáció hivatalos bírálói:

Dr. Lőrincz Magor, Ph.D, egyetemi adjunktus

Dr. Kamondi Anita, DSc, osztályvezető főorvos

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Halász Béla, DSc, az MTA rendes tagja

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Karmos György, CSc, tudományos tanácsadó,  
ny. egyetemi tanár

Dr. Rácz Bence, PhD, egyetemi docens

Budapest

2016

## Bevezetés

A klasszikus megközelítés szerint a talamusz a külvilágból érkező szenzoros információt kapuzza az agykéreg felé. Egyetlen szerepének ezt a hűséges információ továbbítást tekintették. Számos talamusz mag valóban betölti ezt a funkciót és a szenzoros ún. „driver” bemenetek által hordozott üzenetet az agykéreg egy jól körülírható funkcióval rendelkező részének 4. rétegébe továbbítja. Sokáig ezek a magok szolgáltak a talamokortikális kapcsolatok modeljéül, és a talamuszról alkotott klasszikus kép is ezek általánosított tulajdonságai alapján alakult ki.

A talamusz nagy részének azonban teljesen más összeköttetés rendszere van a kimeneti kérgi régiókkal, és a bemeneti kéreg alatti területekkel, mely nem illeszkedik a klasszikus elképzelésbe. Innerválhatnak egyrészt kiterjedt, másrészt jól lokalizálható, de számos egymástól távoli kérgi területet, változatos lamináris rosteloszlással, valamint egyes régiók kéreg alatti kimenetekkel is rendelkeznek. Mindemellet bemeneteik sem szükség szerűen szenzoros információt hordoznak.

Az intralamináris (IL) magkomplex egy különleges vetítési mintázattal rendelkező, sokféle funkciót betöltő talamikus régió. Szerepét kimutatták kognitív folyamatokban, az alvás-éberlét ciklus szabályozásában és motoros feladatokban. Gazdagon innerválja a frontális kérgi motoros területeket és a striátumot. Kimeneteinek sokszínűsége mellett innervációjának változatossága is hozzájárul funkcionális diverzitásához, és felveti annak lehetőségét, hogy az IL több egyszerű átkapcsoló állomásnál, amely hűségesen továbbítja a bejövő információt. Sokkal inkább funkcionálhat elosztóként, melybe kéreg alatti modulátoros bemenetek és más típusú információk is érkeznek különböző forrásokból, és amely hozzáfér mind kérgi területekhez, mind pedig a mozgásszervező törzsdúcokhoz a striátumon keresztül.

Az említett funkcionális sokszínűség azonban nem csupán serkentő, hanem gátló bemeneteinek is köszönhető. A talamuszban a gátlás általános forrása a retikuláris talamikus mag (TRN), ám egyes magokba, mint az IL komplexbe is, talamuszon kívüli forrásból is érkeznek gátló bemenetek.

A Zeilhofer és munkatársai által 2005-ben létrehozott GlyT2::eGFP transzgenikus egértörzs vizsgálata felvetette egy új extralamikus gátló pálya létezésének lehetőségét. Ezekben az állatokban a glicinerg gátló sejtek zölden fluoreszkálnak megfelelő gerjesztő fény alkalmazása esetén, és egy erős, fluoreszcens jel mutatható ki a talamuszukban.

A talamikus információ-feldolgozás egy más aspektusa az egyes magok lehetséges integratív működése. Ezekben a területeken a klasszikus kéreg alatti szenzoros „driver” bemenetek mellett más hasonló tulajdonságokkal bíró terminálisok is megfigyelhetők. Ezek a kéreg 5. rétegének piramis sejtjeiből erednek és a talamokortikális (TC) sejtek olyan dendritikus szegmensein végződnek, melyeken a szenzoros „driver” bemenetek is. Ezen különböző eredetű „driver” terminálisok eloszlását munkacsoportunk korábban feltérképezte a teljes főemlős talamuszban. Ez alapján kiderült, hogy bizonyos talamikus régiókban elkülönülve, másokban együtt fordulnak elő a kérgi és kéreg alatti „driverek”, sőt olyan területek is megfigyelhetők voltak, amelyekben egyáltalán nem volt ilyen terminális. A különböző eredetű „driver” terminálisok kolokalizációja felveti egy sejten való konvergenciájuk lehetőségét, és ezzel együtt az is, hogy egy ilyen sejt kimenetét teljesen eltérő üzenetek együttesen határozzák meg.

## **Célkitűzések**

A serkentő és gátló bemenetek gyakran egy talamusz magon belüli sokszínúsége, valamint az innervált kérgi és kéreg alatti területeken megfigyelhető vetítési mintázat heterogenitása azt mutatja, hogy a jól ismert relé funkció mellett, a talamusz jelentős része szerepet játszhat az információ-feldolgozá minőségi alkátásában, és összetett kivitelező funkciókkal is rendelkezhet.

Munkacsoportunk a Glyt2::eGFP transzgenikus egértörzsben egy IL magokra specifikus glicinerg bemenetet fedezett fel, valamint felmerült a különböző eredetű „driver” bemenetek egy TC sejten való konvergenciájának lehetősége rágcsgáló szomatoszenzoros talamuszában.

Doktori munkám során a talamikus működés két eltérő aspektusával foglalkoztam. Egyrészt vizsgáltam az IL magokba érkező glicinerg gátlás mozgásszabályozásban betöltött szerepét,

másrészt tanulmányoztam a különböző eredetű serkentő „driver” bemenetek konvergenciáját.

Céljaim a következők voltak:

1. sejt és hálózati szinten jellemezni az IL magok glicinerg bemenetét, valamint karakterizálni a glicinerg sejtek *in vivo* aktivitását.
2. leírni a glicinerg pálya szelektív aktivációjának hatását az IL talamusz sejteire és az állat viselkedésére.
3. meghatározni a glicinerg sejtek bemeneteit és jellemezni a sejtek működésére gyakorolt hatásukat.
4. bemutatni a TC sejtek lehetsége integráló működését a konvergáló „driver” bemenetek morfológiájának jellemzésével.

## Módszerek

### Kísérleti állatok

#### *GlyT2::eGFP* egértörzs

A kettes típusú glicin transzporter (GlyT2) egy sejtmembránban lokalizálódó fehérje molekula, melynek feladata az extracelluláris térben lévő glicin sejten belüli felhalmozása. Miután a glicin elérte a megfelelő intracelluláris koncentrációt, a vezikuláris gátló aminosav transzporter (vIAAT) feldúsítja azt a szinaptikus vezikulákban, így téve lehetővé, hogy neurotranszmitterként funkcionáljon. A GlyT2 fehérjét minden glicinerg sejt kifejezi, így azok szelektív markerének tekinthető. 2005-ben Zeilhofer és munkatársai létrehoztak egy ún. GlyT2::eGFP transzgenikus egértörzset, melyben a GlyT2 gén promóterének kontrolja alatt eGFP expresszálódik, így a glicinerg sejtek zölden fluoreszkálnak. Az ezekben az állatokban végzett pályajelölés és juxtacelluláris elvezetéses kísérletek lehetővé tették a jelölt sejtek és rostok *post hoc* azonosítását.

### *GlyT2::cre egértörzs*

Ennek a törzsnek a létrehozása homológ rekombinációval történt baktériumokban, így a cre szekvencia bekerült a BAC-DNS-be (RP23-365E4-es klón). A módosított BAC-DNS-t C57BL/6 egerek megtermékenyített petesejtjeinek pronukleuszába injektálták. A törzset C57BL/6 háttérrel tartották fenn. A cre expresszió szelektivitását cre fehérje elleni immunreakcióval teszteltük (egér anti-cre 1:10,000. Millipore, Cy3-konjugált szamar anti-egér 1:500) keresztezett GlyT2::cre – GlyT2::eGFP egerekben. Ezekben a kísérletekben 198 cre pozitív sejtből 196 (99%) eGFP-re is pozitív volt. Ezeket az állatokat a glicinerg sejtek cre-loxP rendszerben történő szelektív jelölésére használtuk funkcionyeréses kísérletekben.

### *GlyT2::eGFP/Rbp4::cre egértörzs*

Ezekben az állatokban a glicinerg sejtek zölden fluoreszkálnak, a cre rekombináz pedig a kérgi ötödik rétegi (L5) piramissejtekben fejeződik ki a retinol kötő fehérje (Rbp4) génjéhez kapcsolódva. Ez a kettős transzgenikus vonal egyrészt lehetővé teszi a glicinerg sejtek azonosítását (l.: korábban), másrészt a L5 piramissejtek cre függő szelektív transzfekcióját.

## Morfológiai vizsgálatok

### *Műtét*

A jelölőanyag és a vírusok bejuttatása ketamin-xilazin altatásban történt (ketamin, 83-111 mg/kg; xilazin, 3.3-4.3 mg/kg). Az állat fejét sztereotaxiás készülékben rögzítettük (David Kopf Instruments, Tujunga, California 91042, Model 900 Small Animal Stereotaxic Instrument). Szükség esetén intramuszkuláris ketamin-xilazin injekcióval tartottuk fent az altatást.

## *A szövetek előkészítése*

**A szövet fixálása:** mind az anatómiai, mind pedig az elektrofiziológiai és viselkedési kísérletekre használt állatokat azonos körülmények között, azonos módszerekkel perfundáltuk. A fixálást követően az agyat 50-60 mikronos metszetekre vágtuk.

**Dehidráció és beágyazás:** A metszeteket beágyazás előtt ozmium tetroxiddal kezeltük majd felszáló alkoholsorral szobahőmérsékleten dehidráltuk, utolsó lépésben acetonnitril alkalmazva. A dehidrációt követően a metszeteket Durcupan műgyantába ágyaztuk.

**Immunohisztokémia:** Az összes reakciót TBS pufferben végeztük és a reakciók között 3x10 perces öblítést alkalmaztunk. Első lépésben elfedtük a nem specifikus kötőhelyeket (BSA), majd primer antitest oldat került a metszetekre öblítés nélkül. Ezt követte a fluoreszcens vagy biotinilált szekunder antitest. A biotinilált antitest leöblítése után a metszeteket avidin biotin peroxidáz komplexben (ABC) inkubáltuk, majd diamino benzidin (DAB), vagy nikkellel intenzifikált diamino benzidin (DAB-Ni) segítségével előhívtuk.

**Elektronmikroszkópia:** Az elektronmikroszkópos vizsgálathoz a fénymikroszkópos metszetek egy területét átágyaztuk, majd 60 nanométeres, ultravékony metszeteket készítettünk belőlük. Az így elkészült metszeteket formvar hártvány, réz vagy nikkellel gridekre szedtük fel.

## *In vivo fiziológia*

### *Műtét*

A kísérletekhez 20 darab felnőtt, hím C57Bl/6J BAC GlyT2::eGFP és GlyT2::cre egeret (20-30g) használtunk. A műtét, az akut kísérletek és a beültetés ketamin-xilazin altatásban történt. Az egereket intraperitoneális injekcióval elaltattuk, majd az altatás fenntartásához 30-50 percenként intramuszkuláris ketamin-xilazin injekciót alkalmaztunk.

## *In vivo* juxtacelluláris elvezetés és jelölés, helyi mezőpotenciál (LFP) elvezetés

A kérgi helyi mezőpotenciál monitorozásához bipoláris LFP elektródokat (FHC, ellenállás  $\sim 1 \text{ M}\Omega$ ) ültettünk az egerek frontális kérgébe (Bregma 1.7 mm; laterális -0.8 mm). Az elvezetett jelet erősítettük, szűrtük a 0.16 Hz - 5 kHz és a 100 Hz - 5 kHz sávra (Supertech BioAmp, Supertech, Pécs, Hungary), hogy a gyors sok sejttes aktivitást detektálni tudjunk, és 20 kHz-en mintavételeztük (micro 1401 mkii, CED, Cambridge, UK). Koncentrikus bipoláris stimuláló elektródot helyeztünk az IL talamuszba (Bregma -1.5 mm; laterális 2 mm; ventrális -3.2 mm,  $20^\circ$ -kal döntve, elektródok közötti távolság: 0.8mm). A PRF egy sejt aktivitást boroszilikát csőből húzott (1.5 mm külső átmérő, 0.75 vagy 0.86 belső átmérő, Sutter Instrument Co., Novato, CA, USA or WPI Inc. Sarasota, FL, USA), 0.5 M-os kálium acetátban oldott, 2% neurobiotinnal (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) töltött üvegkapillárisal vezettük el (*in vivo* impedance of 20-40  $\text{M}\Omega$ ). Az elektródokat piezo elektromos mozgatóval (Burleigh 6000 ULN or ISS 8200, EXFO, Quebec City, Quebec, Canada) juttattuk a PRF területére (Bregma -4.4 mm; laterális -0.8 to -1 mm; ventrális -3.8 to -4.8 mm). A jelet első lépésben DC erősítővel erősítettük (Axoclamp 2B, Axon Instruments/Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), második lépésben jelkondicionáló berendezéssel tovább erősítettük és szűrtük 0.16 Hz és 5 kHz között (LinearAmp, Supertech). A neuronális jelet Spike2 5.0 szoftverrel (CED) rögzítettük. A juxtacelluláris jelöléshez 2 Hz-es pozitív áram pulzusokat használtunk. A sejt ezek alatt a pozitív áramok alatt tüzelt. A kiváltott tüzelés alatt a sejt felvette a kapillárisból kijutó neurobiotint, és kijelölte a szómát és a proximális dendriteket. Egyes esetekben a disztális dendritikus régiók és az axon szintén jelölődött. A perfúziót és metszést követően a jelölt sejteket Cy3 konjugált streptavidin ellenanyaggal jelenítettük meg. A GlyT2::eGFP pozitivitást konfokális mikroszkóppal teszteltük

## *Analízis*

Az AP klaszterek meghatározásához egy beépített Spike2 7.0 (CED) script-tet használtunk. A kétcsúcú AP-ok közötti intervallum hisztogram (ISI) minimumánál elválasztottuk a két csúcot, így megkaptuk a az egymáshoz időben közeli AP-ok klasztereit. Az AP-ok fázisainak meghatározásához a kérgi sok sejt aktivitásra fektetett burkoló görbét 4 Hz-es alul áteresztő szűrővel transzformáltuk egy nulla eltolású FIR szűrőt használva. Kiszámoltuk a Hilbert-transzformáltját a szűrt és standardizált jelnek, majd meghatároztuk a fázist a komplex analitikus jel szögét felhasználva. A cirkuláris átlag szöget minden sejtre kiszámoltuk és az átlag körüli  $\pm 25\%$ -os percentilist ábrázoltuk.

## *In-vivo optogenetika és LFP elvezetés*

Két héttel a PRF sejtek transzfekcióját követően (AAV2-EF1a\_DIO-hChR2(H134R)-EYFP virus, AAV2-EF1a DIO-EYFP WPRE Hgh virus a control kísérletekhez) a GlyT2::cre állatokat ketamine-xilazin keverékével elaltattuk és fejüket sztereotaxisban rögzítettük. A fejbőr eltávolítása után a koponyát hidrogén peroxiddal megtisztítottuk, majd beültettük az elvezető csavar elektródokat, a referencia elektródot, az optikai szálakat a talamuszba (Thorlabs, FG105UCA,  $\varnothing 105 \mu\text{m}$  core, 0,22 NA, Bregma -1.9 to 2.3 mm; laterális -0.8 mm; ventrális -2.5 to -2.8 mm) és a rögzítő csavarokat. Az implantátumot réz hálóval vettük körül és Paladur cementtel rögzítettük. A műtétet követően az állatok melegítőpadon, és az első kísérlet előtt legalább 5 napig a ketrecükben regenerálódtak.

A szabadon mozgó kísérletekben az optikai stimulushoz 473 nm-es DPSS lézert (LRS-0473-PFM-00050-03, Laserglow Technologies, Toronto, Canada) használtunk. Az optikai szál végén mért lézerintenzitás  $318 \text{ mW/mm}^2$  volt a viselkedéses kísérletek és  $1272.73 \text{ mW/mm}^2$  az elektrofiziológiai kísérletek esetében.

Az agyi aktivitás monitorozásához a szabadon mozgó kísérletekben vagy bipoláris LFP elektródot, vagy a frontális kéreg fölé beültetett csavar elektródot használtunk. Egy másik csavar elektród szolgált referenciaként és földként. Ezeket, és az elvezető elektródokat is 16+2 csatornás Omnetics konnektorokhoz forrasztottuk (A79014-001, Omnetics Connector



Corporation, 7260 Commerce Circle East, Minneapolis, MN - 55432). Az LFP elvezetésekhez 30 másodperces lézer stimulációs protokolt alkalmaztunk és a jelet 128 csatornás erősítővel rögzítettük (Amplipex Ltd., Hungary). A “wavelet”-eket saját MatLab “script”-eket használva állítottuk elő. A mozgás analízist párizsi kollaborátoraink végezték (részletekért l.: Giber et al., 2015)

## Eredmények

### I – Új gátló bemenet a talamuszban

A talamikus retikuláris mag (TRN) GABAerg sejtei által közvetített jól ismert gátló pálya mellett, egyes talamikus magok más forrásból is kapnak gátló bemenetet. Ezek az ún. extratalamikus gátló bemenetek, csakúgy, mint a retikuláris magból eredő, tisztán GABAergiek. A GlyT2::eGFP transzgenikus állatok IL talamuszában azonban, felfedeztünk egy sűrű rosthálózatból álló glicinerg bemenetet.

A pálya eredetének felderítésére retrográd pályajelölő anyagot injektáltunk a glicinerg rostok által innervált magokba, és visszajelölt sejteket találtunk az azonos oldali hídi hálózatos állomány (PRF) *nucleus pontis oralis* és *caudalis* részében. 55.3%-a a talamuszba vetítő sejteknek glicinerg volt (n = 765 sejt 6 állatból).

A glicinerg rostok a talamikus sejtek proximális dendritikus régióin és sejttestjein végződtek, és az elektronmikroszkópos vizsgálatokból és a beágyazás utáni GABA reakcióból kiderült, hogy a terminálisok nagy méretűek, glicin mellett GABA-t is ürítenek és több szinaptikus aktív zónán keresztül létesítenek kapcsolatot a talamikus sejttel. A felfedezés fontosságát annak evolúciósan megőrzött jellege is alátámasztja, ugyanis a pálya hasonló rosteloszlással és morfológiai tulajdonságokkal humánban is megfigyelhető volt.

Hogy megfigyeljük a glicinerg sejtek *in vivo* aktivitását juxtacelluláris elvezetést alkalmaztunk altatott állatokban. 11 elvezetett és *post hoc* azonosított glicinerg sejtből 8 ritmikus akcióspotenciál (AP) klaszterekben tüzel, míg 3 sejt esetében alacsony alap aktivitást figyeltünk meg. Az átlagos tüzelési frekvencia csak úgy, mint a klaszteren belüli tüzelés (egy

sejt esetében és sejtek között is) nagy variabilitást mutatott és 2-23 Hz, valamint 12-100 Hz között változott (átlag =  $41.34 \pm 11.59$ , medián = 29Hz). Az AP klaszterk minden sejt esetében a kérgi oszcilláció adott fázisához voltak kapcsolatosak, és együtt lefedték a teljes “Up state”-“Down state” ciklust.

A glicinerg bemenet erőteljesen gátolta a juxtacelluláris elvezetéssel megfigyelt IL sejteket uretán altatás alatt. Ez a gátló hatás ritmikus tüzelést indukált, amely a kéregbe továbbítódva ritmikus oszcillációt váltott ki a talamokortikális hálózatban, egyre nagyobb területeket bevonva a szinkron működésbe. A hatás azonallí volt és csak a stimulus idejéig tartott. Hosszantartó változást nem figyeltünk meg a kérgi aktivitásban.

Szabadon mozgó állatokon végzett kísérletekben a glicinerg bemenet szelektív aktiválásával erőteljes viselkedésbeli hatást tudunk kiváltani, melynek során a minden folyamatban lévő cselekvés megszakadt. A stimuláló lézer intenzitásának fokozatos csökkentésével a hatás is fokozatosan csökkenést mutatott. A viselkedésbeli változásokkal párhuzamosan a kérgi működés megváltozása is észlelhető volt. Mind a viselkedésbeli, mind pedig a kérgi hatás tranziens volt, és csak a stimulus ideje alatt volt megfigyelhető. A fenti eredmények az IL talamusz egy sejt elvezetéseiivel összhangban arra engednek következtetni, hogy a gátló hatás a motoros működést befolyásolja és az IL magok közvetítik a kéregbe.

Hogy a PRF bemeneteinek forrását azonosítsuk, retrográd pályajelölő anyagot (fluorogold, FG) injektáltunk a glicinerg sejtek köré  $n = 4$  állatban. Nagy *rostrorocaudalis* kiterjedéssel visszajelölt sejteket találtunk a frontális motoros kérgi területek (másodlagos motoros kéreg, cinguláris kéreg) 5. rétegében. A vetítési mintázat feltérképezése céljából *cre* dependens vírust inyeztáltunk a korábban retrográd módon kijelölt régiókba. Ezekhez a kísérletekhez *RBP4::cre/GlyT2::eGFP* kettős transzgenikus egértörzset használtunk (l.: Anyagok és Módszerek). Számos középagyi és agytörzsi régió (köztük a PRF) erőteljes kérgi beidegzését figyeltük meg. Ebből arra következtethetünk, hogy a frontális motoros kérgi vetítés az agytörzsben nem szelektív sem magra, sem sejt típusra.

Az altatás mélysége hosszú elvezetések során nem állandó és stabil, melyet a kérgi oszcillációban bekövetkező változások jeleznek. Az altatás felszínesebbé válásával a kérgi

lassú hullámú oszcillációt spontán bekövetkező deszinkron periódusok szakítják meg. A PRF glicinerg sejteinek juxtacelluláris elvezetése mellett a kérgi oszcilláció változásait is monitoroztuk. Ahogy azt korábban említettem, a glicinerg sejtek a lassú oszcilláció alatt ritmikus, fázismodulált AP klaszterekben tüzeltek, de amint a lassú oszcillációt felváltotta egy spontán deszinkron szakasz, a PRF sejt tüzelése rögtön követte ezt a változást és tónusos aktivitásra váltott. A kérgi aktivitás helyreállításával a ritmikus klaszterek is visszatértek.

A kérgi aktivitás-változás kísérletes úton történő előidézéséhez 2 molos kálium klorid oldatot cseppentettünk a kéreg felszínére, ún.: “cortical spreading depression”-t (CSD) okozva ezzel a frontális kérgi régiókban. A CSD alatt a PRF sejtek ritmikus aktivitása szétesett, tüzelési frekvenciájuk csökkent. A KCl kimosásával a kérgi aktivitás helyreállt, melyet a PRF sejt tüzelésének részleges helyreállása követett.

Hasonló kísérleti elrendezésben teszteltük a kéreg-PRF pálya hatékonyságát, a PRF sejt kérgi stimulusra adott válaszána megfigyelésével. Először elektromosan aktiváltuk a kérget bipoláris stimuláló elektróddal 1-2 $\mu$ A-es stimulust alkalmazva. A glicinerg sejtek ( $n = 4$ ) rövid (10 ms) latenciával válaszoltak a kérgi aktivációra 1 Hz-es stimulust esetén. A stimulus frekvenciájának növelésével a válasz megbízhatósága csökkent. Az RBP4::cre\GlyT2::eGFP törzset használva a kérgi L5 piramis sejtekben szelektíven expresszáltattuk a Chr2 molekulát, így lehetőségünk volt fényel aktiválni azokat. 5 ms-os, ~1300 mW/mm<sup>2</sup> intenzitású pulzusokat alkalmaztunk, az optikai szálát az agy felszínére helyezve. Az elvezetett glicinerg sejtek, csakúgy mint az elektromos stimulus esetén rövid latenciával, és a stimulus frekvencia növelésével fordított arányos megbízhatósággal követték a kérgi L5 piramis sejtek aktivációját.

## II – Integráció a talamuszban – “driver ” bemenetek konvergenciája egy sejten

A talamusz serkentő driver bemenetei lehetnek mind kéreg alatti (klasszikus elsőrendű magok), mind pedig kérgi L5 eredetűek (magasabbrendű magok). Egymáshoz viszonyított eloszlásukat csoportunk korábban feltérképezte a teljes főemlős talamuszban és felvetette

egy sejten való konvergenciájuk lehetőségét. A konvergencia funkcionális vizsgálatához rágcsló első- és magasabbrendű szomatoszenzoros thalamuszának magjait (ventral posterior nucleus of the thalamus, VPM; posterior thalamic nucleus, P<sub>Om</sub>) használtuk modelrendszerként.

A kéreg alatti “driver”-eket kettes típusú vezikuláris glutamát transzporter (vGlut2) elleni immunreakcióban jelöltük (a vGlut2 fehérje szelektíven expresszálódik a szubkortikális thalamuszba vetítő serkentő sejtekben). A kérgi L5 terminálisokat anterográdfolyamatjelölés útján jelenítettük meg. *Phaseolus vulgaris* lucoagglutinint (PHAL, n = 5 egér, n = 6 patkány) vagy biotinizált dextrans amint (BDA, n = 4 patkány) injektáltunk precízen az elsőrendű szomatoszenzoros kéreg (S1) ötödik rétegébe. Fontos megjegyezni, hogy ezzel a módszerrel nem tudjuk megjelölni az összes thalamuszba vetítő L5 sejtet, így a teljes L5 terminális populációnak is csak bizonyos hányadát tudtuk vizsgálni.

A vGlut2 pozitív kéreg alatti “driver” terminálisok inhomogén eloszlást mutattak a P<sub>Om</sub>-ben mind patkányban, mind egérben. Ennek alapján elkülönítettünk vGlut2 terminálisban gazdag és szegény régiókat és vizsgáltuk, hogy a L5 bemenet hogyan oszlik meg ezekhez viszonyítva. Mind a vGlut2 terminálisban gazdag, mind az abban szegény területeken megfigyeltünk L5 axonvágzódásokat. A konvergencia zónákon belül a két típusú “driver” egymás közvetlen közelében volt található és az elektronmikroszkópos mérések szerint a random mintához képest mindkettő vastag proximális dendritekkel képzett szinaptikus kapcsolatot (Mann-Whitney U test,  $p < 2.2 \times 10^{-16}$  mindkét esetben).

A korrelált fény és elektronmikroszkópos felvételek igazolták, hogy a két típusú bemenet valóban egy sejten konvergál. Az anatómiai bizonyíték mellett elektrofiziológiailag is igazolható volt a konvergencia: bajúszstimulálással egyidejűleg optikailag aktivált L5 piramis sejtek hatása szupralineárisan összegződött a thalamikus sejteken.

## Következtetések

### I - Új gátló bemenet a talamuszban

Kísérleteinkben rágcshalóban jellemeztünk egy *fromatio reticularis*-ból eredő, IL talamuszt innerváló, glicinerg-GABAerg pályát, melyet hasonló morfológiai tulajdonságokkal humánban is megtaláltunk. A glicinerg-GABAerg rostok nagy méretű terminálisokban végződtek és hatékony gátló szinaptikus kapcsolatot létesítettek a talamusz sejtek vastag proximális dendritjein, több aktív zónán keresztül. A glicinerg-GABAerg sejtek ritmikus AP klaszterekben tüzeltek, melyek kapcsolatosak voltak a kérgi oszcilláció különböző fázisaihoz. A kérgi aktivitás mind spontán, mind pedig farmakológiailag indukált deszinkronizációja szétteső AP klasztereket, és csökkent tüzelési frekvenciát eredményezett, míg a kortikális stimulációra rövid latenciával válaszoltak a sejtek. A pálya szelektív aktivációja szabadon mozgó állatokban a folyamatban lévő aktivitás felfüggesztéséhez, kisebb intenzitású stimulus esetén pedig kontralaterális irányú forgó mozgáshoz vezetett.

A talamuszban két fő forrását ismerjük a gátlásnak, melyek alapvetően eltérő tulajdonságokkal rendelkeznek. A retikuláris talamikus mag (TRN) GABAerg sejtjei rostrális oldalról, héjszerűen veszik körül a talamuszt és homogéneen innerválják annak összes magját. A rostok kis terminálisokban végződnek és egy-két aktív zónán keresztül létesítenek szinaptikus kapcsolatot a TC sejtekkel, dendritikus régióra való szelektivitás nélkül.

Ezzel szemben az extratalamikus gátlás több talamuszon kívül eső sejtcsoportból érkezik (*zona incerta*, Zi; *anterior pretectum*, APT; *substantia nigra pars reticulata*, SNr). Ezek a sejtcsoportok specifikusan vetítenek bizonyos talamikus területekre, és nagyméretű, több aktív zónával rendelkező terminálisokban végződnek a TC sejtek vastag proximális dendritjein. Ahogy azt korábbi tanulmányokban leírták, az IL komplex számos extratalamikus gátló pálya egyik célterülete. A PRF-talamikus pálya felfedezésével egy új extratalamikus gátló magcsoportot írtunk le, amely a korábban felfedezettekéhez hasonló morfológiai és fiziológiai tulajdonságokkal rendelkezik.

A talamikus és extratalamikus gátlás eltérő módon formálja a talamokortikális kommunikációt és a viselkedést, a pályák morfológiai és fiziológiai tulajdonságainak köszönhetően. A TRN nagy talamokortikális hálózatokon fejt ki hatását, azonban topografikus, pontszerű kapcsolata a talamusz sejtcsoportjaival lehetővé teszi, hogy lokálisan, térben fókuszáltan is működjön. A TRN hatása időben elnyújtott hiperpolarizáció, amely alacsony küszöbű, visszacsapó  $Ca^{2+}$  mediált kisülés sorozatokat (burst) eredményez. Ezek a kisülés sorozatok újabb TRN sejteket aktiválnak, így a ciklus láncreakcióvá válva, egyre nagyobb hálózatokat bevonva folytatódik.

Ezzel szemben az extratalamikus rendszerek térben specializált, időben precíz gátlást valósítanak meg a posztszinaptikus talamusz sejteken. Nem csupán kiválasztott magokba vetítenek, de denritikus régió-szelektivitást is mutatnak. Időbeli precizitásukat az általuk formált szinaptikus kapcsolat tulajdonságainak, és a sejtek magas tüzelési frekvenciájának is köszönhetik.

A tér- és időbeli specializáltság tetten érhető a *zona incerta* szenzoros információt előrecsatoló módon kapuzó hatásában. A POM magot célzó, trigeminális magból eredő rostok kollaterálisaiakon keresztül aktiválják a Zi GABAerg sejteit, melyek gyorsan és hatékonyan hiperpolarizálják a POM sejteket, így gátolva meg a szubkortikális serkentés érvényre jutását. Ez a nagy időbeli precizitású szenzoros blokk kizárólag a POM-ben fordul elő.

A disszertációban bemutatott PRF-IL pálya szintén nagy időbeli precizitást mutat. Ahogy az kísérleteinkből kiderült, a glicinerg rostok *in vitro* nagy frekvenciás aktiválása, nem depresszálo IPSC-eket eredményezett a posztszinaptikus talamikus sejten. Tekintve, hogy a PRF sejtek AP klaszteren belüli tüzelési frekvenciája magas volt az elvezetéseink során, a szinapszis nem depresszálo jellege *in vivo* körülmények között is releváns.

## II - Integráció a talamuszban

Kísérleteinkben feltérképeztük az anterográdo módon jelölt, S1 kéregből eredő, és az immunjelölt trigeminális terminálisokat rágcsló szomatoszenzoros talamuszában. A két

típusú terminális kolokalizációját figyeltük meg a magasabb rendű szomatoszenzoros magban (POm). Mindkét típus „driver” jellegeket hordozott: több aktív zónán keresztül létesítettek szinaptikus kapcsolatot vastag proximális dendritekkel. Korrelált fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatokban kimutattuk, hogy a két különböző eredetű „driver” egy sejten konvergál. Ezeket az eredményeket elktrofiziológiai kísérletek is alátámasztották.

Eredményeink felvetik a talamikus információ feldolgozás egy új módját, melyben két alapvetően különböző információ határozza meg a TC sejt aktivitását. A POm sejtek csak azokban az esetekben voltak képesek tüzelni és információt közvetíteni a kéregbe, ha kéregből eredő „driver” szignál a szenzorossal egyidejűleg érkezett a sejtre.

## Saját publikációk jegyzéke

Giber K\*, Diana MA\*, **M Plattner V\***, Dugué GP, Bokor H, Rousseau C V, Maglóczy Z, Havas L, Hangya B, Wildner H, Zeilhofer HU, Dieudonné S, Acsády L (2015) A subcortical inhibitory signal for behavioral arrest in the thalamus. Nat Neurosci 18:562–568.

Groh A, Bokor H, Mease R a, **Plattner VM**, Hangya B, Stroh A, Deschenes M, Acsády L (2013) Convergence of Cortical and Sensory Driver Inputs on Single Thalamocortical Cells. Cereb Cortex:1–13.

\*megosztott első szerző

Összesített impakt faktor: 24.76



## **Köszönetnyilvánítás**

Mindenekelőtt szeretném megköszönni Lacinak és Hajninak, hogy folyamatosan segítették és vezették a munkámat mind egyetemi, mind PhD éveim alatt.

Köszönöm a labor minden egyes tagjának a stimuláló környezetet és a rengeteg toleranciát, melyre sokszor nagy szükség volt. Köszönöm társszerzőimnek, különösen Marco-nak és Kristófnak a fáradhatatlan munkát és azt, hogy kérdéseikkel és tanácsaikkal segítettek saját eredményeim jobb értelmezésében.

Őszintén köszönöm Varga Viktornak, hogy házi védésem opponenseként lelkiismeretes bírálatával segített még jobban megértenem és kontextusba helyezni a munkámat. Külön köszönöm Mark Eyre-nek, hogy nyelvtani és stilisztikai hibáim kijavítása mellett időt szánt a dolgozatom szakmai értékelésére is.

Végül de nem utolsó sorban hálásan köszönöm szüleimnek a türelmet, a nyitottságot és azt, hogy végig támogattak az egyetemi és doktori tanulmányaim alatt, valamint húgomnak, hogy mindig szakított időt a beszélgetésre.