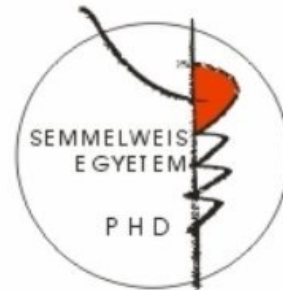


Térfüggő mechanizmusok szerepe a hippocampalis szemcsesejtek dendritikus információfeldolgozásában

Doktori értekezés

Brunner János

Semmelweis Egyetem
Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Szabadics János, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Szücs Péter, Ph.D., tudományos főmunkatárs
Dr. Petheő Gábor, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Enyedi Péter, DSc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Halasy Katalin, DSc., egyetemi tanár

Dr. Gerber Gábor, CSc., egyetemi docens

Budapest
2017

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
1. BEVEZETÉS	6
1.1. A hippocampus	6
1.2. A DG szerepe a hippocampalis információfeldolgozásban	11
1.3. A szemcsesejtek alaktani és élettani sajátosságai	14
1.4. Dendritikus folyamatok a szemcsesejtekben	18
1.5. Az értekezés első felében tárgyalt kutatás előzményei	23
1.6. Az értekezés második felében tárgyalt kutatás előzményei	26
2. CÉLKITŰZÉSEK	29
3. MÓDSZEREK	30
3.1. In vitro túlélő agyszelet preparátum készítése (1. és 2. projekt)	30
3.2. Használt oldatok (1. és 2. projekt)	30
3.3. Patch-clamp kísérletek (1. és 2. projekt)	31
3.4. Elektrofiziológiai mérések nagy ellenállású pipetták felhasználásával (2. projekt)	34
3.5. Szomato-dendritikus elvezetések (2. projekt)	48
3.6. Káliumáram mérések (2. projekt)	50
3.7. Kalciumáram mérések (2. projekt)	51
3.8. Az elvezetett sejtek azonosítása elektrofiziológiai és anatómiai tulajdonságaik alapján (1. projekt)	52
3.10. Kalciumáramok modellezése (2. projekt)	58
3.11. Kalciumjelek mérése konfokális mikroszkóp segítségével (2. projekt)	61
3.12. Kalciumjelek mérése spinning-disc konfokális mikroszkóp segítségével (2. projekt)	63
3.13. Kételektrodás dinamikus-clamp kísérletek (2. projekt)	63
3.14. Lokális glutamát felszabadítás a konfokális mérőrendszer segítségével (1. és 2. projekt)	66
3.15. A szemcsesejt bemeneti szinaptikus plaszticitásának vizsgálata (2. projekt)	67
3.16. Statisztikai módszerek (1. és 2. projekt)	68
4. EREDMÉNYEK I.	69
4.1. Az mGluR2 hiperpolarizáló hatású ionsatornát nyit ki	69

4.2. Az mGluR2 aktivációja G-fehérjén keresztül GIRK csatornák kinyitásához vezet	72
4.3. Az mGluR2 hiperpolarizáló hatása csak a szemcsesejteken figyelhető meg a vizsgált hippocampalis sejtípusok között.....	75
4.4. Az mGluR2 a dendriten nyitja ki a GIRK csatornákat	76
4.5. Az mGluR2 hatására a GIRK csatornák egy jól körülhatárolható proximális dendritszakaszon nyílnak ki.....	80
4.6. A gátlás dendritikus helyzete biztosítja az egyes dendritek szelektív és egyenletes szabályozását	87
5. EREDMÉNYEK II	92
5.1. A sejttest membránpotenciálja távolságfüggő módon befolyásolja a bAP alakját	92
5.2. A távolságfüggő kétirányú moduláltság megmutatkozik a bAP-hoz köthető kalciumjelekben is	97
5.3. Modell-áramok építése a bAP-hoz kötődő kalcium beáramlás vizsgálatához.....	99
5.4. Távoli dendriteken a bAP-csúcs csökkenése felel a kisebb kalcium beáramlásért	101
5.5. A proximális dendriteken megfigyelt keskenyebb bAP önmagában nagyobb kalcium beáramlást eredményez.....	104
5.6. A keskenyebb bAP akkor vezet nagyobb kalcium beáramláshoz, ha kellően gyors a kalciumcsatornák inaktivációja	106
5.7. A kalciumjelek analóg modulációjában alapvető szerepet játszanak a dendritikus R-típusú kalciumcsatornák	108
5.8. Dinamikus membránpotenciál változások moduláló hatása a dendritikus kalcium jeleken.....	111
5.9. A bAP-k analóg információtartalma befolyásolja a serkentő szinapszisok plaszticitási folyamatait.....	114
6. MEGBESZÉLÉS	119
7. KÖVETKEZTETÉSEK.....	126
8. ÖSSZEFOGLALÁS	127
9. SUMMARY	128
10. IRODALOMJEGYZÉK.....	129
11. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA.....	149
12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	150

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ABGC – Felnőtt korban született szemcsesejt

AMPA – 2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il)propánsav, AMPA receptor agonista

ANOVA – Varianciaanalízis

4-AP – 4-Aminopiridin, káliumcsatorna blokkoló

AP – Akciós potenciál

APDC – (2R,4R)-4-Aminopirrolidin-2,4-dikarboxilát, mGluII receptor agonista

APICA – (RS)-1-Amino-5-foszfonoindán-1-karboxilsav, mGluII receptor antagonist

D-APV – (2R)-Amino-5-foszfonovaleriánsav, NMDA receptor antagonist

BAPTA – 1,2-bisz(o-aminofenoxi)etán-N,N,N',N'-tetraecetsav, kalcium kelátor

BDS-I – Blood-depressing substance-1, a K_v 3 káliumcsatorna család modulátora

CA1/2/3 – Cornu Ammonis 1/2/3, a hippocampus proper régiói

CNQX – 6-ciano-7-nitrokinoxalin-2,3-dion, kompetitív AMPA/kainát receptor antagonist

DCG IV – (2S,2'R,3'R)-2-(2',3'-dicarboxiciklopropil)glicin, mGluII receptor agonista

DG – Gyrus dentatus

DIC – Infavörös differenciál interferencia kontraszt videómikroszkópia

EPSP – Serkentő szinaptikus potenciál

Fluo 5F – kis affinitású fluoreszcens kalciumindikátor

GABA – Gamma-amino-vajsav

GC – Gyrus dentatus szemcsesejt

GDP- β -S – Guanozin-5'-[β -tio]difoszfát

GHK egyenlet – Goldman-Hodgkin-Katz egyenlet

GIRK – G-fehérjéhez kapcsolt befelé egyenirányító káliumcsatorna

GTP – guanozin-trifoszfát

I_A – Inaktiválódó káliumáram

I_{I_Ca} – Magas feszültségküszöbű, inaktiválódó kalciumcsatorna modell

LY341495 – (2S)-2-Amino-2-[(1S,2S)-2-carboxiciklopropil]-3-(xantil)-propánsav, mGluII receptor antagonist

mGluR2 – Metabotróp glutamát receptor 2

mGluR3 – Metabotróp glutamát receptor 3

mGluII receptor – A metabotróp glutamát receptorok II. csoportja

MNI-glutamát – (S)- α -Amino-2,3-dihidro-4-metoxi-7-nitro- δ -oxo-1H-indol-1-pentánsav, fotolabilis glutamátforrás

N_{I_Ca} – magas feszültségküszöbű, nem inaktiválódó kalciumcsatorna modell

NMDA – N-metil-D-aszparaginsav, NMDA receptor agonista

NNC 55-039 – (1S,2S)-2-[2-[[3-(1H-Benzimidazol-2-yl)propil]metilamino]etil]-6-fluoro-1,2,3,4-tetrahidro-1-(1-metiletil)-2-naftalenil ciklopropánkarboxilát, T-típusú kalciumcsatorna blokkoló

SKF97541 – (2R,4R)-4-Aminopirrolidin-2,4-dikarboxilát, GABA_B receptor agonista

SR95531 – 6-Imino-3-(4-metoxifenil)-1(6H)-piridazinbutánsav, GABA_A receptor antagonist

str. – Stratum

SuM – Nucleus supramammillarius

TEA – Tetraetil-ammónium, káliumcsatorna blokkoló

TTX – Tetrodotoxin, nátriumcsatorna blokkoló

uEPSP – MNI-glutamát fotolízisével kiváltott serkentő szinaptikus potenciál

bAP – Visszaterjedő akciós potenciál

VTA – Ventralis tegmentum

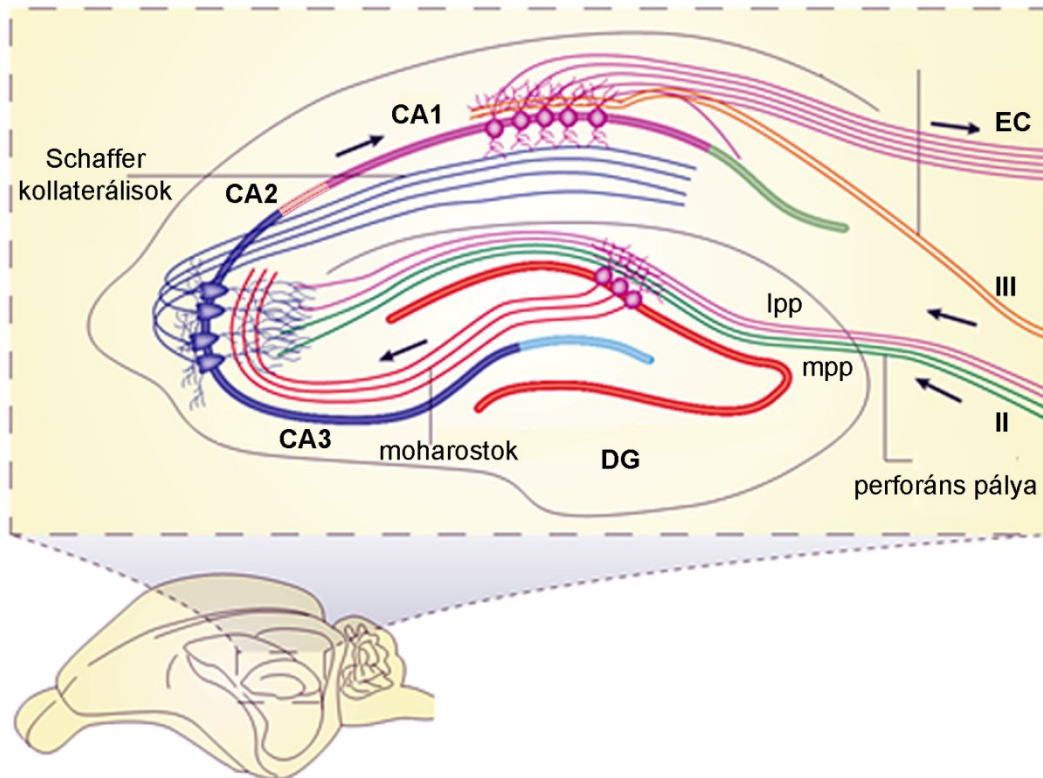
1. BEVEZETÉS

A külvilágról alkotott ismereteink rendszerbe foglalásában kulcsszerep hárul a hippocampus nevű ősi agykérgi régióra, ami más kérgi területekkel együttműködve alapvető szerepet játszik bizonyos tanulási folyamatokban, a memórianyomok kódolásában és tárolásában, illetve a térbeli tájékozódásban is^[1-3]. Jelentőségét megerősíti, hogy egy evolúciós értelemben jól megőrzött idegrendszeri struktúra, melynek lényegi felépítése nagyfokú hasonlóságot mutat az összes emlősben. Viszonylag egyszerű felépítése és a különféle idegrendszeri megbetegedésekben betöltött szerepe^[4,5] miatt a hippocampus az elmúlt évtizedek alatt az idegrendszeri kutatások egyik legfőbb tárgyává vált. Maga a hippocampus több részterületre osztható fel, melyek közül az egyik a *gyrus dentatus*-nak (DG) nevezett régió. Doktori munkám alatt a DG fő sejteiben, a szemcsesejtekben zajló információ feldolgozás különböző aspektusait vizsgáltam meg kombinált *in vitro* mérés technikák alkalmazásával. Ennek megfelelően az irodalmi áttekintés elsősorban a DG és a szemcsesejtek bemutatására összpontosít.

1.1. A hippocampus

Rágcsálókban a hippocampus hosszan elnyújtott, ívelt alakja az agy középvonalától (szeptális/dorzális rész) a temporális lebenyig terjed (temporális/ventrális rész). Átmetszeti képét vizsgálva két területet különíthetünk el, melyek két egymásba forduló C betűhöz hasonlóan kapcsolódnak egymáshoz (1. Ábra). Az egyik ilyen terület a *gyrus dentatus*, a másik pedig a *hippocampus proper*, mely morfo-funkcionális szempontból további régiókra osztható fel. Ezeket a régiókat a DG-től távolodva sorrendben CA3, CA2 és CA1 régióknak nevezzük^[6]. A hippocampus minden régiójára – így a DG-re is – általánosan jellemző, hogy a régió funkcionális kimenetét reprezentáló serkentő sejtek egyetlen rétegbe tömörülnek. Ennek megfelelően a sűrűn egymás mellé rendeződött szemcsesejtek alkotják a szemcsesejt réteget (*stratum granulosum*). A DG idegsejtekben szegény külső rétege a molekuláris réteg (*stratum moleculare*), mely a szemcsesejtek dendritjeit és az őket beidegző afferens pályákat foglalja magába. A szemcsesejtek

rétege és a CA3 régió által közrezárt terület a *hilus*, melynek fősejtjei, a mohasejtje tekkinthetők a DG másik fő serkentő sejtípusának^[7].



1.Ábra. A hippocampus régiói és belső kapcsolatrendszere

A hippocampus átmetszeti képének sematikus vázlata az egyes alrégiókkal és az információáramlást biztosító idegpályákkal. DG: gyrus dentatus, CA3, CA2 és CA1: a hippocampus proper egyes részterületei, EC: entorhinális kéreg, mpp: mediális perforáns pálya, lpp: laterális perforáns pálya, II: az entorhinális kéreg második rétege, III: az entorhinális kéreg harmadik rétege (Forrás:^[8], módosítva)

Az agykérgi kapcsolatrendszerek egyik legmarkánsabb jellemvonása, hogy az egyes régiók tipikusan kétirányú kölcsönhatásban állnak egymással. A hippocampus esetében azonban már Santiago Ramón y Cajal felismerte, hogy a kiterjedt visszacsatolást biztosító kapcsolatok hiánya miatt az információ áramlása lényegében egyirányú^[9,10]. A szemcsesejtek kimenetét formáló rostok a hiluson keresztül a CA3-ba futnak, ahol ez a tömör rostköteg egy önálló réteget formáz a CA3 piramissejtek csúcsdendritjének proximális szakaszán. Egészséges körülmények között a rágcsálókban a szemcsesejtek egymással közvetlenül nem képeznek szinaptikus kapcsolatokat, bár a helyi

gátlósejteken keresztül, illetve a hiláris mohasejtek közvetítésével hatással vannak egymás működésére. A DG szintjén feldolgozott információ tehát a CA3 területére vetül, ahol azonban egészen másféle kapcsolati sémával találkozhatunk. Az itt található piramissejtek ugyanis egymást beidegezve egy közvetlen serkentő hálózatot alakítanak ki. A CA3 piramissejtek kiterjedt serkentő kapcsolatrendszere a lokális hálózat mellett a DG területére és a CA2 régióra is kiterjed^[11], kimenetét azonban elsősorban a CA1 területén végződő axonágak, az úgynevezett Schaffer kollaterálisok jelentik.

A CA2 régió kapcsolatrendszerének teljes feltárása nagyon sokáig váratott magára, de a genetikai eszköztár rohamos fejlődése ma már lehetővé teszi ennek a sokáig mellőzött régióknak a részletes vizsgálatát is. A mellőzöttség ugyanis elsősorban abból eredt, hogy a CA2 régió méretét tekintve sokkal kisebb a többi hippocampalis régióknál. Rágcsáló esetén egy kis sejtcsoportról beszélünk, melynek ráadásul a határvonalai is bizonytalanok. A régió klasszikus anatómiai meghatározása a CA2 kapcsolatrendszerén alapul. Az az átmeneti sejtpopuláció jelenti ugyanis a CA2-t, mely már nem kap közvetlen beidegzést a DG felől (kívül esik a stratum lucidumon), de elkülöníti a CA1 régiótól az a tulajdonság, hogy a fő kérgi bemenete az entorhinális kéreg II. rétegéből indul, míg a CA1 piramissejtek esetén a bemenet eredete a III. réteg^[12]. Az elmúlt néhány évben sikeresen azonosítottak néhány olyan genetikai jelölőfehérjét, melyeknek a jelenléte egyértelmű korrelációt mutatott a CA2 régió anatómiai határaival^[13-15]. Ennek megfelelően ma már sok tudományos kutatás a markerfehérjék jelenlétét használja fel a régió azonosítására a szubjektív anatómiai határvonalak helyett. Az anatómiai meghatározással ellentmondva Susumu Tonegawa munkacsoportja kimutatta, hogy a moharostok igenis közvetlen kapcsolatban állnak a CA2 piramissejtekkel, bár a kapcsolat jellege több szempontból eltér a CA3-ban megfigyelttől^[15]. A CA2 kimenetét adó piramissejt-axonok a CA1 területén végződnek. Az eddigiek alapján tehát azt figyelhetjük meg, hogy a hippocampus-ba befutó információtömeg a DG-CA3/CA2 irányban áramlik a CA1 régió felé. Itt újfent egy olyan kapcsolatrendszerrel találkozunk, amelyben nincs közvetlen serkentés a helyi piramissejtek között, és hiányzik a serkentő visszacsatolás a többi régió felé, mert a piramissejtek axonja elhagyja a hippocampus proper területét.

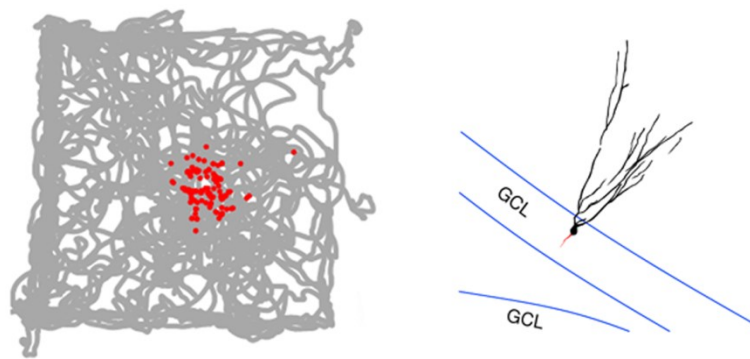
A hippocampus-ba beáramló információ egyik legjelentősebb forrása a multimodális asszociációs kérgi régiókkal kapcsolatot biztosító entorhinális kéreg. Az entorhinális kéregből beérkező idegrostok a perforáns pályába tömörülnek, melyben a DG, a CA3 és a CA2 területén végződő axonok az entorhinális kéreg II. rétegének csillagsejtjeitől erednek, míg a III. rétegből kiinduló rostok a CA1 területére futnak (1. Ábra). A perforáns pálya a DG területén a str. moleculare külső kétharmadában végződik, és anatómiai szempontok alapján további részekre osztható fel. Az entorhinális kéreg laterális régiójából eredő rostok (laterális perforáns pálya) ugyanis a str. moleculare külső részét foglalják el, míg a mediális entorhinális kéreg (mediális perforáns pálya) a str. moleculare középső szakaszába vetít. A fent elmondott kanonikus kapcsolat mellett Deller és munkatársai emellett leírtak egy olyan pályát is, amely az entorhinális kéreg mélyebb (IV-VI.) rétegeiből ered, és a szemcsesejtek proximális dendritjein végződik^[16]. A molekuláris réteg belső harmadának serkentő szinapszisait döntően azonban a hiláris mohasejtek visszavetítő kapcsolatai, illetve a különféle kéregalatti régiókból eredő rostok formálják. A CA régiókban a perforáns pálya a piramissejtek legtávolabbi dendritszakaszához fut a stratum lacunosum-moleculare területén. Szépen kirajzolódik tehát egy olyan topológiai elrendezés, amelyben a hippocampus-on kívülről érkező kapcsolatok a fősejtek távolabbi dendritszakaszain végződnek, míg a belső kapcsolatrendszer serkentő szinapsziszai általában a sejttesthez közeli dendritszakaszokat preferálják. Az entorhinális kéreg és a hippocampus viszonyát különösen érdekessé teszi, hogy a CA1 régió piramissejtjei közvetlenül visszavetítenek az entorhinális kéreg mélyebb rétegei felé. Látni kell tehát, hogy az erősen egyenirányított kapcsolatrendszerrel függetlenül a hippocampus mégiscsak egy nagy információ feldolgozó hurkot képez^[17], ahol az információ eredési és végpontja egyaránt az entorhinális kéreg (1. Ábra). Az itt vázolt séma az információáramlás egyszerűsített vázlat, amely csak az egyes területek serkentő fősejtjei között fennálló kapcsolatokat veszi figyelembe. Meg kell azonban jegyezni, hogy az előrevetítő és visszavetítő gátlás révén minden egyes régió esetében kiemelten fontos szerepet játszanak a gátló interneuronok a helyi információfeldolgozásban^[18-20]. A kérgi kapcsolatok mellett a hippocampus számos kéreg alatti területtel is közvetlen kapcsolatban áll. Ezek általában kyszámú sejtől eredő, de sok sejt működését érintő, divergens kapcsolatokat jelentenek. Nagy funkcionális jelentőségű kétirányú kapcsolat áll fenn például a *septum* és a

hippocampus között. A hippocampus összes régiója fogad GABA- és kolinerg rostokat a septumból, de a kétféle afferens pálya célsejtjei nem fednek át egymással^[21], mert a GABAerg rostok mindig helyi interneuronokon végződnek, míg a fősejtek elsősorban kolinerg beidegzést kapnak. A DG területén a kolinerg rostok nagyrésze a belső molekuláris rétegben fut, és szinaptikus kapcsolataik döntő többsége a szemcsesejteken végződik^[22]. Régióspecifikus, csak a DG és a CA2 területére érkező pálya indul a *nucleus supramammillarius*-ból (SuM,^[23]) és a *vetrális tegmentum* (VTA,^[24]) területéről. Az anatómiai bizonyítékok alapján klasszikusan úgy tekintjük, hogy a SuM-ból érkező rostok jelentős része glutamátot használ ingerületátvivő anyagként^[25], és jellemzően kimutatható bennük a calretinin nevű kalciumkötő fehérje jelenléte. Ezt a feltételezést támasztja alá az is, hogy a vizsgált rostok nem tartalmaztak kimutatható mennyiségű GABA-t, mindemellett glutamáterg jellegű aszimmetrikus szinapsziszokat képeznek a szemcsesejtek proximális dendritjein. A legújabb eredmények azonban árnyalják a képet. Soussi és munkatársai^[26] ugyanis szintén megvizsgálták a kérdést, de ebben az esetben a közvetlen GABA immunfestés helyett olyan enzimek jelenlétét keresték, melyek egyértelműen bizonyítják a rostok GABA- vagy glutamáterg fenotípusát. A kísérleteik eredményeképpen arról számoltak be, hogy ez a pálya nem tekinthető homogénnek. A dorzális DG-t beidegző rostok elsősorban a SuM laterális részéből erednek, és kevert GABA-/glutamáterg jelleget mutatnak. A ventrális DG-be vetítő pálya a SuM mediális részéből ered és valóban tisztán glutamáterg rostok alkotják. Az is kiderült, hogy a SuM eredetű axonterminálisok egy része egyidejűleg mind GABAerg, mind glutamáterg tulajdonságokat mutat, ami felveti a GABA és a glutamát együttes ürülésének a lehetőségét is^[27]. Míg a SuM esetében a GABA/glutamát együttes felszabadulása még nem teljesen bizonyított, addig VTA területéről kiinduló afferens pálya esetében már egyértelmű bizonyítékok támasztják alá az előfordulását^[24]. A SuM és a septum alapvető szerepet játszik a kérgi aktivitásmintázatok egyik legjellegzetesebb típusának, a théta ritmus szabályozásában, míg a közvetlen VTA bemenet összeköttetést biztosít az agy belső jutalmazási rendszerével. Láthatjuk tehát, hogy a DG több, funkcionálisan eltérő agyterülettel is közvetlen kapcsolatban áll.

1.2. A DG szerepe a hippocampalis információfeldolgozásban

A DG-t a kiterjedt kapcsolatrendszere és belső anatómiai elrendezése többféle feladat ellátására is alkalmassá teszi. Vegyük sorra, hogy mik is lehetnek ezek a feladatok. A '70-es évek elején David Marr egy roppant előremutató hálózati modell segítségével rávilágított arra, hogy a hippocampus felépítése és kapcsolatrendszere révén potenciálisan alkalmas információk tárolására és előhívására^[28]. Bár Marr modellje nem tulajdonított különösebb szerepet a DG-nek, mégis ez a modell egyfajta kiindulási pontnak tekinthető, ami alapján hálózat-elméleti kutatások sora vizsgálta az egyes hippocampalis részterületek szerepét a memória folyamatokban. Marr elmélete alapján a CA3 piramis sejtek hálózata képes arra, hogy az egymás között fennálló kapcsolataik súlyán keresztül megőrizzék azokat a populációs szintű aktivitásmintázatokat, melyek a beérkező információ hatására kialakulnak. Ebben a kontextusban a beérkező információ az afferens rostok aktivitásmintázataként értelmezhető. Később aztán a piramis sejtek képesek lesznek az eredeti információ hatására mutatott aktivitásmintázat előállítására, egy részleteiben hasonló információ érkezése esetén. Ezek a hálózatok azonban bizonyos szempontból nagyon törékenyek, ugyanis könnyen előfordulhat bennük, hogy többféle beérkező mintázat is ugyanannak a memóriajelnek az előhívásához vezet. Az ilyen jellegű interferencia kiküszöbölésének egyik hatékony módja, ha a CA3 régió már előzetesen feldolgozva kapja meg az információt egy olyan rendszer közvetítésével, ami a külvilág egymáshoz nagyon hasonló reprezentációit is képes egymással nem átfedő aktivitás mintázatokká alakítani (idegen kifejezéssel élve ez a „*pattern separation*” folyamata^[29-31]). A szemcsesejtek működése és a kapcsolati viszonyuk alapján a DG kiválóan alkalmas egy ilyen előzetes mintázat-elkülönítési feladat ellátására. Mindemellett a rekurrens kapcsolatokon alapuló hálózatok esetén a memória kódolásában elengedhetetlen egy „tanító” jellegű szinaptikus bemenet jelenléte is, ami kiváltja a kapcsolatok erősségének megváltozásához szükséges aktivitást a hálózatban. A szemcsesejtek és a CA3 piramis sejtek közötti kapcsolat eléggé erős ahhoz, hogy a szemcsesejtek aktivitása mintegy kijelölje a memórianyom kódolásában részt vevő piramis sejt csoportot. Az elméleti megfontolások mellett mára kísérletek sora bizonyítja a DG szerepét a memóriajelek kialakításában. Korszerű szóhasználattal élve engram sejteknek hívjuk azokat a sejteket, melyek aktívak egy adott tanulási folyamat során, és amelyek ismételt

aktivitása elégséges a tanult emlényom előhívásához^[32]. Az optogenetika eszköztára ma már lehetővé teszi az engram sejtek megjelölését, így célzottan befolyásolhatóak azok a sejtek, melyek egy adott emlényomot kódolnak. Ezt a technikai megközelítést hívjuk engram technikának. A DG azon tulajdonsága, hogy a sejtek kis hányadának aktivitása reprezentál egy adott emlényomot, méghozzá úgy, hogy minden emlényomot más és más sejtcsoport kódol, különösen alkalmassá teszi a szemcsesejteket az engram technikán alapuló vizsgálatokhoz. Denny és munkatársai bizonyították, hogy a DG nemcsak a memóriajel kialakításában, de a későbbi előhívásában is szerepet játszik^[33]. Az emlényomok kialakítása és tárolása mellett még egy olyan folyamat van, ami tipikusan a hippocampus-hoz köthető, ez pedig a térbeli tájékozódás. O'Keefe és Dostrovsky felismerte, hogy vannak olyan idegsejtek, melyek aktivitását elsősorban az élőlény térben elfoglalt helyzete határozza meg^[34]. Ezek az úgynevezett helysejtek az élőlény által bejárható tér egy bizonyos részén fokozott aktivitást mutatnak (2. Ábra). A térnek azt a részét, ahol ez a fokozott aktivitás megfigyelhető, az adott sejt helymezejének nevezzük. A helysejtek funkcionális jelentőségét populációs szinten lehet igazán értelmezni.



2.Ábra. Egy anatómiailag azonosított szemcsesejt helysejt-működése

Bal oldalon a szürke vonalhálózat az állat által a mérés során bejárt útvonalat ábrázolja, míg a vörös pontok jelzik, hogy hol volt aktív az elvezetett sejt a kísérlet alatt. Jobbra láthatjuk az elvezetett sejt rekonstruált alakját, és az elhelyezkedését a szemcsesejtrétegen belül. Az alaktani sajátosságok alapján a sejt egyértelműen egy szemcsesejt volt (Forrás:^[35], módosítva).

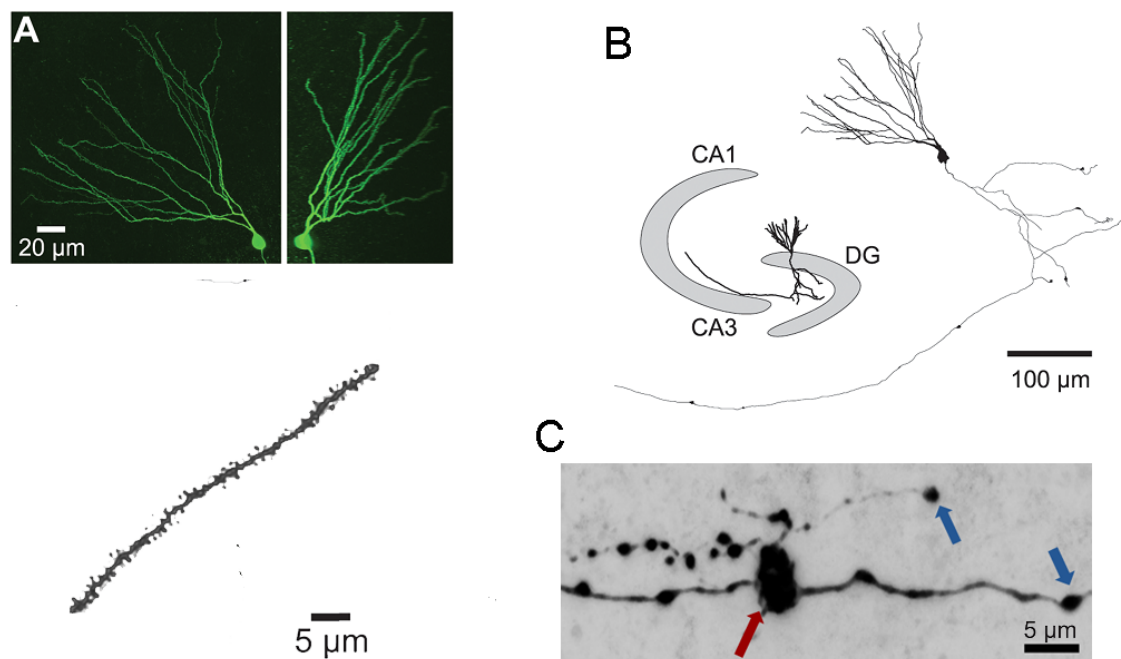
Mind a CA régiók piramisisejtjei, mind a szemcsesejtek között egyaránt találhatunk helysejteket, bár a helymezők tulajdonságaiban és a térinformáció kódolásában résztvevő sejtpopuláció nagyságában jelentős eltérések vannak az egyes régiók között. Az élőlény térbeli navigációja során az entorhinális kéregből beérkező információ alakul át a helysejtek által kialakított populációs kóddá, ezért a térinformáció helysejt aktivitáson alapuló feldolgozása lényegében megegyezik a külvilág felől érkező bármilyen más multimodális információ feldolgozásával. A térbeli tájékozódás során a szemcsesejtek valójában mintázat elkülönítést végeznek, mert a teret kódoló egyes mintázatok a szemcsesejtek egymással nem átfedő kis csoportjait fogják aktiválni. Lényegében a térbeli információfeldolgozás vizsgálata lett az ideális kísérleti modell a szemcsesejtekben zajló pattern separation tanulmányozásához, hiszen nagyon jól vizsgálható, hogy hogyan változik meg a sejtek aktivitása, ha elkezdjük megváltoztatni az állatot körülvevő tér tulajdonságait. Ennek megfelelően Leutgeb és munkatársai kísérletes úton is igazolták, hogy a szemcsesejtek valóban erőteljes mintázatalválasztó működést végeznek, mivel a tér kismértékű változása is lényegi eltéréseket okozott az elvezetett sejtek helymező mintázatában^[30]. Általánosan elfogadott nézetté vált, hogy a szemcsesejtek helymező mintázata alapvetően eltér a piramisisejtektől, mert míg a CA régió piramisisejtjeinek tipikusan egyetlen helymezeje van, addig a mérések szerint az aktív szemcsesejtek általában több helymezővel is rendelkeznek^[30,36]. Ennek a megállapításnak némileg ellentmondanak az újabb kutatási eredmények. Neunuebel és Knierim 2012-ben rámutatott arra, hogy az egyes sejtek helysejt tulajdonságai attól függenek, hogy a sejt hol helyezkedik el a DG területén belül, ugyanis a több helymezővel rendelkező, magasabb általános aktivitású sejtek zömében a szemcsesejtek rétege alatt, a hilus területén vannak. Tőlük jól elkülöníthetően egy olyan sejtpopuláció is jelen van a DG területén, melynek alacsony általános aktivitás és egyetlen helymező jellemzi a viselkedését. A szerzők felvetése szerint az érett szemcsesejtek valójában ez utóbbi populációhoz tartoznak, míg a több helymezővel rendelkező aktivitás vagy az éretlen szemcsesejteket vagy a hiláris mohasejteket jellemzi^[37] (később részletesen kifejtésre kerül majd, hogy mit értek az érett és éretlen szemcsesejt alatt). A legfrissebb eredmények szerint a legtöbb szemcsesejtnak valóban egyetlen helymezeje van (2. Ábra), és a korábban megfigyelt nagy alapaktivitású, több helymezővel rendelkező sejtek valójában mohasejtek^[35,38,39]. Érdekes kérdés, hogy milyen sejtszintű vagy

hálózati mechanizmus állhat egy adott sejt helysejt viselkedésének a hátterében. Katie Bittner és munkatársai^[40] CA1 piramis sejtek viselkedését tanulmányozva eredtek a kérdés nyomába és azt tapasztalták, hogy ebben az esetben a két fő serkentő idegpálya, vagyis a CA3 irányából érkező Schaffer kollaterálisok és az entorhinális kéregből érkező perforáns pálya egyidejű aktivitása által kiváltott dendritikus plató potenciál kulcsszerepet játszik egy adott sejt helymezejének létrehozásában.

1.3. A szemcsesejtek alaktani és élettani sajátosságai

A DG szemcsesejtjei alkotják a hippocampus legnépesebb sejtpopulációját, számuk a rágcsálókban is milliós nagyságrendűre tehető^[41]. Kisméretű, ovális sejttesttel rendelkező sejtekről van szó, melyek egy tömött rétegbe rendeződnek a DG területén. A piramis sejtektől eltérően nem csak egy fő csúcsi (apikális) dendritjük van. Vékony, erősen tüskés dendritjeik a sejttestből a molekuláris réteg felé futnak, ahol egyik irányban kissé lapított kúpra emlékeztető dendritfát formálnak (3.A Ábra). Tipikus esetben a sejttestből egy-két elsődleges dendrit indul ki, ami rövid távolságon belül többször is elágazik, két egyenértékű utód dendritet formálva. Az elágazási pontok zömében a molekuláris réteg belső felére korlátozódnak, vagyis abban a régióban, ahol a fő bemenetet jelentő perforáns pálya végződik, a dendritek már többnyire elérik végleges vastagságukat és egyenes lefutást mutatnak. A dendritfa térbeli kiterjedése a sejt DG-n belüli helyzetének függvényében változó, ennek köszönhetően a teljes dendrit hossz is tág tartományban mozog^[42]. Általánosságban az a jellemző, hogy a dendritfa nagyobb kiterjedésű a suprapiramidális lemezben elhelyezkedő sejtek esetében (2800 μm vs 3500 μm , infra vs supra^[43]). A dendrit hosszhoz hasonlóan a tüskével való borítottság is attól függ, hogy hol helyezkedik el a sejt, mert a mérések szerint a dendrittüskék átlagos sűrűsége nagyobb a suprapiramidális lemezben (1,3 tüske/ μm vs 1,6 tüske/ μm , infra vs supra^[44]). A fénymikroszkópos úton meghatározott dendrittüske sűrűség feltehetőleg alábecsüli a valós értéket, mert a dendrit által eltakart tüskék nem szerepelnek a számításban. Azok a tanulmányok, ahol ezt a hibaforrást kiküszöbölték (elektronmikroszkóp használatával, vagy utólagos korrekcióval) 2,2-2,4 tüske/ μm -es sűrűségről számolnak be^[45,46]. Mivel a serkentő kapcsolatok zömében a dendrittüskéken végződnek, ezért a sűrűségi adatok és a teljes dendrit hossz ismeretében megbecsülhető az egy szemcsesejtre érkező serkentő kapcsolatok száma, ami ennek megfelelően 3640 -

8400 serkentő szinapszist jelent sejtenként. Ez a tartomány egyértelműen kevesebb serkentő kapcsolatot jelent, mint amit például a CA1 piramis sejtek esetében leírtak (30000 serkentő szinapszis^[47]).



3.Ábra. *A szemcsesejtek alaktani sajátosságai*

A, Felül egy szemcsesejt fluoreszcens jelöléssel láthatóvá tett dendritfája látható. Az alsó kép egy dendrittűskékkel erősen beborított rövid dendritszakasz kinagyított képe. B, Ugyanazon sejt rekonstruált képe, ahol a somato-dendritikus régió mellett az axonfa jellegzetességei is megfigyelhetők. A sematikus kép a sejt és a fő axonág helyzetét mutatja a hippocampus-on belül. C, A fő axonágon elhelyezkedő mohaterminális, és a belőle kiinduló filopodiumok. A vörös nyíl a mohaterminálíst jelöli, míg a kék nyilak más jellegű, sokkal kisebb méretű boutonokra mutatnak (A és B panelek forrása:^[46], módosítva).

A szemcsesejtek axonját moharostnak hívjuk. Az axon eredési helye többnyire a sejttest, de előfordul az is, hogy valamelyik elsődleges dendritből indul ki. Általános rendezési elv, hogy a moharost helyi elágazások nélkül, mindig a hilus irányába halad, ahol viszont szerteágazó kapcsolatrendszer épít ki az itt található interneuronokkal és mohasejtekkel. A fő axonág a hiluson keresztül a CA3 régióba fut, ahol az egyes moharostok további elágazás nélkül sűrű rostkötegbe rendeződnek a str. lucidumban (3.B Ábra). A moharostok abban térnek el a többi agykérgi serkentő axontól, hogy a funkcionálisan eltérő axonterminálisaik szembetűnő alaki különbségeket mutatnak^[48,49]. A hagyományos méretű axonvégzódések mellett egy nagyon speciális anatómiai képlet, az úgynevezett mohaterminális is megfigyelhető a moharostokon. Ezek olyan nagyméretű – 2-8 µm átmérőjű – kerekded struktúrák, melyek mind a hilus, mind pedig

a CA3 területén megfigyelhetők (3.C Ábra). A mohaterminálisokból általában néhány filopodium – a fő axonnál sokkal vékonyabb, viszonylag rövid (2-50 μm hosszú) nyúlvány – indul ki, mely hagyományos méretű szinapszisban végződik. A mohaterminálisok specifikusan a mohasejteket és a piramissejteket idegzik be, míg a hagyományos axonterminálisok kizárólag interneuronokon végződnek^[49]. A specifikus anatómiai elrendezésnek köszönhetően jól megbecsülhető, hogy milyen az arány az egyetlen szemcsesejt által beidegzett fősejtek és interneuronok között. Mohaterminálisból mindössze 15-25 darab van az egyes axonokon, míg hagyományos méretű axonterminálisból akár kétszáz is lehet, ami arra utal, hogy az egyes szemcsesejtek számszerűleg sokkal több interneuronhoz kapcsolódnak, mint piramissejthez. Ez jól egybeesik a fiziológiai ismereteinkkel, miszerint a szemcsesejtek különösen erőteljes előreccatoló gátlást közvetítenek a CA3 felé^[50-52]. Láthatjuk, hogy mind a dendritekre, mind pedig az axonra vonatkozó morфомetriai adatok jelentős szórást mutatnak. A változatosság egyik forrása lehet a szemcsesejtek kapcsolatrendszerét jellemző nagymérvű plasztikusság. Kutatások kimutatták például, hogy a tanulási folyamatok a dendrittűskék számának növekedése kísérik^[53,54]. Hasonlóképpen, a moharost által formált szinapszisok száma és a posztzinaptikus célsejtek összetétele is megváltozik a tanulási folyamatok alatt^[55].

A szeletpreparátumokon végzett kísérletek alapján az érett szemcsesejtek nyugalmi viselkedését hiperpolarizált membránpotenciál és 100-300 M Ω közé eső bemenő ellenállás jellemzi^[46,56-58]. Ezek a tulajdonságok feltehetően hozzájárulnak ahhoz, hogy szeletpreparátum esetén a szemcsesejtek nem mutatnak spontán aktivitást. A rendelkezésre álló adatok szerint a szemcsesejteket élő állatokban is a rendkívül alacsony aktivitás jellemzi^[52,59,60]. Nyugalmi membránpotenciáljuk az *in vitro* adatokhoz hasonlóan hiperpolarizált^[61], azonban követi a DG-ben éppen zajló hálózati aktivitást. Ennek megfelelően nagy amplitúdójú membránpotenciál-változásokat is megfigyeltek, melyek időbeli dinamikája széles tartományban mozoghat^[59,62,63]. Például Hahn és munkatársai leírták^[62], hogy altatott állatban a szemcsesejtek membránpotenciálja követi a kérgi lassú hullám aktivitást (0,3-1,5 Hz), míg Pernia-Andrade és Peter Jonas tanulmányában^[63] azt olvashatjuk, hogy altatás nélküli állatokban a membránpotenciál kapcsolatot mutatott az extracellulárisan mért mezőpotenciál theta (3-10 Hz) és gamma (30-90 Hz) frekvenciatartományú komponensével.

Az eddig ismertett adatok azon az általánosításon alapulnak, miszerint a DG szemcsesejtek egy homogén populációt alkotnak, és a kísérletesen meghatározott átlagos értékek híven jellemzik az összes szemcsesejt viselkedését és tulajdonságait. Ma már azonban tudjuk, hogy a hippocampalis fősejteket bizonyos fokú heterogenitás jellemzi, ami alapján további csoportokra oszthatók fel^[64-66]. Ez a megállapítás különösen igaznak bizonyult a szemcsesejtek esetében, ugyanis a DG azon két agyi régió egyike (a szaglógumó mellett), ahol folyamatosan új és új sejtek jelennek meg és épülnek be a már meglévő hálózatba^[67,68]. A DG-ben az új sejtek közvetlenül a szemcsesejtréteg alján keletkeznek az osztódásra képes progenitor sejtekből. Fejlődésük korai szakaszában nagymértékű ingerelhetőség és rendkívül képlékeny kapcsolatrendszer jellemzi őket, ami az érett sejtektől eltérő ioncsatorna összetételükből és morfológiai tulajdonságaikból fakad^[69-77]. A felnőtt korban született sejtek (ABGC-k) pontosan meghatározott program szerint illeszkednek be a működő idegsejt hálózatba, mely a kapcsolatrendszerük kialakulásával és a belső tulajdonságaik megváltozásával jár. Az ABGC-k kimenetét formáló axon például két héttel a születésük után már eléri a CA3 területét, ahol nem sokkal később megjelennek a funkcionálisan teljes értékű szinapszisaik is^[74]. GABAerg bemeneteik közül először a neurogliaform sejtekkel kialakított lassú szinapszisok jelennek meg^[78], míg az első glutamaterg kapcsolatuk a hiláris mohasejtektől ered^[79]. A túlélésük szempontjából kritikus első néhány hét után az ABGC-k egy sokkal hosszabb, 8-10 hétig is elhúzódó érési folyamaton mennek keresztül, mialatt a sejtek egyes tulajdonságai (például a bemenő ellenállásuk és az akciós potenciál alakja) folyamatosan közelítenek az érett sejteket jellemző állapot felé. A dinamikus membránpotenciál változásokkal szemben mutatott fokozott érzékenységük azonban változatlan módon megőrződhet akár a teljes érési folyamat során, egészen addig, amíg egy ma még ismeretlen program szerint át nem váltanak egy kevésbé érzékeny „üzemmódba”^[80]. A felnőttkorban születő sejtek hozzájárulnak bizonyos tanulási folyamatokhoz és a DG-re jellemző mintázat-szétválasztó működéshez is. Az értekezésben bemutatott vizsgálatokat érett tulajdonságokat mutató szemcsesejteken végeztem (az elektrofiziológiai és anatómiai kritériumrendszer megtalálható a módszerek ismertetésénél), a későbbiekben kizárólag az érett szemcsesejtek csoportját értem a szemcsesejt megnevezés alatt.

1.4. Dendritikus folyamatok a szemcsesejtekben

Élő állatban a szemcsesejtek sok esetben nem egyedi akcióspotenciálokkal kommunikálnak, hanem rövid, nagy frekvenciájú akciós potenciál sorozatok, az eredeti angol terminológiával élve *burst*-ök alakulnak ki rajtuk^[52,61,63,81]. A burst jellegű tüzelés számos következménnyel járhat a sejtek közötti kommunikációban az egyedi akciós potenciálokhoz képest. Először is a burst megbízható információ átadást biztosít azokban a kapcsolatokban, ahol alacsony a kezdeti neurotranszmitter felszabadulás valószínűsége^[82]. Másrészt jobb jel/zaj arányú információátadást biztosít az eredendően „zajos” háttér mellett működő hálózat számára^[83]. Számos adat bizonyítja, hogy a burst tüzelés kulcsszerepet játszik a szinapszisok erősségének hosszú távú szabályozásában is^[82]. A fenti tulajdonságok miatt egy burst sokkal inkább tekinthető egy önálló kommunikációs eszközhöz, mint az egyedi akciós potenciálok gyors sorozatának. Ez a szemléletmód vezetett oda, hogy egy egészen friss elméleti modell már a burst-öt tekinti a sejtek közötti kommunikáció alapegységének az emléknymok tárolása és előhívása során^[84]. A szemcsesejtek burst tüzelésének akkor van különös jelentősége, ha a szemcsesejtek által a CA3 régióra kifejtett hatást vizsgáljuk. A nagyfrekvenciás tüzelés ugyanis lehetővé teszi, hogy a közvetlenül beidegzett posztszinaptikus piramisisejtek képesek legyenek felülemelkedni a kapcsolatrendszer anatómiai és élettani sajátosságaiból fakadó masszív előrevetítő gátláson és a serkentés alacsony kiindulási valószínűségén^[50,52,81]. Ez pedig az egyik előfeltétele annak, hogy a szemcsesejtek megváltoztathassák a piramisisejtek aktivitását a memórianyomok kialakítása során. Mivel a burst kialakulása más fősejtek esetén alapvetően a sejtre érkező szinaptikus bemenetek tér- és időbeli mintázata, valamint a sejten jelen levő aktív ioncsatorna működés közötti összjáték eredménye, joggal feltételezhetjük, hogy a szemcsesejtek összetett információfeldolgozást végezhetnek a dendritjeiken. A szemcsesejtek dendritikus folyamatait kevésbé ismerjük, mint a piramisisejtek hasonló folyamatait. Ennek az az egyik oka, hogy a szemcsesejt-dendritek a vékonyságuk miatt nagyon sokáig elérhetetlenek voltak a hagyományos patch-clamp elektrofiziológiai vizsgálatok számára. Ugyanakkor a dendritekben zajló passzív és aktív folyamatok közvetlen vizsgálata szükséges előfeltétele a funkció megértésének. Természetesen a közvetlen feszültség és konduktancia mérések hiányában is lehetséges a dendritikus folyamatok vizsgálata, ilyenkor azonban kénytelenek a kutatók valamilyen közvetett bizonyíték

alapján megjósolni a háttérben zajló mechanizmusokat. Számos tudományos bizonyíték szól amellett, hogy egy teljes mértékben passzív dendritfa is bonyolult számítási folyamatok elvégzésére képes, ami annak köszönhető, hogy az időben és térben átfedve érkező szinaptikus események többféle módon is hatással vannak egymásra^[85-87]. Schmidt-Hieber és munkatársai részletesen megvizsgálták a szemcsesejtek passzív integratív viselkedését^[46], egy modellezéssel ötvözött elektrofiziológiai tanulmányban. A munka egyik fontos következtetése, hogy a morfológiai tulajdonságoknak köszönhetően még a sejttestbe beérkező szinaptikus események is gyors időbeli lefutásúak. Ez a gyors lefutás pedig azt eredményezi, hogy a szinaptikus potenciálváltozások csak akkor képesek hatékonyan összegződni, ha rövid időszakon belül követik egymást az események. Az erősen hiperpolarizált membránpotenciál miatt a hatékony összegződés pedig alapvető fontosságú az AP keletkezéshez szükséges feszültségküszöb eléréséhez.

A passzív háttér mellett azonban többféle feszültség függő, vagyis aktív ioncsatorna is jelen van a GC dendriteken. A szemcsesejtek esetében az inaktiválódó, A-típusú káliumáram (I_A) háttérében álló ioncsatornákról van a legtöbb ismeretünk a dendritikus ioncsatornák eloszlását és tulajdonságait illetően. Az irodalmi adatoknak megfelelően az I_A áram a periszomatikus régióban az akciós potenciál lefutását modulálja^[88,89], míg a dendriteken a visszaterjedő akciós potenciálok (bAP-k, az angol „backpropagating action potential” kifejezés alapján) és az ahhoz kapcsolódó dendritikus folyamatok szabályozásában vesz részt^[90-92]. Ilyen tranziens, gyorsan inaktiválódó káliumáram adja a sejttestben mérhető káliumáramok döntő többségét a szemcsesejtekben^[88]. Bár a gyorsan inaktiválódó káliumáramokat összefoglaló néven A-típusú áramnak nevezünk, a valóságban sokféle feszültségfüggő káliumcsatorna működése állhat az I_A áram háttérében. A szemcsesejtek esetében is legalább két, mind farmakológiailag és kinetikailag is elkülönülő csatorna működése járul hozzá az ionáram kialakításához^[88]. A két áram közül a TEA érzéketlen komponens aktivációs küszöbe -60 mV, míg a TEA és BDS-I érzékeny komponens feszültségküszöbe -30 mV közelében van. Az aktivációs küszöb azért fontos tulajdonsága a csatornaműködésnek, mert meghatározza, hogy melyek azok a dendritikus folyamatok, melyet hatékonyan tud befolyásolni egy adott csatorna. Például a TEA érzékeny komponens viszonylag magas aktivációs küszöbe, és a gyors inaktiváció együttesen azt sugallják, hogy elsősorban nagymértékű

depolarizációval járó, tranziens potenciálváltozások esetén számíthatunk ennek az ionáramnak a hatékony szabályozó szerepére. A szemcsesejtek esetén csak a sejttestről rendelkezünk közvetlenül mért adatokkal a konduktancia jelenlétét illetően, a dendritikus régióról nem^[88,93]. Farmakológiai kísérletekben a visszaterjedő akciós potenciálok kalcium jelét mérve Krueppel és Beck arra a következtetésre jutott, hogy a dendritikus I_A mennyisége feltehetően sokkal kevesebb, mint a sejttestben^[58]. Ez azért érdekes, mert a CA1 piramissejtek esetében pont a fordítottja igaz, tehát az I_A áramok sűrűsége a dendriten kifelé haladva folyamatosan nő^[94].

A dendritikus feszültségfüggő nátriumcsatornák szerepe szintén nagyon változatos lehet. Túl azon, hogy aktívan növelhetik a serkentő szinaptikus válaszok amplitúdóját, regeneratív, más ismert sejtípusok esetén szinte veszteség nélküli dendritikus terjedést biztosíthatnak a visszaterjedő akcióspotenciálok számára. Krueppel és Beck azt találták, hogy bár van kimutatható mennyiségű nátriumcsatorna a szemcsesejtek dendritjeiben, a csatornák sűrűsége nem elégséges az akciós potenciál regeneratív visszaterjedéshez, ezért a dendritikus terjedés inkább a passzív viselkedéshez hasonló lecsengést mutat^[58].

A dendritekben zajló folyamatok sok esetben az intracelluláris kalciumszint szabályozó hatása alatt állnak. Mivel a kalciumszint változása döntően feszültségfüggő kalciumcsatornák (Ca_v) működésének köszönhető, ezért a Ca_v csatornák hatékonyan szabályozhatják a dendritek működését. Többféle Ca_v típus is jelen van a GC dendritek mentén, azonban az egyes csatornatípusok és az általuk generált kalciumáramok dendritikus eloszlását illetően nem teljes az összhang az egyes irodalmi adatok között^[95-97]. Például Blaxter és munkatársai szerint a dendritikus kalciumáramnak csak kis frakciója mutatott nimodipin érzékenységet, ami az L-típusú áramot közvetítő ioncsatornák gátlószere^[95]. Ezzel szemben Elliot és Johnston azt találták, hogy a egészséjtes kalciumáram mintegy 40 %-a nimodipin érzékeny L-típusú áram^[96]. Beck és munkatársai szintén egészséjtes ionáramot mérve jelentős L áramot írtak le epileptikus humán minták szemcsesejtjeiben^[97]. Az eltérések hátterében valószínűleg az áll, hogy különböző eredetű mintában és eltérő technikai megközelítést használva vizsgálták a kérdést. Van azonban néhány közös vonás, melyben az eltérő források egyetértenek. Minden forrás szerint jelen van a szemcsesejtekben egy alacsony feszültségküszöbön aktiválódó, inaktivációt mutató kalciumáram, mely feszültségfüggését, kinetikáját és

farmakológiai profilját tekintve T-típusú kalciumáramnak felel meg, melyet Ca_v 3.1, 3.2 és 3.3 csatornák közvetítenek. A T-típusú áram mellett többféle magas feszültségküszöbön aktiválódó kalciumáram jelenléte is igazolt. A már említett dihidropiridin érzékeny L-típusú áramok (Ca_v 1.1, 1.2 és 1.3 csatornák közvetítik) mellett jelen van az N-típusú (Ca_v 2.2 közvetíti) és az R-típusú kalciumáram is (Ca_v 2.3 közvetíti). Ez utóbbi két áram elkülöníthető a farmakológiai érzékenységük és az inaktivációs profiljuk alapján. Az N-áram szelektív gátlószere az ω -conotoxin-GVIA, az R-áramok pedig a T-áramokkal egyetemben nikkkel érzékenységet mutatnak. A magas feszültségküszöbű áramok közül az R-csatornák gyors, feszültségfüggő inaktivációt mutatnak, mely már a hiperpolarizált feszültségtartományban is nagyon jelentős mértékű lehet^[98].

Láthatjuk tehát, hogy többféle ioncsatorna is jelen van a szemcsesejtek dendritikus felszínén, melyek módosítják a dendritre érkező információ feldolgozását. A feszültségfüggő ioncsatornák működése megváltoztatja a szinaptikus potenciálváltozások időbeli összegződését^[99,100], de az aktív dendritek legszembetűnőbb hatása azonban nem a küszöbalatti feszültségtartományban jelentkezhet, hanem az úgynevezett nemlineáris dendritikus eseményekhez, „dendritikus spike”-okhoz köthető. Aktív dendritekkel rendelkező sejtek esetében többféle regeneratív, nemlineáris potenciálváltozást is megfigyelhetünk. Az ilyen jellegű események ismertetését célszerű talán a bAP bemutatásával kezdeni, mivel a bAP tulajdonságai több szempontból is eltérnek a többi dendritikus küszöb feletti eseményétől. A bAP nem más, mint az axon iniciális szegmentumon keletkezett akciós potenciál dendritekbe visszaterjedő feszültségjele^[101]. Lényegében egy olyan jelként értelmezhető, ami a sejtek kimenetéről (egy axonális akciós potenciál keletkezéséről) nyújt közvetlen visszajelzést a sejtek bemeneti zónájára, vagyis a dendritek felé^[102,103]. Egy ilyen visszacsatoló mechanizmus megléte nagyon fontos és szükséges a Hebb-féle plaszticitási folyamatok szempontjából. A Hebb-i doktrína alapján ugyanis két idegsejt közötti kapcsolat megerősödik akkor, ha a sejtek egyidejűleg aktívak. Egy ilyen tanulási folyamatban a bAP ideális összekötő kapocs a bemeneti régió szinapszisai és a kimenetet formáló axon között^[104-108]. Kellően nagy mennyiségű dendritikus nátriumcsatorna sűrűség mellett akár a teljes mértékben regeneratív visszaterjedés is lehetséges, vagyis amikor a bAP amplitúdó veszteség nélkül, nagyon gyorsan eléri a dendritfa legtávolabbi pontjait is. Ez

különösen azoknál a sejtípusoknál lehet fontos, ahol a nagyméretű dendritfa és/vagy a dendritikus konduktancia viszonyok nem teszik lehetővé, hogy az akciós potenciál feszültségjele passzív módon is elérje a távoli dendriteket (például egy ötödik rétegi piramissejt esetén^[109]). Fontos azonban hangsúlyozni, hogy az akciós potenciál bizonyos távolságra aktív mechanizmusok hiányában is visszaterjedhet. Ebben az esetben azonban a bAP csúcspotenciáljának gyors lecsengése figyelhető meg, melyet az esemény belassulása kísér. A visszaterjedést alapvetően befolyásolhatják a depolarizáció ellen dolgozó dendritikus káliumcsatornák is^[90,110]. Valójában a nátrium és a káliumkonduktanciák aránya fogja meghatározni a visszaterjedés mértékét. A bAP okozta depolarizáció a lokális kalciumcsatornák nyitását okozza, melyet jelentős mértékű kalcium beáramlás kísér^[111]. A kalcium beáramlás szerepe elsősorban nem a további depolarizáció elősegítése, sokkal inkább az, hogy aktivitásfüggő módon szerteágazó biokémiai útvonalakat szabályozzon a dendrit mentén^[112].

A bAP -val ellentétben léteznek olyan dendritikus regeneratív folyamatok is, melyeknek az axonális akciós potenciáltól függetlenül, a helyi dendritikus információ feldolgozás eredményeként jönnek létre. Az ilyen esemény háttérében álló ionáramot közvetítő csatornák szerint megkülönböztetünk NMDA-, nátrium- és kalcium spike-okat is. Bár időbeli lefutásuk és terjedési tulajdonságaik alapján az egyes esemény típusok nagymértékben eltérnek egymástól, közös tulajdonságuk, hogy jól definiálható feszültségküszöb határozza meg a kialakulásukat. Ez a küszöb sokkal magasabb, mint az axonális akciós potenciálok esetében, ezért az ilyen jelek kialakulása általában erős, térben korlátozott szinaptikus serkentést igényel. A néhány ms alatt lezajló dendritikus nátrium spike a leggyorsabb esemény a három közül^[113]. Hosszabb, erőteljesebb serkentő szinaptikus aktivitás kalcium - vagy NMDA spike megjelenéséhez vezethet^[114-116]. Az NMDA receptor által közvetített dendritikus spike-ok lényeges megkülönböztető tulajdonsága az, hogy a mögötte álló ionáram kialakulása nemcsak feszültségfüggő, de az NMDA receptor glutamát kötése is szükséges hozzá^[116]. Ezek a nemlineáris események természetesen kombinálódhatnak is, ami az amplitúdó és az időbeli lefutás tekintetében változatos megjelenési formákat eredményezhet. Még a lassabb, aktívan terjedő kalcium spike-ok is erőteljes lecsengést mutatnak mire elérik a sejttestet. Ennek ellenére sok esetben a dendritikus regeneratív eseményekhez axonális akciós potenciálok megjelenése is társul, sőt ezeknek az eseményeknek kitüntetett

szerepe lehet a burst tüzelés kiváltásában^[117,118]. Az *in vitro* kísérletek azonban eddig nem bizonyították a regeneratív dendritikus események jelenlétét a szemcsesejteken. Bár potenciálisan minden olyan csatorna jelen van a GC dendriteken, ami dendritikus spike generálásához szükséges, mégis az egyes csatornák sűrűsége feltehetőleg túl alacsony ahhoz, hogy lehetővé tegye a regeneratív dendritikus potenciálváltozások kialakulását. Azonban még az alacsony csatorna sűrűség is elegendő lehet ahhoz, hogy a dendritikus nátriumcsatornák és az NMDA receptorok módosítsák a szinaptikus jelösszegződést a szemcsesejteken. Egy passzív dendritben az elektrotónusosan egymáshoz közel fekvő szinapszisok egyidejű aktivációja szublineáris összegződést eredményez, a szemcsesejteken azonban a fent említett ioncsatornák hatékonyan ellensúlyozzák ezt a hatást, ahogy a növekvő depolarizáció mellett egyre aktívabbá válnak. Összességében tehát a szemcsesejtek lineáris jelösszegzést végeznek, ami nem vezet dendritikus regeneratív események kialakulásához^[58].

1.5. Az értekezés első felében tárgyalt kutatás (1. projekt) előzményei

A központi idegrendszer hírvivő anyagai kétféle receptortípuson hatva befolyásolják a sejtmembrán elektromos viselkedését. Az ionotróp receptorok közvetlenül ioncsatornaként működnek, így a receptor aktivációja gyors válasz kialakulásához vezet. Ezzel szemben a metabotróp receptorok közös tulajdonsága, hogy a ligandkötés nem vezet közvetlen ioncsatorna nyitáshoz, hanem G-fehérjéken keresztül különféle intracelluláris jelátviteli útvonalak szabályozása indul meg, ami magába foglalja más ioncsatornák nyitását vagy zárását. A mechanizmus közvetett jellege folytán a kialakuló válasz is lassabb időskálán mozog, mint az ionotróp receptorok esetében. Elnyújtott hatásuk miatt elsősorban az idegi folyamatok folyamatosan fennálló, tónusos szabályozásában játszanak szerepet. Ez a tónusos szabályozás azonban nagy jelentőséggel bír, amit az is mutat, hogy sok idegrendszeri betegség (például szorongás, stressz, skizofrénia és a függőségek^[119-122]) hátterében felbukkan a metabotróp jelátviteli útvonalak sérülése. A metabotróp glutamát receptorok idegi és gliális elemeken egyaránt előfordulnak a központi idegrendszerben. Genomi szekvencia alapján nyolc receptor alkotja a családot, mely további három csoportra bontható fel, amin belül a 2-es (mGluR2) és 3-as (mGluR3) metabotróp glutamát receptorok közösen alkotják a II. csoportot (mGluII receptorok). Általánosságban úgy tekintjük, hogy az mGluII

receptorok gátolják a sejtek, sejhálózatok aktivitását, mivel a receptorok döntően $G_{i/o}$ fehérjékhez kapcsolódnak, és ezek közvetítésével csökkentik az adenilát cikláz aktivitását, a feszültségfüggő kalciumcsatornák működését^[123,124] illetve káliumcsatornák nyitására keresztül hiperpolarizálják a sejteket.

Az mGluII receptorok leginkább feltárt szerepköre a preszinaptikus folyamatok szabályozásához köthető, ahol a szinapszis erősségének hosszú távú szabályozásában játszanak szerepet^[125]. A receptorok jelen vannak az axonális membrán periszinaptikus részén, ahol egy negatív visszacsatolási kör egyik elemét alkotják^[126,127]. A szinapszistól kijutó glutamát ugyanis képes aktiválni az mGluII receptorokat, melyek gátolják a terminális feszültségfüggő kalciumcsatornákat, ezáltal csökkentve a szinaptikus neurotranszmitter felszabadulás lehetőségét^[127]. A feszültségfüggő kalciumcsatornák szabályozásának általánosan elfogadott mechanizmusa az, hogy a receptorok által aktivált G-fehérje $\beta\gamma$ alegysége közvetlenül gátolja a csatornaműködést^[128]. Az mGluII receptor csoport két tagja nem egyforma mértékben érintett a preszinaptikus szabályozási mechanizmusokban, mivel az ultrastrukturális anatómiai adatok szerint mGluR2 elsősorban az axonban van jelen, míg az mGluR3 sokkal inkább a gliális elemekre jellemző. Az mGluR2 specifikus eloszlásának egyik legszebb példája a hippocampus-ban található, ahol a receptorok jelenléte szinte kijelöli a moharostpályát illetve a DG molekuláris réteget^[126]. Már ezek az immunhisztokémiai adatok is azt sugallják, hogy a szemcsesejtek kitüntetett célpontjai az mGluII receptorokhoz kapcsolható folyamatoknak. Valóban, kísérletes bizonyítékok támasztják alá, hogy a szemcsesejteken végződő mediális perforáns pálya axonjai az mGluII receptorok moduláló hatása alatt állnak^[129,130]. Hasonlóképpen, a moharostokból történő neurotranszmitter felszabadulás is erőteljesen gátolható az mGluII receptorok aktiválásán keresztül^[131]. Mivel a CA3 piramissejtek lokális axonvégződése nem fejeznek ki ilyen receptorokat, hosszú évek óta bevált módszer a stratum lucidumban extracelluláris stimulálással kiváltott serkentő válaszok moharost-eredetének bizonyítására az mGluII receptorok farmakológiai aktiválása. A transzmitter felszabadulás csökkenésében egészen biztosan szerepet játszik a kalciumcsatornákon kifejtett gátló hatás, azonban Haruyuki Kamiya már 1999-ben rávilágított arra, hogy a kiváltott szinaptikus események nagyságában tapasztalható csökkenés nagyobb, mint amit a kalcium beáramlásban mérhető változás alapján várhatunk^[132]. Az elvégzett

kísérletek arra engedtek következtetni, hogy az mGluII receptorok a kalcium beáramlás csökkenésétől függetlenül, valamilyen más módon közvetlenül is gátolják a szinaptikus vezikulák ürítését. Azóta vélhetőleg sikerült azonosítani az ismeretlen mechanizmust. Ismeretes, hogy az mGluII receptorok hatékonyan aktiválhatják az ERK/MAPK intracelluláris jelátviteli útvonalat is^[133], ami a szinaptikus plaszticitási folyamatok egyik szabályozó mechanizmusa. Sabine Schmitz és munkatársai 2016-ban kimutatták, hogy az ERK/MAPK útvonalon keresztül az mGluR2 foszforilálja a vezikula ürülés egyik kulcsfehérjét, a Munc18-at^[134]. Ez a foszforiláció végső soron a Munc-18 enzimátikus lebontását eredményezi, és csökkent vezikula ürítéshez vezet.

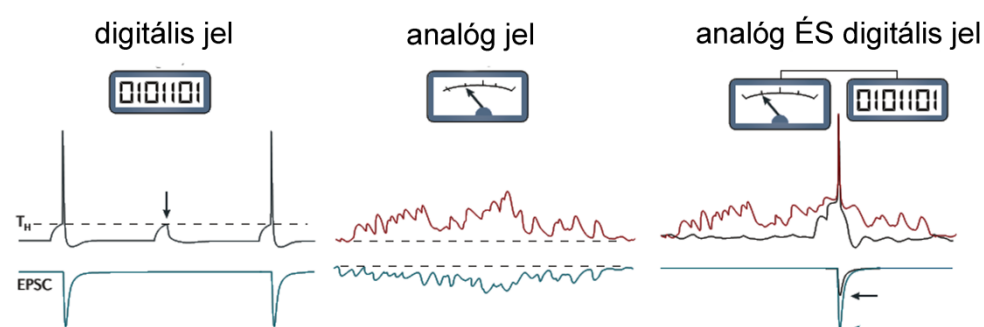
Bizonyos sejttípusok esetén az mGluII receptorok jelenléte a szomatodendritikus régióban is kimutatható^[135,136], bár az itt elhelyezkedő - vagyis posztszinaptikus - receptorok szerepe sokkal kevésbé tisztázott, mint a preszinaptikus hatások. A receptorok aktiválása többnyire hiperpolarizációhoz vezet, mégpedig oly módon, hogy a receptoraktiváció G-fehérjéhez kapcsolt, befelé egyenirányító káliumcsatornák (GIRK csatornák) nyitását eredményezi. Knoflach és munkatársai mGluII receptorok által közvetített hiperpolarizáló mechanizmust írtak le a kisagyi interneuronok egy csoportján^[137], illetve Sherman és munkacsoportja bizonyította az mGluII receptorok által közvetített gátlás jelenlétét mind a thalamus gátló magjának – a nucleus reticularis thalaminak – a neuronjaiban^[138], mind pedig a különféle szenzoros kérgi régiók idegsejtjeiben^[139]. Vannak azonban olyan kutatási eredmények is, melyek ellentétes hatásról számoltak be. Ster és munkatársai például azt tapasztalták, hogy az mGluII receptorok aktiválása a CA3 piramissejtek depolarizációját idézi elő úgy, hogy fokozza az intracelluláris kalciumraktárak ürülését, és a megnövekedett sejten belüli kalciumszint végső soron depolarizáló hatású, kalciumérzékeny kationcsatornák nyitását eredményezi^[140]. Ebben a kutatásban azt is kimutatták, hogy a folyamatot káliumcsatornák egy részének bezáródása kíséri, mely szintén depolarizációt eredményez. Kőszegi és munkatársai hasonló depolarizáló hatásról számoltak be a pedunculopontin mag idegsejtjeinek egy csoportján^[141]. Összességében tehát a dendritekben elhelyezkedő mGluII receptorok hatása széles skálán mozoghat, hisz működésük érintheti az intracelluláris kalciumfolyamatokat, ioncsatornákat nyithatnak vagy zárhatnak be a sejten, illetve a szinaptikus válaszok tulajdonságait is befolyásolhatják.

Anatómiai bizonyítékok alapján a szemcsesejtek dendritfáján is jelen vannak az mGluII receptorok^[142], de korábban nem volt ismeretünk a dendritikus mGluII receptorok esetleges hatásáról a szemcsesejteken. Ezért a PhD munkám első feladata az volt, hogy részletesen megvizsgáltam, hogy milyen hatást váltanak ki a dendritikus mGluII receptorok a szemcsesejteken.

1.6. Az értekezés második felében tárgyalt kutatás (2. projekt) előzményei

Az idegsejteken belül az információ terjedése nemcsak meghatározott térbeli sorrendben történik, de a közvetített információ jellege is meghatározott, mivel a sejtek a jelfeldolgozás során analóg-digitális/digitális-analóg jelátalakítást végeznek. A dendritekkel szinapszist formáló axonok aktivitása potenciálváltozást generál a dendriten, ami egy analóg jelnek tekinthető. A dendriten kialakuló analóg események a sejtesten összegződnek ezért a sejtest membránpotenciálja egy olyan analóg jel, ami az egész sejt pillanatnyi általános állapotát tükrözi. Azonban, ha a sejtre érkező serkentés mértéke elér egy bizonyos küszöbfeszültséget, akkor a sejtben kialakul egy akciós potenciál (AP). A klasszikusnak tekinthető álláspont szerint a kialakult AP már egy digitális jel, mert az AP keletkezése mindent-vagy-semmit elv alapján történik (csak két lehetséges állapot létezik, vagy van akciós potenciál, vagy nincs), és a kialakult feszültségjel mindig egyforma erősségű. Az analóg-digitális átalakítás végeredményeként az AP-k időzítése és gyakorisága (frekvenciája) fogja tükrözni a sejt pillanatnyi állapotát. A kialakult AP aztán végigterjed az axonban, illetve bAP formájában a dendritek távoli pontjai felé, ahol az információ újra analóg jellé alakul át az axon által formált szinaptikus kapcsolatokon és az aktivitásfüggő dendritikus folyamatokon keresztül. Nemrégiben azonban felfedezték, hogy az axonális AP feszültségjele bizonyos mértékű analóg információt is hordozhat, ami módosítja az AP által közvetített digitális tartalmat. Ebben az esetben a terjedő AP nemcsak a sejt aktivitását közvetíti, hanem arról is információt nyújt, hogy milyen általános állapotban volt a sejt az AP keletkezésekor, így módon az axonális AP egy analóg és digitális információt egyaránt hordozó hibrid jelnek tekinthető. Az emlősök központi idegrendszerében pont a moharoston írták le először a hibrid információ továbbítást. Közvetlen mohaterminális elvezetések segítségével Henrik Alle és Jörg Geiger felfedezte, hogy a moharost elektrotónusos tulajdonságai miatt az axonális

membránpotenciál értéke még a távoli axonális régiókban sem független a szomatikus membránpotenciáltól^[143]. Mivel azt tapasztalták, hogy a neurotranszmitter felszabadulás függ az akciós potenciált megelőző lokális membránpotenciáltól, arra a következtetésre jutottak, hogy az akciós potenciál nemcsak a klasszikus, digitális információ tartalmat közvetíti a poszt-szinaptikus sejtek felé, hanem tovább örökíti a sejtestet analóg állapotának információját is (4. Ábra).



4.Ábra. Digitális, analóg és kevert axonális információátviteli sémák (Debanne és munkatársai által felvázolva^[144])

Balra a klasszikus digitális információ átadás sémáját láthatjuk. Mivel az akciós potenciál kialakulása egy feszültségküszöbhez kötött, egyáltalán nem látható a poszt-szinaptikus sejt számára az az információ, ami nem érte el a küszöböt (például a nyíllal jelzett preszinaptikus esemény). Középen a tisztán analóg információátadás elméleti példája látható. Ebben az esetben a poszt-szinaptikus sejt változásai egyenesen követik a preszinaptikus eseményeket. A jobb oldali kapcsolat egy hibrid, analóg/digitális kommunikációt mutat be, ahol az információátviteli időzítése rögzített, de az átadott információ függ a preszinaptikus sejt küszöbalatti membránpotenciáljától is.

Ezzel a kutatással párhuzamosan egy másik munkacsoport kérge ötödik rétegi piramis sejtek vizsgálva ugyanezt a következtetést vonták le^[145], tehát a hibrid jelátviteli mód nem egy specifikus, csak a szemcsesejtekre jellemző kommunikációs forma, hanem sokkal általánosabb tulajdonsága az axonális információátvitelnek. Azóta számos sejt típus esetében igazolták az axonális információ átadás analóg modulációját^[146-150]. Az analóg moduláció egyik elfogadott mechanizmusa az, hogy az axon kiindulási membránpotenciálja hatással van az akciós potenciál háttérben álló feszültségfüggő ioncsatornák elérhetőségére, így hatékonyan befolyásolhatja a kialakuló

AP alakját. Az AP alakja, különösen a csúcsa és a repolarizáció fázisa alapvetően meghatározza a depolarizációt kísérő kalcium beáramlás mértékét. Mivel a neurotranszmitter felszabadulás hatékonyságát elsődlegesen a beáramló kalcium mennyisége szabja meg, ezért a kiindulási membránpotenciál változása hatással van a neurotranszmitter felszabadulásra. Az analóg moduláció mechanizmusa több nemlineáris lépést is tartalmaz, így a membránpotenciál kis változása is jelentős mértékben módosíthatja a kimeneti jel erősségét. Bár több vizsgált sejtípus esetén megfigyelhető a hibrid jeltovábbítás e mechanizmusa, azonban a moharost esetében, eddig nem sikerült a közvetlen kapcsolatot bizonyítani a küszöbalatti membránpotenciál, az akciós potenciál alakja, illetve a kalcium beáramlás között^[143,144,151]. A korábban már ismertetett szerepkörének megfelelően a bAP más biológiai szerepet tölt be, mint az axonális AP, hiszen nem a többi idegsejt felé közvetíti az információt, hanem a sejt saját dendritjei számára nyújt digitális visszajelzést a sejt aktivitásáról. Az azonban nem volt ismert, hogy a bAP tisztán digitális jel, vagy az axonális AP-hoz hasonlóan a bAP is hordoz analóg elektromos információt, és így hibrid feszültségjelnek tekinthető^[152]. A doktori munkám második részében azt vizsgáltam meg, hogy közvetít-e analóg információt a bAP a sejttest általános állapotáról a szemcsesejtekben.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A doktori munkám első célja az volt, hogy feltárjuk a dendritikus mGluII receptorok élettani szerepét a szemcsesejtekben (1. projekt). Ennek érdekében az alábbi lényegi kérdéseket vizsgáltuk meg:

I/1: Milyen celluláris hatást váltanak ki az mGluII receptorok a szemcsesejtek dendritjein?

I/2: Mi a funkcionális szerepe a dendritikus mGluII hatásoknak a szemcsesejtekre érkező szinaptikus információ feldolgozásában?

I/3: A dendritikus mGluII hatások mennyire tekinthetők általánosnak a hippocampalis sejttípusok között?

Az értekezés második felében bemutatott munkámban (2. projekt) azt vizsgáltuk, hogy a szemcsesejtekben képesek-e a dendritikus bAP-k analóg információtartalom hordozására is, azaz hibrid jelként működnék-e. A kutatás során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

II/1: Független-e a bAP alakja sejttest membránpotenciáljától és hordozhat-e a bAP analóg információt a szemcsesejt általános állapotáról?

II/2: Tükrözik-e a bAP-k által kiváltott dendritikus kalciumjelek a bAP alakjában kódolt analóg információtartalmat, és ha igen, akkor milyen mechanizmusok biztosítják a kapcsolatot a szemcsesejtek szomatikus membránpotenciálja és a bAP-hoz köthető kalcium jelek között?

II/3: Milyen funkcionális szerepet játszik a bAP által hordozott analóg információtartalom a szemcsesejt dendritekre érkező szinapszisok szabályozásában?

3. MÓDSZEREK

A bemutatott kísérletek összhangban álltak a vonatkozó hazai és Európai Unió szabályozással, elvégzésüket jóváhagyta az MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézetének Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága (22.1/1760/003/2009).

3.1. In vitro túlélő agyszelet preparátum készítése (1. és 2. projekt)

A kérdéseink kísérletes megválaszolásához nemtől függetlenül 23-36 napos Wistar patkányokat használtunk fel. Az állatokat izofluránnal történő altatásban dekapitáltuk, majd kiemeltük az agyat a koponyából, és vibratom segítségével (VT 1200S, Leica) 350 µm vastag szeleteket készítettünk. A szelet metszése egy olyan – közel horizontális – síkban történt, ami a lehető legjobban megőrizte a szemcsesejt axonokat tömörítő moharost pálya épségét^[153,154]. Az idegi aktivitás gátlását elősegítő összetétel mellett az oldat alacsony (fagyáspont körüli) összetétele is segítette az idegsejtek túlélését a metszés során. A felhasználás előtt a szeleteket egy órán keresztül 32,5 C°-on inkubáltuk a vágó és az elvezető oldat keverékében. A kísérleteket az állatok élettani testhőmérsékletéhez közeli hőmérsékleten (35 C°-on, értekezés első részéhez kapcsolódó mérések) vagy szobahőmérsékleten (23-28 C°-on, második rész mérései). A szobahőmérséklet használatát az indokolja, hogy ebben a projektben a leggyorsabb neuronális jelenségeket, az akciós potenciálokat vizsgáltuk meg. Szobahőmérsékleten lassabb az akciós potenciál időbeli lefutása ami mérés technikai okokból jobb minőségű elvezetést tesz lehetővé. A mérés technikai megfontolások a 3.4. szakaszban részletesen bemutatásra kerülnek.

3.2. Használt oldatok (1. és 2. projekt)

A használt oldatokat (beleértve a vágáshoz és a szeletek tárolásához használtakat is) folyamatosan buborékoltattuk karbogén gázzal (95% O₂ és 5% CO₂ keverékével), ily módon fenntartva az oxigén telítettséget, és a pH-érték állandóságát. A kísérletekhez használt mesterséges agy-gerincevelői folyadék (a továbbiakban elvezető oldat) összetétele a következő volt: 126 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM glükóz, 1,25 mM NaH₂PO₄, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂ és 26 mM NaHCO₃ (ozmolaritás: 295 mOsm). A

vágáshoz használt módosított elvezető oldat összetétele: 85 mM NaCl, 75 mM szaharóz, 2,5 mM KCl, 25 mM glükóz, 1,25 mM NaH₂PO₄, 4 mM MgCl₂, 0,5 mM CaCl₂ és 24 mM NaHCO₃ (ozmolaritás: 330 mOsm). A sejtek elektromos jeleinek elvezetéséhez a következő összetételű intracelluláris oldatot használtuk: 90 mM K-glükonát, 43,5 mM KCl, 1,8 mM NaCl, 1,7 mM MgCl₂, 50 µM EGTA, 10 mM HEPES, 2 mM Mg-ATP, 0,4 mM Na₂-GTP és 10 mM kreatinin-foszfát (nátrium só). Tapasztalataink szerint a használt magas klorid koncentrációjú intracelluláris oldat stabilabb elvezetést tesz lehetővé, mint az élettani klorid szintet jobban megközelítő oldatok. Ismereteink szerint a sejtek belső klorid koncentrációja nincs hatással az általunk vizsgált biológiai folyamatokra.

Előfordult, hogy megváltoztattuk az egyes oldatok összetételét az adott kísérlet igényeinek megfelelően. Ezeket a változtatásokat külön-külön jelezni fogom az adott kísérletes rész módszertani leírásánál.

3.3. Patch-clamp kísérletek (1. és 2. projekt)

A szeleteket egy felsőállású mikroszkóphoz (Eclipse FN1, Nikon) kapcsolt szelettartó kamrában rögzítettük, melyben 1-2 ml/perc-es áramlási sebesség mellett folyamatosan keringett az elvezető oldat. A célzott elvezetésekhez infravörös differenciál interferencia kontraszt (DIC) videó-mikroszkópiát használtunk. Az infravörös képet vagy egy Andor Zyla 5.5 sCMOS vagy egy Hamamatsu C-7500-50 CCD kamerával tettük láthatóvá. A kiválasztott sejt vagy sejt nyúlvány (axonterminális, dendrit) elektromos viselkedését patch-clamp technikával vizsgáltuk meg. Az elvezető pipettákat boroszilikát üvegapillárisokból készítettük (vékonyfalú kapillárisok 0,19 mm falvastagsággal, World Precision Instruments Inc., Hilgenberg GmbH, Sutter Inc.) egy vízszintes pipettahúzó segítségével (P-1000, Sutter Inc.). A méréseket szoftveresen irányított (Clampex 10.3 és 10.4, Molecular Devices) kétsatornás erősítő segítségével végeztük (Multiclamp 700B, Molecular Devices). A mért feszültség és áramjeleket 40-250 kHz-es mintavételezéssel digitalizáltuk (Digidata 1440A, Molecular Devices).

A dendritikusan elhelyezkedő mGluII receptorok szerepét célzó kísérletek zömét feszültségzár („voltage-clamp”) módban végeztük. Az mGluII receptorok aktiválásának következtében kialakuló csatornanyitás szomatikus eredetét kizáró nukleált-patch kísérletek kivételével minden esetben egészséjtes konfigurációt alkalmaztunk. A

farmakológiailag indukált áram vizsgálata során azt mértük meg, hogy specifikus receptor agonisták hatása mekkora változáshoz vezet a membránpotenciált rögzítő áram erősségében. A vizsgálatok során először kialakítottuk az egészsesjtes elvezetést, majd vártunk néhány percet (tipikusan öt-tizenöt percet), mialatt a sejt elektromos paraméterei állandósult értéket vettek fel. A kísérlet során a sejtek tartófeszültségét -65 mV-ra állítottuk, majd két perces alapvonal felvételét követően a kamrába mostuk az adott agonistát. A bemosási periódus hét percig tartott, melyet változó hosszúságú kimosási periódus követett, hogy a kiváltott hatás visszafordítható jellegét is vizsgálni tudjuk. Az indukált áramkomponenst úgy számszerűsítettük, hogy az agonista jelenlétében mért átlagos áramerősségből (kimosás előtti két perc átlaga) kivontuk az alapvonal felvétele során mért átlagos áramerősséget. Folyamatosan monitoroztuk a sejtek bemenő ellenállását is (öt másodpercenként 100 ms hosszú, -5 mV nagyságú lépések segítségével). A bemenő ellenállás nyomon követése azért volt fontos, hogy bizonyítani tudjuk azt, hogy az indukált áram egy valós konduktancia változás következménye. Ugyanezeket a feszültség lépéseket használtuk fel a soros ellenállás monitorozására is. Kizártuk az adathalmazból azokat az adatokat ahol a soros ellenállás jelentősen, több mint 30 %-al, megváltozott a kísérlet közben. A G-fehérjék szerepét vizsgáló kísérletekben GDP- β -S lítium sójával helyettesítettük az intracelluláris oldatban levő $0,4$ mM GTP-t. A kalciumfüggő sejten belüli jelátviteli útvonalak szerepét vizsgáló kísérletekben az intracelluláris oldathoz 10 mM BAPTA-t tartalmazott. Ebben az esetben úgy tartottuk fenn az oldat ozmolaritását, hogy a K-glükonát mennyiségét 85 mM-ra csökkentettük le. A fent említett két kísérletsorozatban a betörést követően legalább fél órát vártunk a kísérlet elindításáig azért, hogy a használt anyagok elérjék az egyensúlyi koncentrációjukat a sejt távolabbi régióiban is.

A dendritekből történő elvezetéseket nagy numerikus apertúrájú ($1,1$ NA) objektív használatával végeztem (CFI75 Apo LWD 25XW, Nikon), ami jelentősen megkönnyítette a kisátmérőjű szemcsesejt dendritek azonosítását a DIC képen. Itt az intracelluláris oldat további 10 μ M Alexa Fluor 594 fluoreszcens festéket is tartalmazott, hogy a kísérlet végén konfokális képalkotás segítségével igazolni tudjam az elvezetett dendrit szemcsesejt eredetét (Eclipse C1 Plus, Nikon, a rendszer később részletes leírásra kerül). A kis átmérőjű szemcsesejt dendritek csak olyan pipettákkal vezethetők el, melynek szájadéka szükségszerűen nagyon kicsi. Ennek következtében a

dendritikus pipetták ellenállása ($>25 \text{ M}\Omega$) és az elvezetés közben mért soros ellenállás is sokkal nagyobb ($>100 \text{ M}\Omega$), mint a hagyományos szomatikus elvezetések esetén, ahol a tipikusnak mondható pipetta ellenállás a mi oldatainkkal nézve $3\text{-}6 \text{ M}\Omega$ melyhez $10\text{-}30 \text{ M}\Omega$ -os soros ellenállás társul. Az első részben bemutatott dendritikus voltage-clamp elvezetésekben a soros ellenállásból eredő hiba úgy jelenik meg, hogy az elvezetett sejtben a valós membrán potenciál érték eltér a rögzíteni kívánt membránpotenciál értékétől. Egyensúlyi állapotban, vagyis kellően hosszú feszültséglépcsők használata esetén a hiba mértékét a soros ellenállás és az elvezetett sejt bemenő ellenállása együttesen határozzák meg, a következő összefüggés alapján:

$$V_r = V_c * \frac{R_{in}}{R_{in} + R_s} \quad (1)$$

ahol V_r a sejtben ténylegesen megvalósuló feszültséget jelöli, V_c a parancsfeszültség, R_{in} a sejt lokális bemenő ellenállása és R_s pedig a soros ellenállás^[155]. A dendritikus elvezetésekben a soros ellenállásból eredő hiba mértékét tehát csökkenti, hogy a lokális bemenő ellenállás a szemcsesejtekben folyamatosan nő a dendriten kifelé haladva. A kísérleti körülményeket jellemző paraméterek mellett a voltage-clamp hibája jelentős mértékűnek mondható. $120 \text{ M}\Omega$ -os soros ellenállással és $400 \text{ M}\Omega$ -os bemenő ellenállással számolva a hiba mértéke 23 százalék.

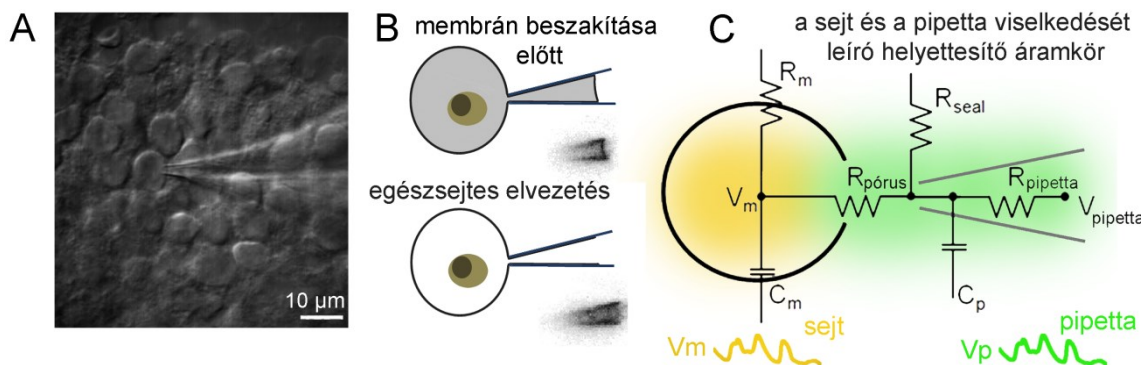
A közvetlen mohaterminális elvezetésekben a DIC kép alapján kerestem a potenciális terminálisokat a CA3b régió stratum lucidum rétegében. A boutonok keresésekor nem vettem figyelembe azokat a struktúrákat, melyek a szeletfelszín felső $20 \mu\text{m}$ -es rétegében helyezkedtek el, hogy elkerüljem a szeletkészítés során keletkezett elvágott axonvégből, az úgynevezett *bleb*-ből történő elvezetés lehetőségét. Ez azért kritikus, mert a *bleb* elektrofiziológiai paraméterei nagyban hasonlók a mohatermináliséhoz, ezért nehéz a mért jelek tulajdonságai alapján elkülöníteni őket egymástól. Ugyanakkor biológiai szempontból a *bleb* nem tekinthető valós axonális struktúrának. Az elvezetett struktúra axonális eredete viszont egyértelműen igazolható az elektromos tulajdonságok alapján^[153,156,157]. Ilyen megkülönböztető tulajdonság a nagy, több $\text{G}\Omega$ -os bemenő ellenállás, ami kicsi, tipikusan $1\text{-}2 \text{ pF}$ nagyságú kapacitással társult. Current-clamp módban alkalmazott, hosszan tartó, küszöbfeletti depolarizáló négyszögjelre a terminálisok egyetlen (nagyon ritkán kettő) akciós potenciállal válaszoltak, mindig a

négyszögimpulzus elején. Ha rövid áramimpulzusokkal száz darab akciós potenciálból álló, 50 Hz-es AP sorozatot váltottunk ki a terminálisban, akkor a sorozat végén az akciós potenciálok a moharostra jellemző kiszélesedést mutattak. A preszinaptikus terminálisokból történő izolált kalciumáram mérésekhez olyan intracelluláris oldatot használtunk, melyben a K-glükonát teljes mennyiségét cézium-kloridra cseréltük. Ezzel a belső oldattal megszüntethető a káliumáramok jelentős része, mivel a káliumcsatornák zöme nem átjárható a céziumion számára. A kalciumáramokat úgy különítettük el a többi ionáramtól, hogy az elvezető oldathoz adtunk 1 μ M tetrodotoxint (TTX), így blokkolva a feszültségfüggő nátrium csatornák működését, illetve 5 mM 4-aminopiridint (4-AP), és 10 mM tetraetil-ammóniumot (TEA) hogy gátoljuk a cézium jelenlétében fennmaradó feszültségfüggő kálium csatornákat. Emellett a kalcium csatornákon átfolyó ionáram erősségét is megnöveltük úgy, hogy 2 mM helyett 3 mM CaCl_2 -ot használtunk az elvezető oldatban, ami a nagyobb hajtóerő következtében nagyobb és jobban mérhető kalcium áramokat eredményezett. Ezekben a kísérletekben csak a kis kapacitás és nagy bemenő ellenállás alapján azonosítottuk a mohaterminálisokat, mert nem tudtuk használni az akciós potenciál tulajdonságait a struktúra eredetének igazolásához.

3.4. Elektrofiziológiai mérések nagy ellenállású pipetták felhasználásával (2. projekt)

Részletesen szeretnék kitérni a közvetlen dendritikus elvezetésekkel szükségszerűen együtt járó mérés technikai nehézségekre. Az értekezés tudományos kérdéseiben mindig azt vizsgáljuk, hogy egy adott biológiai esemény vagy jelenség milyen hatással van az idegsejtek elektromos viselkedésére. Ennek megfelelően, a kérdések olyan technikai eljárást igényelnek, amivel mérni lehet az egyedi idegsejtek membránpotenciál változásait és a változások háttérében álló ionáramok tulajdonságait. Erre a célra egészszejtes *patch-clamp* technikát alkalmaztunk, ahol a sejt belseje és a külső tér közötti feszültségkülönbség mérését egy fokozatosan elvékonyodó üvegapilláris (a továbbiakban pipetta vagy elektróda) közvetítésével valósítjuk meg. Egy ilyen pipetta végső átmérője annyira kicsi, hogy egy finom mozgású mikromanipulátor segítségével közvetlenül a sejt felszínére helyezhető (5. A Ábra). A megfelelő pozicionálás után, negatív nyomás hatására elérhető, hogy a sejtmembrán betüremkedjen a pipetta belsejébe, ahol a sejthártya szorosan kitapad az üvegfelületre (5. B Ábra). Ez a

membrán-üveg határfelület az úgynevezett *seal*, ami gigaohmos nagyságrendű elektromos ellenállást biztosít az extracelluláris térrész felé. Ha ebben az állapotban beszakítjuk az üvegapillárisba betüremkedett membránrészt („betörés”), akkor a pipettába töltött folyadék közlekedni tud a sejt belső folyadékterével, és egy olyan mérési elrendezés alakul ki, ahol a pipetta belseje elektromos értelemben megegyezik a sejt belső terével.



5.Ábra. A patch-clamp mérés technika

A, DIC kép egy éppen elvezetett szemcsesejtről és a hozzá kapcsolódó pipettáról. B, A pipetta és a sejtmembrán viszonyát bemutató vázlat. A felső kép közvetlenül a sejtmembrán beszakítása előtti állapotot tükrözi, amikor a membrán nagy ellenállású seal-t formálva már mélyen betüremkedett a pipetta belsejébe és kitapadt a pipetta belső falára. Az alsó kép az elvezetés közben jellemző állapotot tükrözi, ahol a sejtmembrán már beszakadt. A kis képek egy valós sejtmembrán pipettán belüli szakaszáról készült fluoreszcens képek. Látható, hogy a betörést követően a membránszakasz folytonossága megszakad. C, A sejt és a pipetta helyettesítő áramköri elemei. R_m és C_m a sejtmembrán ellenállása illetve kapacitása, $R_{p\acute{o}rus}$ a sejtmembránon kialakított nyílás ellenállása, R_{seal} a sejtmembrán és pipetta által formált seal ellenállása, R_p és C_p a pipetta ellenállása illetve kapacitása, V_m és V_p pedig a membránpotenciál és a pipettában mérhető feszültség.

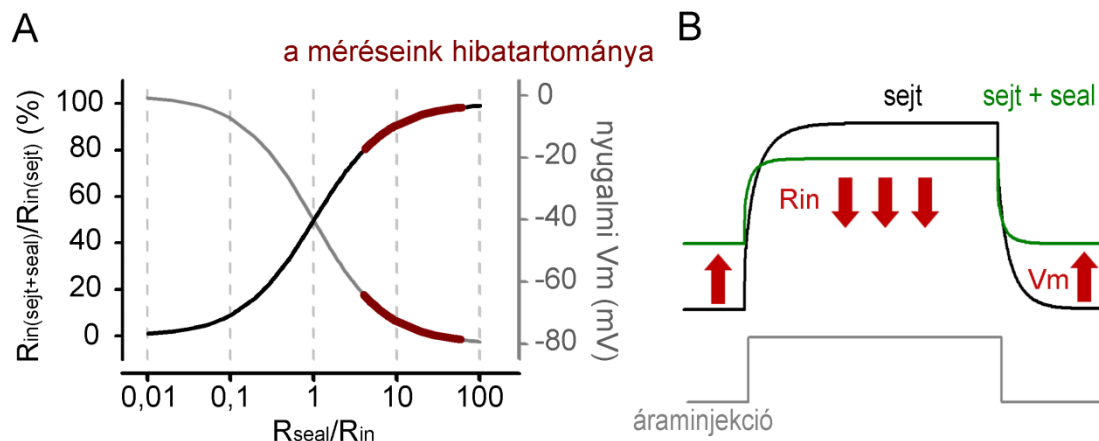
Mivel a seal nemcsak fizikailag, de elektromosan is elválasztja a sejt-pipetta folyadékteret a sejten kívüli térrésztől, a pipettában levő mérőelektróda és egy sejten kívüli referenciaelektróda segítségével mérhetővé válik a sejtmembránon zajló elektromos tevékenység. Bár ez a technika megfelelő jelerősítés mellett kiváló jel/zaj viszonyt eredményez, korántsem nevezhető ideálisnak. Egy ideális mérőrendszer ugyanis úgy biztosítaná a jelek torzulásmentes mérését, hogy egyáltalán nincs hatással a mért rendszer, jelen esetben a sejt viselkedésére. Ebben az esetben azonban az üvegapilláris, a seal, a pipettába töltött folyadék olyan tényezők, amelyek kihathatnak a vizsgált sejt a viselkedésére. Ahhoz, hogy az így nyert mérések eredményét megfelelően értelmezni tudjuk, végig kell tehát gondolnunk, hogy milyen hatással lehet a pipetta a sejtmembránon zajló elektromos folyamatokra. A kérdés megvizsgálása során a pipetta

elektromos viselkedését egy rá jellemző ellenállás- és kapacitásértékkel írhatjuk le, melyek az üvegapilláris valamint a bele töltött oldat jellemzőiből adódnak. Ennek megfelelően elektromos értelemben a pipetta és a sejtmembrán egy sorba kapcsolt RC áramkörnek tekinthető, ahol az ellenállás nagyságát a pipetta hegyének geometriája és az intracelluláris oldat vezetőképessége határozza meg, míg a használt üveg elektromos tulajdonságai és az üveg/folyadék határfelület kiterjedése együttesen felelős a kapacitív komponens mértékéért (5. C Ábra). A fizikai hatások csökkenthetők és tág tartományban kompenzálhatók. Ennek köszönhetően a sejttestből történő mérések folyamán a mérőrendszer által bevezetett biológiai jeltorzulás csekély mértékű magához a jel nagyságához viszonyítva. A nehézségek akkor kezdődnek, ha nem a sejttestből, hanem a sejt valamelyik kisebb funkcionális egységéből, például a dendritből vagy az axonból végzünk patch-clamp méréseket. Az elmúlt évtized technikai - elsősorban optikai - fejlődése lehetővé tette a nagyon kicsi, akár mikrométernél is kisebb átmérőjű strukturális elemek elektrofiziológiai vizsgálatát. Egy ilyen kicsi membránfelületen azonban csak hasonlóan kis szájadékú pipettát lehet elhelyezni, ami szükségszerűen sokkal nagyobb pipetta ellenállást eredményez. A pipetta ellenállásánál is súlyosabb akadály, hogy az elvezetett struktúra saját biofizikai paraméterei - a helyi ellenállás és kapacitás viszonyok - annyira kicsik, hogy a pipetta jelenléte döntő mértékben megváltoztathatja a struktúra viselkedését. A következőben áttekintem, hogy milyen hatásokkal lehet és kell számolni a pipetta jelenléte miatt current-clamp elvezetések során.

Mindenekelőtt meg kell vizsgálni a dendrit bemenő ellenállása és a seal minősége között fennálló viszonyt. Mivel az üveg és a membrán között levő seal ellenállása nem végtelen, és a néhány gigaohmos ellenállás még számottevő töltés szivárgást engedhet meg, ezért a sejt szemszögéből nézve a seal egy nem specifikus konduktanciát jelent. A sejt szempontjából ez a szivárgás ugyanolyan, mintha folyamatosan nyitva lenne egy csoport nem specifikus ioncsatorna, ami próbálná megszüntetni a külső és a belső tér közötti potenciálkülönbséget. A seal jelenlétének következményeként a nyugalmi membránpotenciál tehát közelebb kerül a 0 mV-hoz. A hatás mértéke azonban nemcsak a seal vezetőképességétől függ, hanem a sejt és a seal viszonya együttesen határozza meg, az alábbi összefüggésnek megfelelően^[158]:

$$V_m = \frac{R_{arány} * E_m}{1 + R_{arány}} \quad (2)$$

ahol V_m jelenti a membránpotenciált, E_m a sejt nyugalmi konduktanciáinak fordulási potenciálja, az $R_{arány}$ pedig a két konduktancia mennyiségi viszonya (R_{seal}/R_{in}). Ez az összefüggés azt fogalmazza meg, hogy csak akkor tudjuk megbecsülni a sejt nyugalmi membránpotenciálját, ha nagyságrendekkel kevesebb töltés szivárgást enged meg a seal, mint amekkora a nyugalmi membránpotenciált meghatározó teljes konduktancia mennyisége (6. A Ábra). Például, ha egy 500 M Ω bemenő ellenállású, -80 mV nyugalmi membránpotenciállal rendelkező sejtben olyan sealt alakítunk ki, amely 2 G Ω nagyságú ($R_{arány}=4$), akkor a nyugalmi membránpotenciál -64 mV-ra változik az elvezetés miatt.



6.Ábra. A seal jelenlétéből adódó hatások

A, A seal ellenállás (R_{seal}) és a bemenő ellenállás (R_{in}) viszonyából jósolható változások. A szürke vonal az eredetileg -80 mV-os nyugalmi membránpotenciál változását mutatja, míg feketével láthatjuk a seal jelenlétének a bemenő ellenállásra kifejtett hatását különféle ellenállás arányok mellett. Vörössel jelöltem a dendritikus elvezetéseket jellemző hibatarományt (R_{seal}/R_{in} arány=4,7-50). B, A sejt által adott válasz megváltozása a seal jelenléte miatt. Fekete vonal jelöli a képzeletbeli idegsejt válaszát egy általánosan használt hosszú négyzetes áramimpulzusra (szürke), míg zölddel látható a pipetta jelenlétében megváltozott válasz. A vörös nyilak a változások irányát jelzik.

A nyugalmi membránpotenciál mellett a sejt válaszadó képessége is megváltozik a pipetta jelenlétében. Általánosságban a sejt válaszadó képességét a bemenő ellenállással (R_{in}) lehet jellemezni. Ez az az ellenállásérték, mely megmutatja, hogy a sejtmembránon átfolyó áram (ami eredhet ionszatórnák működéséből, vagy akár áraminjekcióból a pipettán keresztül) mekkora potenciálváltozást eredményez a sejtben.

Minél kisebb a bemenő ellenállás, annál nagyobb áramerősség mellett váltható csak ki a sejt tüzelése, vagyis kevésbé ingerelhetőek a sejtek. Az R_{in} értéket hosszan tartó kismértékű áraminjekció segítségével szokás meghatározni (6. B Ábra). Az elvezetés miatt a bemenő ellenállás is megváltozik, úgy, hogy a változás mértékét ebben az esetben is a sejt és a seal közösen határozzák meg:

$$R_{in} = \frac{R_m * R_{seal}}{R_m + R_{seal}} \quad (3)$$

Ahol R_{in} jelenti a bemenő ellenállást, R_m és R_{seal} pedig a sejtmembrán, illetve a seal ellenállását^[159]. Pipetta jelenlétében tehát a sejt egységnyi bemeneti ingerre kisebb feszültséglépéssel fog válaszolni a csökkent bemenő ellenállás miatt. Az előző példánknál maradva egy 500 M Ω bemenő ellenállású sejt esetén 20%-os bemenő ellenállás csökkenést okoz a 2 G Ω nagyságú seal jelenléte.

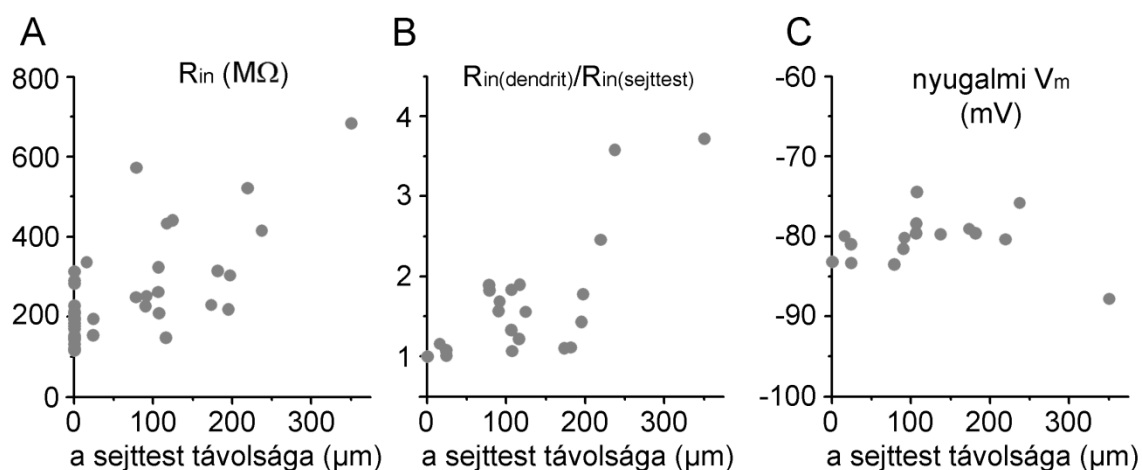
A seal tulajdonságai mellett a pipetta kapacitása is okozhat nagymérvű változásokat a sejt viselkedésében. Tudjuk ugyanis, hogy a sejt által mutatott gyors feszültségváltozások - például egy akciós potenciál, vagy egy serkentő szinaptikus potenciálválasz (EPSP) - nemcsak a változást hajtó ionáram nagyságától függenek, hanem a sejtmembrán kapacitásától is, mert egy adott ionáramnak először fel kell töltenie a sejt kapacitív felszínét, mielőtt tényleges potenciálváltozást generálna. Az üvegből készült pipetta azonban önmagában egy többletkapacitást jelent, melyet szintén fel kell töltenie az ionáramoknak, mielőtt befolyásolni tudnák a membránpotenciált. Egy ionáram által az időegység alatt létrehozott potenciálváltozás (dV/dt) mértéke tehát pipetta jelenlétében a következő összefüggéssel írható fel:

$$\frac{dV}{dt} = \frac{I_{ion} + I_{tot}}{C_m + C_p} \quad (4)$$

ahol I_{ion} a változást hajtó ionáram, I_{tot} a háttérben folyó nettó ionáramot, C_m és C_p pedig a sejtmembrán és a pipetta kapacitása. Bár az összefüggésben jelen van a seal hatása is (az előbbi megfontolások alapján ugyanis részt vesz a nettó háttéráram kialakításában), dinamikus potenciálváltozások esetén nagyobb súllyal szerepel a pipetta kapacitásának hatása. Az összefüggésnek megfelelően a pipetta jelenléte lassítja a membrán válaszadó képességét, de a hatás mértéke egyformán függ a sejt és a pipetta

kapacitásától. Például, ha a sejt teljes kapacitása 30 pF nagyságú, akkor egy 10 pF kapacitással rendelkező pipetta jelenléte 25 %-al csökkenti a sejt maximális válaszadó képességét.

Általánosan azt mondhatjuk tehát, hogy a pipetta jelenléte többféle módon is befolyásolja a sejt viselkedését úgy, hogy a hatás mértéke nem pusztán a pipetta paramétereitől, hanem a pipetta és a sejt tulajdonságainak viszonyától függ. Hagyományos, sejttestből történő mérések esetén a sejt saját kapacitív és rezisztív tulajdonságai dominálnak a pipetta paramétereit felett, ennek megfelelően a pipetta hatása elég kicsi ahhoz, hogy kellő nagyvonalúsággal, bizonyos kérdések esetén eltekinthetünk tőle. Más a helyzet azonban a szemcsesejt dendritekhez hasonlóan kicsi struktúrák esetén. Ebben az esetben már gondosan mérlegelni kell a sejt és a pipetta viszonyát. Az előbbieken vázolt logikának megfelelően az egyik kérdés, amit meg kell vizsgálni, az a sejt és a dendrit viszonya. Modellezési adatok, és közvetlen mérések bizonyítják, hogy a szemcsesejt dendritek bemenő ellenállása a sejttest közelében gyakorlatilag megegyezik a szomatikus értékkel, azonban kifelé haladva a dendriten folyamatosan növekszik (7. A és B Ábra), és a csúcson közelítheti az 1 GΩ körüli értéket is.



7.Ábra. Szemcsesejt dendritek viselkedése a passzív tartományban

A, A dendritekben mért bemenő ellenállás (R_{in}) a sejttesttől mért távolság függvényében. B, A dendritben mérhető bemenő ellenállás normalizálva az adott dendrithez tartozó sejttest bemenő ellenállására. C, A dendritekben mért nyugalmi membránpotenciál (V_m) értéke a sejttesttől mért távolság függvényében.

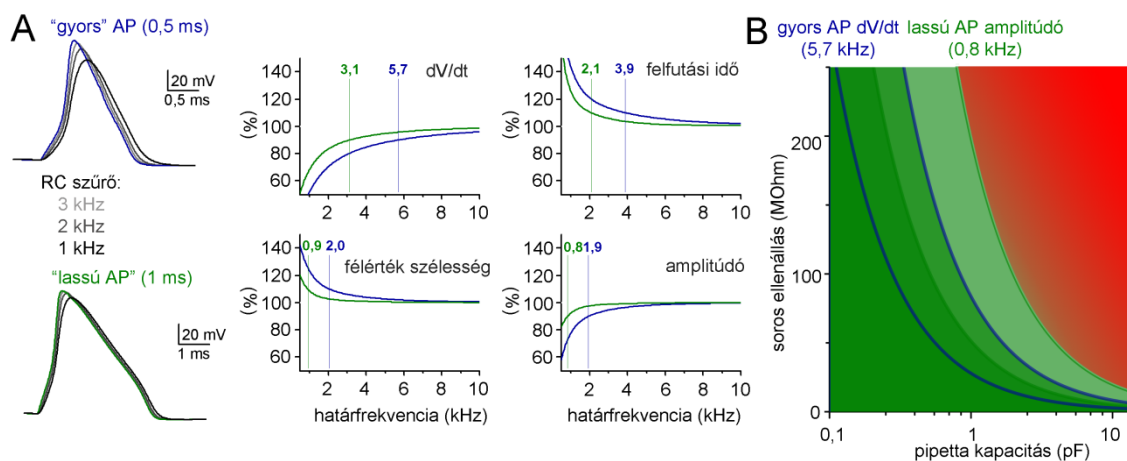
Tehát a jelentős mértékű R_{in} miatt csökken az $R_{arány}$ értéke, és egy olyan seal ellenállás, amely megfelelő elvezetést biztosít a periszomatikus régióban, már nem biztos, hogy megfelelő a disztális dendritek mérései során. A tény, hogy a dendritikus elvezetések során a nyugalmi membránpotenciál értéke egyenletes volt a dendrit mentén, azt sugallja, hogy sikerült mérésre alkalmas tartományban tartanom a seal ellenállást (7. C Ábra). A bemenő ellenállás mellett a helyi kapacitásviszonyok is folyamatosan változnak a dendrit mentén. A sejttest közelében akár 100 pF nagyságú kapacitás a dendrit csúcán egy nagyságrenddel kisebb értéké zsugorodik, mely már a lehető legalaposabb kompenzációt igényli. Ahogy majd láthatjuk később, méréseink során a nem kompenzált kapacitás mértéke néhány tized pF nagyságú volt, melynek a jelenléte feltehetően még nem torzítja a kialakuló potenciálváltozás alakját, mivel ez több nagyságrenddel kisebb még a dendritek alacsony membránkapacitás értékénél is. Tehát úgy gondoljuk, hogy a pipetta jelenléte még tolerálható mértékben befolyásolta a dendrit viselkedését a kísérleteinkben.

A pipetta azonban nemcsak a jelek keletkezésére lehet hatással, de a fizikai tulajdonságaitól függően befolyásolhatja a keletkezett jelek terjedését is a pipettában. Ebben az esetben a kapacitás mellett kulcsfontosságú tényezőként szerepel a pipetta ellenállása (R_p) is. Abból kell kiindulnunk, hogy a pipetta minden más RC áramkörhöz hasonlóan aluláteresztő szűrőként viselkedik. Szomatikus elvezetések esetében a pipetta által meghatározott soros ellenállás egy olyan tartományban mozog (5-30 M Ω), ahol megfelelő kapacitás neutralizálás mellett a szűrő viselkedés nem befolyásolja érdemben a jelek alakját. A dendritikus elvezetések azonban olyan nagy ellenállású pipetták használatát igényelték, ahol már számolni kell a jel alakjának változásával is. Ezekben az esetekben ugyanis 25-40 M Ω ellenállású pipettákat használtunk, ami akár 200 M Ω soros ellenállást eredményezhet. Mint láttuk a soros ellenállás (R_s) nem más, mint a pipetta ellenállása és a sejtmembránon kialakított nyílás ellenállásának az eredője (lásd az 5.C Ábrát). Mivel elektromos értelemben egymással sorba kötött áramköri elemekről van szó, a soros ellenállás a két ellenállás összege. A soros ellenállás jelenti a mérés szempontjából releváns ellenállásértéket, ezért ezt az ellenállást kell figyelembe venni a potenciális szűrőhatás feltérképezése során. Egy ellenállás és a vele sorba kötött kapacitás szűrő hatása azzal a határfrekvenciával (f_c) jellemezhető, melynél a jel

erőssége 3 dB-t csökken. A soros ellenállás és a pipetta kapacitás viszonyát a határfrekvenciával a következő összefüggés írja le^[155]:

$$f_c = \frac{1}{2 \cdot \pi \cdot R_s \cdot C_p} \quad (5)$$

Az összefüggésnek megfelelően minél nagyobb a C_p , illetve a R_s értéke, annál kisebb frekvenciájú (vagyis lassabb) az a feszültségjel, amely még csillapítás nélkül halad át a pipettán. Mivel a kísérleteinkben a leggyorsabb idegi feszültségjeleket, az akciós potenciálokat vizsgáltuk, méghozzá úgy, hogy az akciós potenciál alakjára fókuszáltunk, ezért a pipetta szűrő hatásának minimalizálása alapvető fontosságú volt a mi esetünkben. A szűrés vizsgálatakor érdemes első közelítésben azt megnézni, hogy az AP egyes paraméterei milyen határfrekvencia alatt kezdenek érdemben megváltozni. Ha pedig már feltérképeztük a határfrekvencia tartományt, amelyen belül a pipetta nem torzította jelentősen az AP alakját, akkor azt is megvizsgálhatjuk, hogy milyen soros ellenállás- és kapacitásviszonyok esetén tudunk a határfrekvencia felett maradni.



8.Ábra. A pipetta jelszűrő hatása

A, Különböző határfrekvenciájú (3-1 kHz) RC szűrő hatására bekövetkező alakváltozások egy gyorsabb (kék) és egy lassabb (zöld) akciós potenciál esetén. A zárójelben megadott értékek az eredeti AP félérték-szélességét jelzik. A grafikonokon a két AP paramétereiben mért változás látható az RC szűrő határfrekvenciájának függvényében. A szaggatott vonalak és a fölérjük írt értékek azt a határfrekvenciát jelölik, ahol már 10 %-os eltérés tapasztalható az adott paraméterben. B, Az A panelen bemutatott elemzés segítségével nyert határfrekvencia értékekhez tartozó soros ellenállás - pipetta kapacitás párok. A grafikon zöld területére eső tulajdonságok esetén egy pipetta biztonságosan használható akár az AP paramétereinek meghatározására is, míg a vörössel jelölt terület a „veszélyes zóna”, ahol már egészen biztosan torzul az elvezetett AP összes mért paramétere. A zónák felosztása csak az itt bemutatott 0,5-1 ms félérték-szélességű AP-k esetén érvényes. Ennél gyorsabb AP esetén a zónahatár balra tolódik, míg az AP-t lelassítva a határ jobbra mozdul el.

A 8.Ábra A paneljén mutatom be, hogy milyen hatással van egy RC szűrő az akciós potenciál alakjának egyes paramétereire. Általánosságban az figyelhető meg, hogy az AP leggyorsabb komponensei (felfutási idő, dV/dt maximum) sokkal magasabb határfrekvencia alatt fognak torzulni, mint a lassabban változó paraméterek (amplitúdó, félérték-szélesség), melyek meglepően alacsony határfrekvenciáig változatlanok maradnak. Az is látható, hogy minél lassabb az eredeti AP lefutása, annál kevésbé érzékenyek a tulajdonságai a szűrő hatásra. Ebből következik, hogy ha csak az AP csúcsát és a félérték-szélességet szeretnénk megbízhatóan mérni, akkor még fiziológias hőmérsékletre jellemző gyors AP lefutás esetén is elegendő a 2 kHz-es határfrekvencia felett maradni. Ezzel szemben, ha a célunk a dV/dt maximumának hiteles meghatározása, akkor a legalább 6 kHz-es határfrekvencia biztosítása a minimális követelmény. Mivel a dendritikus elvezetések szobahőmérsékleten történtek, ahol az AP némileg lassabb lefutást mutat, az AP-csúcs és a félérték-szélesség meghatározása 1,5 kHz-es határfrekvencia mellett már kis mérési hibával megvalósítható. Most, hogy ismerjük a határfrekvencia feltételeket, a 4. egyenletben bemutatott összefüggés alapján meghatározható, hogy milyen ellenállás és kapacitás érték párok tartoznak egy-egy határfrekvenciához. Az összefüggés az ábra jobb oldalán azt mutatja, hogy akár 200 M Ω soros ellenállás mellett is lehetséges az akciós potenciál lefutásának a mérése, de minél nagyobb a pipetta ellenállása, annál kisebb kapacitás mellett tudjuk csak hűen követni az akciós potenciál lefutását. A görbéből az is kiolvasható, hogy nagy pipetta kapacitás (a pipetta kapacitásának alacsonyan tartására alkalmazott módszert lásd később) jelenlétében akkor is torzulhat az AP alakja, ha jó soros ellenállás mellett dolgozunk.

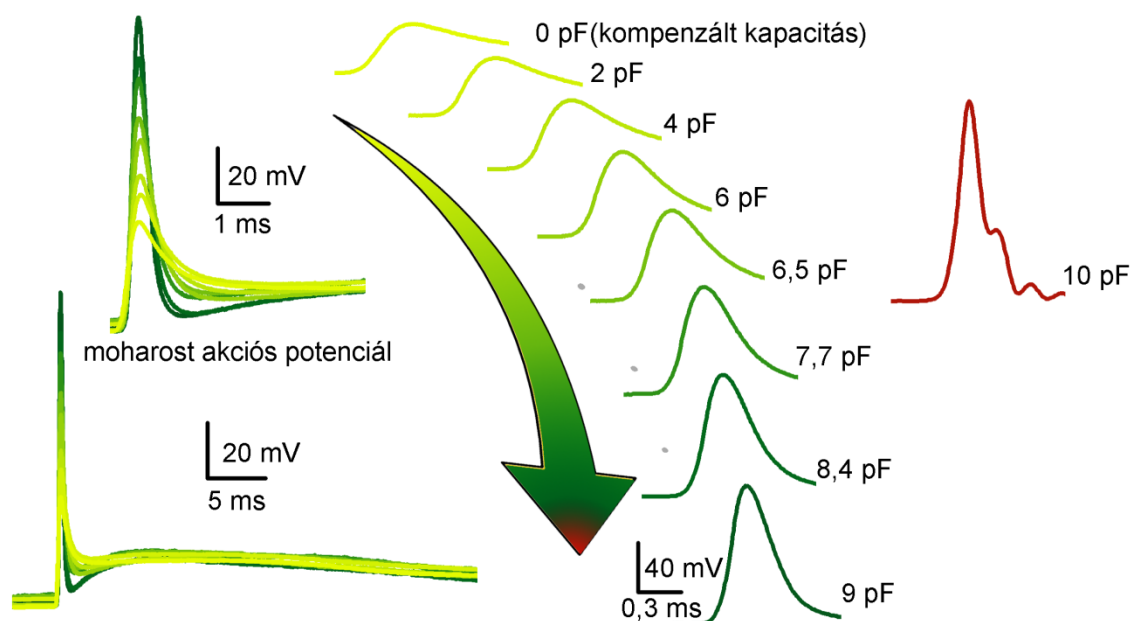
A pipetta nemcsak a sejtben keletkezett jeleket módosítja, hanem ettől függetlenül is befolyásolhatja a mérésünket. A soros ellenállásnak következtében ugyanis minden sejtbe injektált áram egy látszólagos feszültségjelet generál a pipettában. Azért tekintjük látszólagosnak, mert ez a feszültségjel teljesen független a sejt valós membránpotenciáljától, helyette a feszültségeltolás nagysága Ohm törvényének megfelelően csak az injektált áram nagyságától és a soros ellenállás értékétől függ:

$$V_p = V_m + I * R_s \quad (6)$$

ahol V_p jelenti a pipettában mérhető feszültséget, I az injektált áramot R_s pedig a soros ellenállást. A nagy soros ellenállással együtt járó kísérletekben a feszültségeltolás jelentős mértékű lehet, csaknem akkora, mint a sejt válasza. Szerencsére azonban többféle módszerrel is „megtisztíthatjuk” a mérési eredményünket a pipetta ellenállás okozta feszültségeltolástól. Először is, mivel a feszültségeltolás csak látszólagos jelenség, és nem szól bele a sejt működésébe, lehetőségünk van arra, hogy utólagosan, a kísérletet követően levonjuk a kísérleti adatokból a pipetta eredetű feszültségkomponenst. A fent leírt összefüggés alapján ugyanis pontosan meghatározható a kivonandó feszültségérték. A másik lehetőség az, hogy az erősítő beépített *bridge* áramkörét használva már a kísérlet közben eltávolítjuk a mért feszültségjelből a nem kívánt komponenst. A *bridge* áramkör működése során kivonja az injektált áram hullámformáját a pipetta feszültségjeléből úgy, hogy a kivonásra kerülő jel nagyságát be tudjuk állítani a soros ellenállásnak megfelelően. Mivel a soros ellenállás a kísérlet folyamán változhat (általában sajnos nő), rendszeres időközönként ellenőrizni kell a kompenzáció minőségét. Ehhez nem is kell más, csak egy pillanatszerűen felfutó áramlépcső, ugyanis a gyors változás hatására a mért jelünkben azonnal megjelenik a pipetta eredetű passzív feszültségugrás, miközben a sejt lassabban válaszol a jelentős kapacitív terhelés miatt. Ily módon nagy biztonsággal elválasztható a sejtől eredő feszültségjel a pipetta jelétől. Azonban a pipetta által formált RC kör ezt a pillanatszerű feszültég ugrást is lelassítja. Ennek következtében nem fogjuk tudni megbecsülni, hogy mekkora valójában a látszólagos komponens a mért jelünkben. Az egyetlen mód a probléma áthidalására, ha csak a pipetta kapacitás eliminációja után kompenzáljuk a soros ellenállás hatását, vagyis akkor, amikor a pipetta eredetű feszültségjel újra pillanatszerűvé válik (részletesen lásd később). A harmadik megoldás az lehet, hogy nem egy, hanem két elektródával végezzük a méréseinket, úgy hogy csak az egyik elektródát használjuk áraminjekcióra, a másik elektródán pedig mindig csak monitorozzuk a feszültségváltozást. Mivel a monitorozó pipettán keresztül nem injektálunk áramot, így ez a csatorna feszültségeltolástól mentes jelet közvetít az erősítő felé.

Talán az eddigiek alapján egyértelművé vált, hogy kis struktúrából (például a kisátmérőjű dendritek vagy axonok), nagy ellenállású pipettával csak akkor tudunk

valóban értelmezhető biológiai eredetű elektromos jeleket regisztrálni, ha a lehetséges legnagyobb mértékben csökkentjük a pipetta kapacitását (9.Ábra).



9.Ábra. Egy mohaterminálisból regisztrált AP alakja, a pipetta kapacitását semlegesítő áramkör különböző beállításai mellett

Baloldalt az AP-k egymással átfedve kerültek bemutatásra a jobb összehasonlíthatóság kedvéért. A nagyobb időskálán bemutatott alsó jeleken az is megfigyelhető, hogy a jeltorzulás elsősorban a gyors változásokat érinti, míg a sokkal lassabb utódepolarizáció szinte független a pipetta kapacitásától. Balra fent ugyanazok az AP-k láthatók egyesével, rövid időskálán bemutatva. A számok az egyes AP alakok mellett az alkalmazott neutralizáció nagyságát jelölik. A jobb oldalon bemutatott AP alak már a túlkompenzálás esetén kialakuló oszcilláció jeleit mutatja.

Két dolgot tudunk tenni a pipetta kapacitásának csökkentése érdekében. Először is magát a kísérleti eszközt tudjuk optimalizálni úgy, hogy minél kisebb legyen a pipetta fizikai kapacitása. Ennek többféle módja van, például vastagabb falú üveg használata csökkenti a pipetta kapacitását. Mindemellett be is vonhatjuk a pipettánk folyadékba merülő részét egy olyan anyaggal, amely izolálja a pipettát a külső folyadéktértől (például viasszal). Fontos, hogy a lehető legnagyobb mértékben lecsökkentsük a pipettával érintkező külső és belső folyadékfelszínt is. A bemutatott dendritikus elvezetések során vastag falú (0,375-0,38 mm falvastagságú) boroszilikát kapillárisokat használtunk, melyet fogászati viasszal vontam be. Az optimalizálást követően már csak magát az erősítőt hívhatjuk segítségül a kapacitás további csökkentéséhez. A current-clamp mérésekre optimális erősítők tartalmaznak ugyanis egy kapacitás neutralizáló

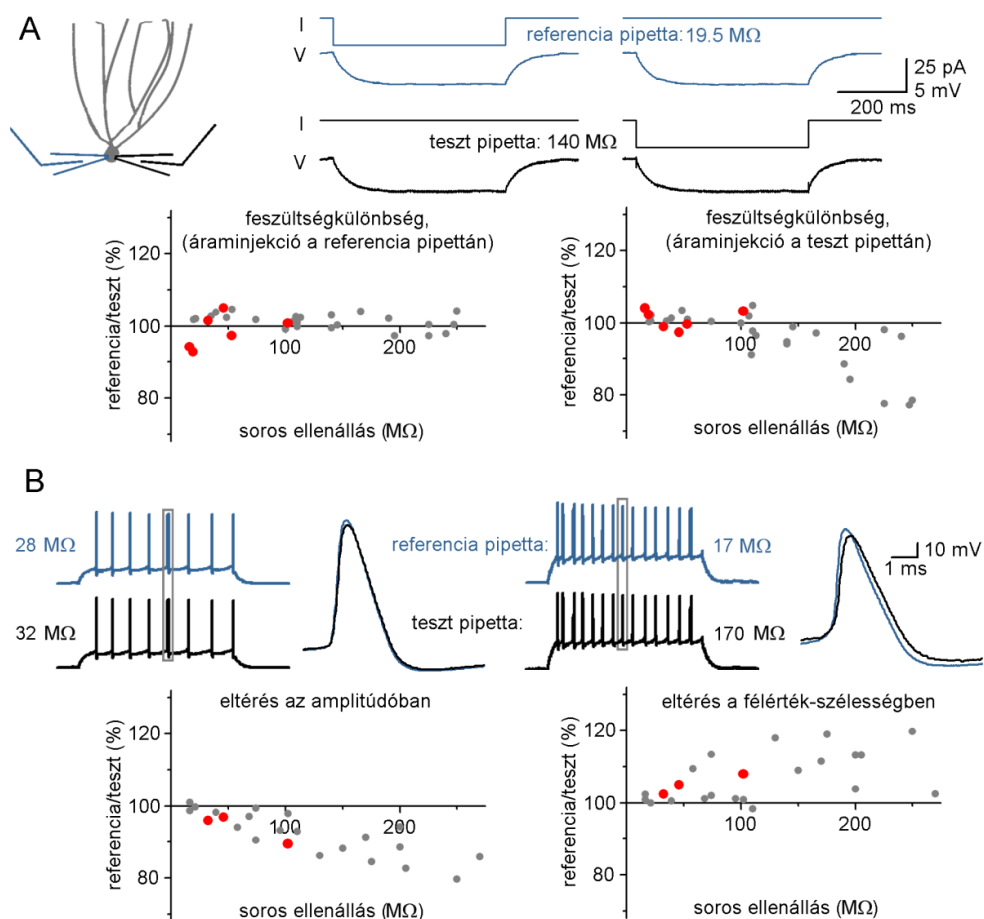
áramkört, amivel nagyon hatékonyan, közel teljes mértékben megszüntethetjük a pipetta kapacitását. Azért nem lehet teljes a neutralizáció, mert ez a kompenzáló mechanizmus egy pozitív visszacsatolási áramkör, ami teljes kompenzáció esetén a mérőrendszer gerjedéséhez, intenzív oszcillációjához vezet, amely szinte mindig az elvezetett sejt halálához vezet. Akkor járunk el helyesen, ha a kompenzálás mértéke még éppen nem gerjeszti be az erősítőt. Már ennél az értéknél is megfigyelhető azonban, hogy a neutralizáció a zajszint jelentős növekedésével jár együtt. Az elérhető maximális kompenzálás mértéke nem egy állandó tulajdonság, hanem mérésről mérésre változik, mert az aktuális soros ellenállás döntően befolyásolja, hogy milyen mértékű kompenzálást enged meg az erősítő áramkör. Ennek a megértéséhez vissza kell kanyarodnunk ahhoz a megállapításhoz, hogy a pipetta fizikailag egy RC kör, melynek viselkedését egy időállandóval (τ) jellemezhetjük, a

$$\tau = R_s * C_p \quad (7)$$

összefüggés alapján. A kapacitás neutralizáció következményeként lényegében csökken a kapacitás, ami az időállandó felgyorsuláshoz vezet. Ha tovább növeljük a neutralizálás mértékét, akkor elérünk egy olyan tartományba, ahol már annyira gyors lesz a feszültségváltozás, hogy az a rendszer oszcillációját okozza. Ilyen értelemben tehát az oszcilláció kezdete jellemezhető a hozzá tartozó időállandó értékkel. Mivel a kapacitás és az ellenállás együttesen határozza meg az időállandót, így belátható, hogy kis pipetta ellenállás mellett már nagyobb reziduális kapacitás is kiválthatja az oszcillációt, míg egy nagy ellenállásérték közel teljes neutralizálást enged meg, azaz a nagyobb soros ellenállás ebből a szempontból előnyös a current-clamp elvezetésekhez.

Bár minden elméleti adat arra mutatott, hogy megfelelően kontrollált kísérletekkel lehetséges értékelhető feszültségjeleket nyerni még ennyire szélsőséges körülmények között is, mi mégis úgy döntöttük, hogy kísérletes úton is meghatározzuk a mérési elrendezésünk elfogadhatóságának határait. Olyan kételektrodás kísérleteket végeztünk, melyben az egyik pipetta mindig egy kis ellenállású, hagyományos elektróda volt, míg a másik pipetta ellenállása tág tartományban változott. A kis ellenállású pipettát használva referenciaként, arra voltunk kíváncsiak, hogy a soros ellenállás függvényében hogyan fognak megváltozni a másik pipettán (a teszt pipettán) mért jelek tulajdonságai. Első

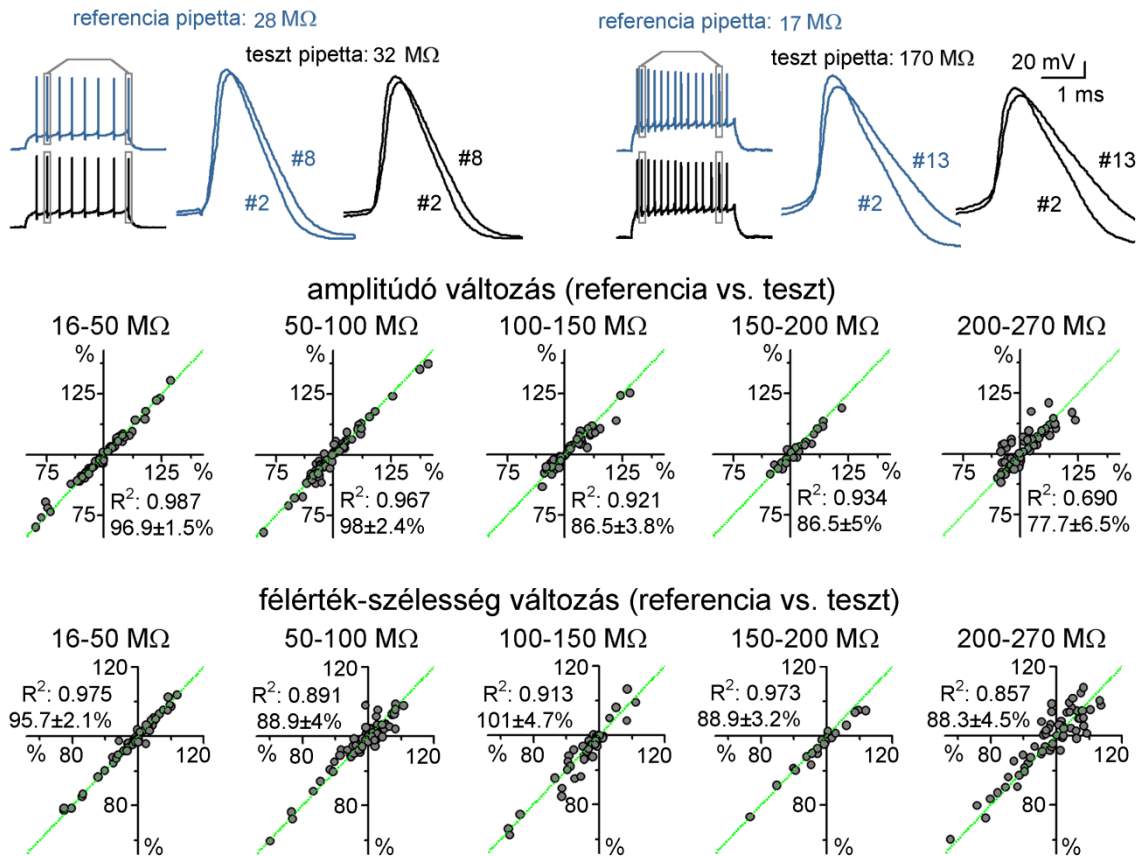
közelítésben a lassú feszültségjelekre fókuszáltunk. Ahogy az a 10.A Ábrán látható, a teszt pipetta feszültségjele soros ellenállástól függetlenül híven követte a referenciajelet abban az esetben, ha a referencia pipettán keresztül injektáltuk be a hosszan tartó áramlépcsőt. Ezzel ellentétben, ha a teszt pipetta volt az áram forrása, akkor a soros ellenállás növekedésével párhuzamosan nőtt a különbség a két jel között, valószínűleg azért, mert az áraminjekció hatására nagy R_s értékek esetén megjelenik a nem kompenzálható, látszólagos feszültségeltolás.



10.Ábra. A jeltorzulás kísérletes úton meghatározott mértéke

A, Az idő-független, állandó állapotot elérő feszültségjelek a teljes vizsgált soros ellenállás tartományban torzulás nélkül mérhetőek, de csak akkor, ha a méréshez használt pipettát nem használjuk áraminjekcióra (bal oldali grafikon). Magasabb ellenállás tartományban ugyanis az egyidejűleg injektált áram jelentős – 200 MΩ felett akár 10-20%-os – feszültségeltolás forrása is lehet (jobb oldali grafikon). A grafikonok minden egyes pontja egy kísérletet jelent. A vörös pontok olyan adatok, amik a bAP tulajdonságait vizsgáló (23.-25. Ábra) valós kísérletekből származnak. B, Ugyanezzel a kísérleti megközelítéssel tártuk fel az akciós potenciál tulajdonságainak soros ellenállás függését is. A bal oldali grafikon az amplitúdó változását mutatja be, míg jobb oldalt láthatjuk a félérték-szélességre gyakorolt hatást. A tapasztalat szerint a dinamikus potenciálváltozásokat mérhető eltérések jellemzik minden ellenállás tartományban.

A kapott adatok tükrében úgy döntöttünk, hogy nem fogjuk használni a nagy ellenállású pipettákat áraminjekcióra. Mindemellett az is kiderült, hogy méréseink maradéktalanul alkalmasak a lassú feszültségjelek követésére. De mi a helyzet a sokkal gyorsabb akciós potenciálokkal? A 10.B Ábra erre a kérdésre is választ ad, mert ugyanezekben a kísérletekben megvizsgáltuk a mért AP alakok változását is. Tapasztalatunk szerint a soros ellenállás számottevő hatással volt az AP lefutására, ugyanis mindkét mért paraméter (amplitúdó és félérték-szélesség) megközelítőleg 10-15 %-os eltérést mutatott a 100-200 M Ω -os tesztpipetták esetében. Ez tehát az a hibataromány, amivel a kísérletek során mért abszolút feszültségértékek eltérhetnek a sejt valós membránpotenciáljától. A későbbi kísérleteink szempontjából nem is az abszolút feszültségértékek kritikusak igazán, mivel az analóg moduláció vizsgálata során a bAP-kat mindig önmagukkal hasonlítottuk össze. Ily módon legalább annyira fontos volt megtudnunk, hogy a nagy ellenállású elvezetések alkalmasak-e az AP alakban bekövetkező változások nyomon követésére. Az elvégzett ellenőrző kísérletek erre a kérdésre is választ adnak (11. Ábra). Ebben az esetben azt használtuk ki, hogy a szemcsesejtek tüzelése erős akkomodációt mutat. Ez azt jelenti, hogy már viszonylag alacsony tüzelési frekvencia is az AP alakjának megváltozásával jár, nevezetesen a későbbi AP-k a sorozatban mindig kisebb amplitúdójúak és lassabbak, mint a sorozat első néhány AP-ja. Ezt a különbséget meg tudjuk mérni a referencia pipetta feszültségjelén, majd össze tudjuk hasonlítani, hogy az AP alakja ugyanolyan mértékben változott-e meg a nagy ellenállású pipettával mérve. Ahogy az látható egészen 200 M Ω -os ellenállásig a mért változások közel 100 %-ban megfeleltethetőek egymásnak, ami azt sugallja, hogy a nagy ellenállású mérések teljes mértékben alkalmasak az AP alakban bekövetkező kis eltérések nyomon követésére is.



11.Ábra. A nagy ellenállású pipettával mért feszültségjel alkalmas az AP alakjában bekövetkező változások közvetítésére

Az itt bemutatott kontroll kísérletben arra voltunk kíváncsiak, hogy az AP alakjában bekövetkező természetes változások milyen mértékben követhetők a nagy ellenállású pipetták használata mellett. A méréshez a szemcsesejtek azon tulajdonságát használtuk ki, hogy egy akciós potenciál sorozat alatt az AP alakja nem állandó, hanem dinamikusan változik, mégpedig úgy, hogy az AP egyre szélesebbé válik, amit az amplitúdó csökkenése kísér (lásd a bemutatott). Első lépésként meghatároztuk a referencia- és a teszt pipetta közvetítésével mért változásokat az AP alakjában. Ezt követően a teszt pipettán regisztrált változásokat ábrázoltuk a referencia eltérések függvényében (a grafikonok az ábra alsó részén). Végül az adatpontokra illesztett egyenesek segítségével vizsgáltuk, hogy mennyire feleltethetők meg egymásnak a kétféle pipettán mért eltérések. A tapasztalatunk szerint 200 MΩ ellenállásig az adatpontok nagy része közel esik a teljes egyezéshez, ezért a technika alkalmas az AP alakjában bekövetkező változások nyomon követésére.

3.5. Szomato-dendritikus elvezetések (2. projekt)

Az egyidejű kételektrodás szomato-dendritikus elvezetések első lépéseként egészszejtes mérési konfigurációt alakítottam ki a dendriten. Ehhez a már említett nagy numerikus apertúrájú objektívet használva a DIC képen kerestem a szemcsesejt rétegre

közel merőleges lefutású dendriteket a DG molekuláris rétegében. Az ilyen orientációjú elvezetett dendritek kivétel nélkül szemcsesejt dendritnek bizonyultak a későbbi morfológiai azonosítás alapján. Stabil dendritikus elvezetés esetén addig vártam, amíg a dendriten keresztül betöltött fluoreszcens festék (Alexa Fluor 594, 20-40 μM) kijelölte a dendrithez tartozó sejttest helyzetét a szemcsesejt rétegben. A sejttest azonosításához a konfokális rendszert használtam, alacsony lézertenzitás mellett. Ezután egy másik pipettával kialakítottam az egészséjtes elvezetést a sejttesten is. A kísérleteket minden olyan esetben megszakítottuk, amikor a dendrit mérhető tulajdonságai (a soros ellenállás és a bemenő ellenállás megváltozása, vagy a seal minőségét tükröző zajszint) jelentős változást mutattak a töltés, vagy a sejttest elvezetése közben. Ahogy már említettem, ebben az esetben viasszal bevont vastag falú pipettákat használtunk, hogy ezzel is csökkentsük a pipetta kapacitását. Esetünkben ez $6,85 \pm 0,12$ pF nagyságú pipetta kapacitást jelentett, ami nem függött az elvezetés szomatikus távolságától ($R^2=-0,04$, $p=0,635$). Az elvezetések soros ellenállása átlagosan $118,7 \pm 10,5$ M Ω volt, melyet maximálisan kompenzáltunk az erősítő segítségével. A soros ellenállás gyenge korrelációt mutatott a sejttesttől mért távolsággal ($R^2=0,13$, $p=0,04684$). A bridge kompenzációhoz, és egyáltalán a soros ellenállás nyomon követéséhez nagy amplitúdójú, gyors áramlépcsőket iktattunk be a protokollok minden egyes lefutásába. A már tárgyalt okokból kifolyólag kiemelt figyelmet fordítottunk a kapacitás neutralizáció minőségére, aminek köszönhetően átlagosan $0,1 \pm 0,06$ pF maradék kapacitás jellemezte a dendritikus pipettákat. A feszültségjeleket megszürtük (10-20 kHz-es határfrekvencián) az erősítő beépített aluláteresztő szűrőjével (4 pólusú Bessel szűrő) és 40-250 kHz-es mintavételezés mellett digitalizáltuk. A membránpotenciál beállításához, illetve az AP-ok kiváltásához szükséges áraminjekció mindig a szomatikus pipettán keresztül történt, hogy elkerüljük a közvetlen áraminjekciót kísérő esetleges jeltorzító hatásokat. Ennek megfelelően az AP tulajdonságainak számszerűsítése a dendritikus pipettán mért jel alapján történt. Az egyes AP-kat rövid ideig tartó nagyintenzitású (2-5 ms, 0,85-2 nA) áramlépcsők segítségével váltottuk ki a depolarizált ($-64,6 \pm 0,6$ mV), illetve hiperpolarizált ($-77,2 \pm 0,6$ mV) membránpotenciálról. A kívánt membránpotenciált konstans áraminjekció segítségével tartottuk fenn ($49,4 \pm 5,5$ pA a depolarizált esetben, míg $1,5 \pm 3,3$ pA hiperpolarizált feszültség esetén). Kizártuk azokat a kísérleteket, amelyben a dendritikus pipetta soros ellenállása meghaladta a 200

M Ω -ot, vagy a sejt nyugalmi membránpotenciálja -65 mV-nál depolarizáltabb volt. A számszerűsítéshez 4-6 egyedi AP-t időben összerendeztünk a dV/dt maximumuk alapján, majd az átlagukat használtuk fel az egyes paraméterek méréséhez.

3.6. Káliumáram mérések (2. projekt)

A dendritikus káliumáramok vizsgálatát outside-out patch preparátumokon végeztük. Ebben az esetben, hogy az egészséjtes mérési konfigurációt követően a pipettát óvatosan visszahúztuk, és a dendritről lefüződött egy membráncsík, melyet magával húzott a pipetta. Az így nyert membráncsíkon továbbra is az eredeti külső membránszín néz az extracelluláris tér felé és olyan körülmények között vizsgálható a membránban lévő csatornák működése, ami nagyon hasonlít az egészséjtes elvezetésekhez. Az outside-out patch lényegi tulajdonsága, hogy szinte tökéletes kontrollt biztosít a membránfeszültség felett, ami gyors áramok kinetikai vizsgálata esetén hatalmas előnynek számít. A mérésekhez használt voltage-clamp protokoll egy 40 ms hosszú, -120 mV-os lépéssel indult, hogy biztosítsuk a jelenlevő ioncsatornák maximális elérhetőségét. A csatornapopuláció feszültségfüggését -105 mV és +65 mV közötti feszültségtartományban vizsgáltuk változó értékű prepulzusok és +55 mV nagyságú teszt-pulzus segítségével. Az inaktiváció időbeli lefutásának vizsgálata viszonylag hosszú (300 ms) lépéseket igényelt. Bár itt nem használtunk farmakológiai eszközöket a káliumáram izolálásához, a teszt-pulzus +55 mV-os feszültségértékén vélhetőleg elhanyagolható a jelen levő nátrium- és kalciumcsatornák ionárama a minimális a hajtóerő miatt^[160-162]. A mért áramjelek passzív komponensét online levonással távolítottuk el, P/-4 protokoll segítségével. Az eljárás azon alapul, hogy az alkalmazni kívánt protokollal megegyező időbeli lefutású, de lényegesen kisebb amplitúdójú (jelen esetben negyedakkora) és azzal ellentétes polaritású protokoll segítségével rögzítjük az elvezetett struktúra passzív viselkedését. Az így nyert passzív, kapacitív jelet lineárisan skálázva (vagyis -4 szeresére növelve) kivonjuk a vizsgált áramválaszból, és a kivonás után maradó áramjel már csak az aktív áramkomponenseket tartalmazza^[163]. A módszer alkalmazhatóságának előfeltétele, hogy a lineáris komponens meghatározásához használt protokoll olyan feszültségtartományban mozogjon, ahol nem befolyásolja az aktív ioncsatornák nyitását vagy zárását.

Az inaktiválódó áram nagyságát a -45 mV-os prepulzus hatására inaktiválódott áramkomponens alapján számszerűsítettük.

Ugyanezt a voltage-clamp protokollt használtuk a dinamikus-clamp konduktancia modelljének építéséhez szükséges káliumáram mérésekben is (lásd 3.13 és 5.3 fejezetek), ahol farmakológiailag elkülönítettük a 4-AP érzékenységet mutató káliumáram-komponenst a nukleált-patch preparátumokon mért teljes káliumáramból. A nukleált-patch kísérletekben kiterjedt szomatikus membránfelszínre izoláltunk a szemcsesejtekből oly módon, hogy a betörést követően finoman odaszívtuk a sejtmagot a pipetta szájához, majd lassan visszahúztuk a pipettát úgy, hogy folyamatos negatív nyomás alkalmazásával végig a pipetta szájánál tartottuk a sejt magját. Ha megfelelő távolságra húztuk el a sejtmagot, akkor a magot körülölelő membránrész lefűződött a sejtmembrán többi részéről, gyakorlatilag egy nagyméretű outside-out patch-et formálva. Az aktiváció és inaktiváció időbeli lefutását az átlagolt áramjelek exponenciális illesztésével határoztuk meg. A konduktanciát úgy határoztuk meg, hogy -90 mV-os fordulási potenciállal rendelkező ohmikus káliumáramot feltételeztünk^[164].

3.7. Kalciumáram mérések (2. projekt)

A nukleált-patch preparátumon végzett izolált kalciumáram mérésekhez a már ismertetett módon leválasztottuk a sejtmagot és a ráfeszülő szomatikus membránfelszínre a sejt többi részéről. A mohaterminálison végzett izolált kalciumáram mérésekhez hasonlóan ebben az esetben is céziumalapú intracelluláris oldatot használtunk, de 1 mM-ra növeltük az oldat EGTA tartalmát, mivel az előzetes kísérletek szerint az izolált áramok időben stabilabbak voltak a nagyobb koncentrációjú EGTA jelenlétében. A nátrium és káliumáramok blokkolásához az elvezető oldat 1 mM TTX-et és 5 mM 4-AP-t is tartalmazott. Tekintettel arra, hogy inaktiválódó kalciumáramot vizsgáltunk, minden egyes protokoll egy 4 s hosszú alapvonalal indult, ami elegendő időt biztosított ahhoz, hogy a kalciumcsatornák elérhetősége stabilizálódjon. A kalciumcsatornák aktiválásához előzetesen elvezetett AP alakokat használtunk fel parancsfeszültségként. A kalciumáram modellek építéséhez négyszögimpulzussal kiváltott kalciumáramokat is mértünk. Ebben az esetben 3 ms hosszú, 0 mV-os négyszögjelet használtunk, ami -80 mV-os alapvonalról indult ki. Az inaktiváció időbeli lefutását vizsgáló kísérletekben 300 ms hosszú, +20 mV-os tesztimpulzust alkalmaztunk -120 mV-os alapvonal mellett. Az

erősen hiperpolarizált alapvonal lehetővé tette, hogy minden jelen levő kalciumcsatorna visszatérhessen az inaktivált állapotából. Az AP-t kísérő maximális csatornaaktivációt úgy vizsgáltuk meg, hogy az AP alakot formázó parancsfeszültséget módosítva változó hosszúságú (0,75-5 ms), de állandó feszültségértékű szakaszokat illesztettünk a felszálló szakasz csúcs közeli részére. Így a csatornákat aktiváló parancsfeszültségben csak a maximálisan depolarizált állapot hossza változott, a repolarizáció alakja nem. Ez megkönnyítette a kalciumáramok közvetlen összehasonlítását, mivel számottevő ionáram csak a repolarizáció alatt történt. Az egyedi méréseket 12-25 másodperces időközönként indítottuk el. Ebben az esetben a mintavételezés 50 vagy 80 kHz-en történt és a passzív jelek levonását utólag végeztük el, P/-4 módszer segítségével. Hosszútávon a kalciumáramok jelentős csökkenését figyeltük meg a kísérletekben, ezért csak a egészséjtes konfiguráció kialakítását követő első tizenkét perc adatait vettük figyelembe a kiértékelés során. Az AP alakkal kiváltott kalciumáramok számszerűsítéséhez egy 1 ms hosszú időablakot vettünk figyelembe, ami 0,35 ms-mal az AP csúcsa után kezdődött.

3.8. Az elvezetett sejtek azonosítása elektrofiziológiai és anatómiai tulajdonságaik alapján (1. projekt)

Minden elvezetett sejt esetén felvettem a sejtek növekvő erősségű, hosszantartó (500-1000 ms) négyszög áramimpulzusokra adott feszültségválasztát. A vizsgálati protokoll általában -100 pA nagyságú negatív áramlépéssel indult, és addig tartott, amíg az adott sejt küszöb feletti aktivitásmintázatát is regisztrálni tudtuk. A kis amplitúdójú áramlépések segítségével határoztuk meg a sejtek alapvető passzív tulajdonságait, vagyis a bemenő ellenállásukat és a membrán időállandóját. A küszöb feletti aktivitásmintázat (tüzelési mintázat) alapján meghatároztuk az egyedi akciós potenciálok jellemző paramétereit, mint félérték-szélesség, az utóhiperpolarizáció, és utódepolarizáció tulajdonságai. A legnagyobb depolarizáló áramlépésekkel kiváltott nagyfrekvenciás tüzelés alapján pedig eldönthető volt, hogy az adott sejt mutat-e frekvencia adaptációt (akkomodációt).

A szemcsesejtek tüzelési mintázatára az akkomodáló tüzelés jellemző, azaz a tüzelési frekvencia csökken a sejt fenntartott aktivitása esetén. Az egyedi akciós potenciálokat jellegzetes utódepolarizáció követi. Erősen tüskés dendritjeik a sejttestből kiindulva

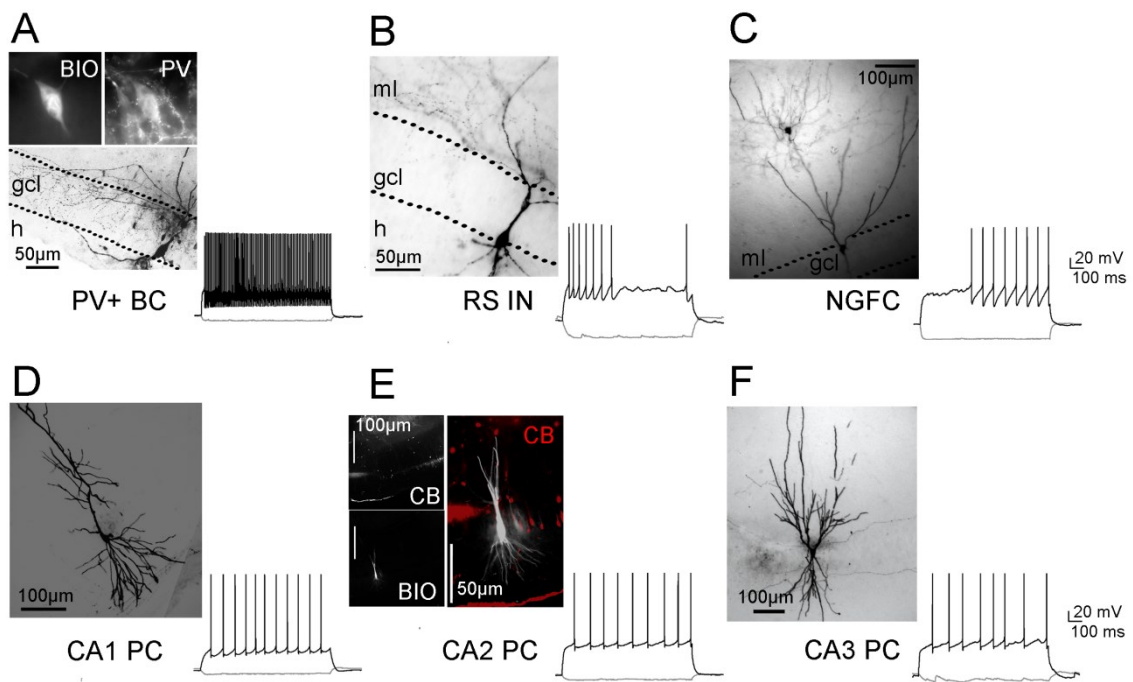
fokozatosan ágazódnak el a str. moleculare-ban, egy kúpra emlékeztető dendritfát hozva létre. Axonjuk a sejttest ellentétes pólusából indul ki a CA3 felé és nagy filopodiális nyúlványokat hordozó nagy mohaterminálisokat képeznek a hilus területén és a CA3 str. lucidumban. Tekintettel a felnőttkorban születő szemcsesejtek eltérő elektrofiziológiai tulajdonságaira, az értekezésben bemutatott kísérletek során az elvezetett szemcsesejtek egységes sejtpopulációt alkottak, amely az érett szemcsesejtek működését reprezentálja. Az éretlen felnőttkorban született szemcsesejtek elkerülésének érdekében olyan sejteket választottam ki a kísérlethez, ami a sejtrétegben közel helyezkedett el a str. moleculare felőli határhoz. Az éretlen sejtek elkülönítéséhez kihasználtuk azt a megfigyelést, hogy a fiatal sejtek bemenő ellenállása sokkal nagyobb, mint az érett sejteké^[70]. Kizártunk az analízisből minden olyan szemcsesejtet, amelynek a nyugalmi membránpotenciálon mért bemenő ellenállása nagyobb volt, mint 550 MΩ.

A szemcsesejtek mellett a CA régiók piramisesejtjein, és három DG GABAerg sejt típuson is vizsgáltuk a dendritikus mGluII receptorhatás jelenlétét. Az elvezetett sejtek azonosítása ezekben a kísérletekben is a sejt anatómiai és elektrofiziológiai tulajdonságain alapult.

A CA3 piramisesejtek egyedi akciós potenciáljain szintén megfigyelhető az utódepolarizáció. Emellett nagyon jellegzetes a négyszögimpulzusra adott potenciálválasz lassú, rámpaszerű felfutása az akciós potenciál küszöb közelében. A CA3 piramisesejtek apikális dendritje a sejttest közelében ágazik el, de az is előfordulhat, hogy már a sejttestből több apikális irányú fő dendrit indul ki (12F.Ábra). Dendritjeik tüskések, és a sejttesthez közeli régióban komplex tüskéket is hordoznak.

A CA1 piramisesejtek tüzelési mintázata akkomodáló, ahol hosszan tartó, lassú utóhiperpolarizáció követi az egyes AP-kat. Jellegzetes tulajdonságuk hogy a nagyobb hiperpolarizáló áramlépésekre adott feszültségválasz nem folyamatosan tart egy egyensúlyi állapotba, hanem egy átmeneti maximum elérését követően éri el a feszültségválasz az egyensúlyi állapotát („sag” jelenség). Dendritjeik tüskések, és tipikusan egyetlen fő apikális dendritjük fut a str. radiatumban, amiről számos kis átmérőjű dendrit ered (12D.Ábra).

A CA2 piramisisejtek azonosításához azt használtuk ki, hogy a moharostok, és a CA1 piramisisejtek egy része egyaránt tartalmazza a calbindin nevű kalciumkötő fehérjét, a CA2 piramisisejtekben viszont nincs jelen ez a fehérje. A calbindin fénymikroszkópos jelölése tehát egyaránt kirajzolja a CA3 régió végét (ahol a moharost pálya elvékonyodik) illetve a CA1 kezdőpontját (ahol a calbindint tartalmazó sejtek rétege kezdődik) ezáltal behatárolja a CA2 régiót (12.E Ábra). Azokat a sejteket tekintettük CA2 piramisisejteknek, melyek a calbindin festés alapján a CA2 területén helyezkedtek el, dendritjeik tüskések voltak, de nem rendelkeznek a közvetlen szemcsesejt bemenetre jellemző komplex tüskékkel.



12.Ábra. A szemcsesejtek mellett vizsgált hippocampalis sejtípusok anatómiai és elektrofiziológiai jellegzetességei

A megvizsgált sejtípusok alaktani és élettani jellegzetességei. Jobbra mindig az adott sejt tüzelési mintázata látható. (ml-molekuláris réteg, gcl-szemcsesejt réteg, h-hilus). A, Egy gyors tüzelésű kosáresejt (PV+BC) parvalbumin pozitivitása, és jellegzetes axonfelhője a szemcsesejt rétegben. B, Szabályosan tüzelő kosáresejt (RSIN) sejtteste és a molekuláris réteg belső részére korlátozó axonfája. C, A molekuláris réteg külső részén elhelyezkedő neurogliaform sejt (NGFC) és a vele egyidejűleg elvezetett szemcsesejt képe. D, CA1 piramisisejt (CA1 PC) dendritfája. E, CA2 piramisisejt (CA2 PC) sejttestének helyzete a calbindin (CB) festésen alapuló régióhatárokon belül. F, CA3 piramisisejt (CA3 PC) dendritfája.

A GABAerg sejtípusok közül a neurogliaform sejteknek a tüzelési mintázatát a késleltetett tüzelés jellemezi (12.C Ábra). Az akciós potenciálokat nagy amplitúdójú hosszan tartó utódepolarizáció követte. Axonjuk sűrű felhőt képezett a str. moleculare-ban, ami időnként átnyúlt a CA1 vagy a subiculum str. lacunosum-moleculare rétegébe is.

A gyorstüzelésű kosársejtek parvalbumint tartalmaztak (12.A Ábra). Tüzelési mintázatukat gyors, tipikusan 0,4 ms-nál gyorsabb akciós potenciál félérték-szélesség, illetve az akkomodáció hiánya jellemezte. Multipoláris vagy piramis alakú sejttestük a szemcsesejt rétegben vagy annak közvetlen közelében helyezkedett el. Axonjuk sűrűn behálózta a szemcsesejt réteget.

A harmadik vizsgált GABAerg sejtípus, a szabályosan tüzelő kosársejtek axonja a szemcsesejt réteget és a str. moleculare belső részét idegezte be (12.B Ábra). A tüzelési mintázatuk jelentős akkomodációt mutatott.

Az utólagos anatómiai feldolgozáshoz elvezetés közben az intracelluláris oldathoz adott 8 mM biocitinnel feltöltöttük a sejteket, majd az elvezetés után egy éjszakán át 4 °C-on fixáltuk a szeleteket 2 % paraformaldehidet és 0,1 % pikrinsavat tartalmazó 0,1 mólos foszfátpufferben. A fixálást követően 60 µm vastagságú metszeteket készítettünk a szeletekből vibratom segítségével (VT1000 S; Leica). Ha csak az adott sejt alaktani sajátosságaira voltunk kíváncsiak, akkor peroxidáz alapú reakció segítségével (DAB reakció) tettük láthatóvá a sejteket. Ezt a módszert alkalmaztuk a CA3 és CA1 piramissejtek, a szemcsesejtek és a neurogliaform sejtek azonosítására, vagyis azokban az esetekben, amikor a sejttest alakja és elhelyezkedése, a dendrittüskék jelenléte illetve az axon- és a dendritfa elhelyezkedése elégséges a sejtípus meghatározásához. A DAB reakció első lépéseként 1 %-os H₂O₂ oldattal gátoltuk a nem specifikus, endogén peroxidáz aktivitást. A reakció specificitását biztosító avidin-biotin-peroxidáz (ABC) jelölést úgy végeztük, hogy a szeleteket egy órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk az ABC reagenssel (1:500, Vectastain ABC Elite kit; Vector Laboratories). A metszeteket a pufferoldathoz adott 0,1 %-os Triton-X 100 segítségével nagyobb molekulák számára is átjárhatóvá tettük, így biztosítva, hogy a komplex a metszet mélyebb rétegeibe is bejusson. A peroxidáz jelölés során az elbomlott szubsztrát (0,2 %-os H₂O₂) hatására oxidálódó kromogén anyag (diamino-benzidin és nikkell-klorid) sötét, nem oldódó

csapadékot képezve teszi láthatóvá a sejteket. A metszeteket ezt követően felszálló alkoholsoron dehidratáltuk, majd tárgylemezre kihelyezve műgyantába ágyasztuk (DPX slide mounting medium; Sigma).

A CA2 piramissejtek és a kosársejtek azonosításához neurokémiai markereken alapuló fluoreszcens immuncitokémiai jelölést végeztünk. Immuncitokémiai feldolgozás során a parvalbumin (PV28; Swant, nyúlban termelt poliklonális antitest 1:1000-ben hígítva) és a calbindin (anti Calbindin D-28k, 300; Swant, monoklonális egér antitest, 1:1000-ben hígítva) ellen termeltetett elsődleges antitesteket egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk a metszeteken TBS pufferben. A puffer oldat 2 % normál kecskeszérumot is tartalmazott a nem specifikus kötőhelyek blokkolásához, illetve 0,5% Triton-X 100-at a sejtekmembránok permeabilizálásához. Többszöri mosást követően az immunreakciókhoz fluoreszcens markerrel (Alexa Fluor 488 vagy Alexa Fluor 594, Invitrogen) konjugált, nyúl vagy egér ellen kecskében termeltetett másodlagos antitesteket használtunk, míg az elvezetés alatt a sejtekbe töltött biocitint sztreptavidinhez kapcsolt Alexa Fluor 350 (Invitrogen) segítségével tettük láthatóvá. Végül újabb mosási lépéseket követően a tárgylemezre kihelyezett szeleteket olyan médiummal fedtük le, mely meggátolta a fluoreszcens jel elhalványulását (Vectashield; Vector Laboratories) és a minták kiszáradását. Az immuncitokémiai reakciókat epifluoreszcens feltétellel ellátott mikroszkóp segítségével értékeltük ki (DM2500; Leica), majd ezt követően a sejteket peroxidáz reakció segítségével is vizualizáltuk. Ezeket a munkafolyamatokat a kutatócsoport technikusai, Hegedüs Dóra, Juszél Andrea és Kókay Dóra végezték el.

3.9. A dendritikus mGluII receptorhatás vizsgálatára használt számítógépes modell (1. projekt)

A modellezést NEURON 7.2 szimulációs környezetben végeztük, részletesen rekonstruált passzív szemcsesejt modellek segítségével, melyek elérhetőek a ModelDb adatbázisában (<http://senselab.med.yale.edu/ModelDb>, #95960,^[46]). Az adatbázisban található sejtek passzív paraméterei szobahőmérsékleten mért adatok illesztésén alapultak, ezért ezeket a paramétereket hőmérsékleti együtthatók (úgynevezett Q₁₀ értékek) segítségével a saját méréseinknek jobban megfelelő, közel fiziológiás

hőmérsékletéhez (34 °C) igazítottam. Meg kell azonban jegyezni, hogy a használt Q_{10} értékeket kérgi piramissejtekre határozták meg^[165] és az alkalmazhatóságuk szemcsesejtek esetében még nem bizonyított. A passzív konduktancia fordulási potenciálját -80 mV-ra állítottam be. Mivel ez az egyetlen konduktancia határozta meg a sejtek nyugalmi membránpotenciálját, ezért ez utóbbi érték közel állt az élő állatokból illetve szeletpreparátumokból mérhető valós nyugalmi membránpotenciál értékhez (-75 és -85 mV között). A sejteket a d_{λ} szabálynak megfelelően szegmentáltam (0,1 kHz-alapján), a ténylegesen jelen levő, szinapszist hordozó dendrittüskék kivételével, amiket fixen 5 szegmentumra osztottam fel. A szimulációkat 40 kHz-es időbeli feloldással futtattam. A tér és időbeli felbontás tízszeresére (időben), illetve háromszorosára (térben) növelésével teszteltem a szimulációk állandóságát, de nem tapasztaltam lényegi hatást a számszerű eredményekben. A szinaptikus-, illetve MNI-glutamát fotolízisével kiváltott AMPA-receptor mediálta áramok szimulálásához pontszerű mechanizmust alkalmaztam. A konduktancia változás időbeli lefutását két exponenciális függvény összege határozta meg. A maximális konduktancia nagyságát 1 nS-re állítottuk, 0 mV-os fordulási potenciállal. A szinaptikus AMPA receptorok által közvetített ionáramok modellezése esetén 0,27 ms illetve 2,75 ms volt a felfutás és a lecsengés időállandója. A szimulált NMDA receptor áramok esetén 2 ms illetve 26 ms volt a felfutás és a lecsengés időállandója. A csatornamodellbe épített magnézium blokk feszültségfüggése^[166] 0,2 mM külső magnézium koncentrációt feltételezett. Az MNI-glutamát fotolízisével kiváltott események modellezéséhez használt kinetikai paramétereket úgy állítottuk be, hogy visszakapjuk a kísérletes úton megfigyelt membránpotenciál változások alakját (10-90 %-os felfutási idő: 0,388 ms, lecsengés időállandója 3,95 ms). A szinaptikus mechanizmusokat egy olyan dendrittüskén helyeztük el, melynek paramétereit a kívánt nyakellenállás elérése érdekében kétféle módon állíthattuk be. A túskefej hossza és átmérője mindkét esetben 0,5 μm volt. Az egyik esetben (kis nyakellenállású modell esetén) a dendrittüske passzív paramétereit megegyeztek a szülő sejtben használt értékekkel, és a túskenyák hossza 0,75 volt, 0,18 μm -es átmérő mellett. A másik, nagy nyakellenállású konfigurációban a dendrittüske passzív paramétereit (C_m : 1 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$, R_m : 20 $\text{k}\Omega \cdot \text{cm}^2$, R_i : 150 $\Omega \cdot \text{cm}$) és anatómiai tulajdonságait (hossz: 1,9 μm , átmérő 0,07 μm) úgy állítottuk be, hogy a CA 1 piramissejteken kísérletesen meghatározott^[167] nagy, 500 $\text{M}\Omega$ -os nyakellenállást kapjuk.

Az mGluR2-aktivált konduktancia modellezéséhez szintén pontszerű mechanizmust használtunk. A modell-konduktancia fordulási potenciálját -80 mV-ra állítottuk be. A modell reprodukálta a feszültségfüggés kísérletesen meghatározott jellegzetességeit, vagyis a konduktancia határozott (20%-os) csökkenést mutatott már -55 mV-os membránpotenciál esetén is, és egyáltalán nem volt aktív a pozitív membránpotenciál tartományban. A farmakológiai receptor aktiválás hatását vizsgáló szimulációkban minden dendritág megfelelő pozíciójában elhelyeztünk egy-egy ilyen pontszerű gátló mechanizmust, melyeknek a maximális konduktanciáját úgy állítottuk be, hogy gátlás jelenléte a farmakológiai kísérleteinkben mért változáshoz hasonló mértékű, 28 %-os szomatikus bemenő ellenállás csökkenést eredményezzen. 1 nS nagyságú maximális konduktanciát alkalmaztunk azokban az esetekben, ahol csak egyetlen dendriten helyeztük el a gátló mechanizmust.

3.10. Kalciumáramok modellezése (2. projekt)

A dendritikus bAP-aktivált ionáramok viselkedésének megértéséhez egy kompartmentes szimulációkat futtattunk NEURON 7.2 környezetben^[168]. A közvetlen kalciumáram mérések alapján abból indultunk ki, hogy kétféle - egy inaktiválódó és egy nem inaktiválódó - kalciumcsatorna kombinációjával le lehet írni a szemcsejtekben mért makroszkopikus ionáram viselkedését. Az irodalomban elérhető aktivációs tulajdonságokat felhasználva^[162] két standard Hodgkin-Huxley modellt építettünk, amelyek közül az inaktivációt nem mutató áram (I_{Ca}) örökölte az eredeti közlemény N-típusú áramának aktivációs profilját, míg az inaktiválódó modell (I_{Ca}) viselkedése az R-típusú áramán alapult. Az I_{Ca} modell aktivációját és inaktivációját a következő egyenletek segítségével határoztuk meg:

$$P_{I_{Ca}}(t, V) = P_{max_{I_{Ca}}} m_{I_{Ca}}(t, V)^2 h_{I_{Ca}}(t, V) \quad (8)$$

$$\frac{dm_{I_{Ca}}}{dt} = \alpha_{m_{I_{Ca}}}(V)(1 - m_{I_{Ca}}) - \beta_{m_{I_{Ca}}}(V)m_{I_{Ca}} \quad (9)$$

$$\alpha_{m_{I_{Ca}}}(V) = \frac{4,9}{1 + \exp(-0,04(V - 42,5))} \quad (10)$$

$$\beta_{m_{I_{Ca}}}(V) = \frac{1,9}{1 + \exp(0,0775(V + 34,5))} \quad (11)$$

$$\frac{dh_{I_{Ca}}}{dt} = \alpha_{h_{I_{Ca}}}(V)(1 - h_{I_{Ca}}) - \beta_{h_{I_{Ca}}}(V)h_{I_{Ca}} \quad (12)$$

$$a_{h_{I_{Ca}}}(V) = 0,0003 \exp(-0,03(V + 10)) \quad (13)$$

$$\beta_{h_{I_{Ca}}}(V) = 0,003 \exp(0,06(V + 60)) \quad (14)$$

Az $N_{I_{Ca}}$ modell viselkedést az alábbi egyenletek írják le:

$$P_{N_{I_{Ca}}}(t, V) = P_{max_{N_{I_{Ca}}}} m_{N_{I_{Ca}}}(t, V)^2 \quad (15)$$

$$\frac{dm_{N_{I_{Ca}}}}{dt} = \alpha_{m_{N_{I_{Ca}}}}(V)(1 - m_{N_{I_{Ca}}}) - \beta_{m_{N_{I_{Ca}}}}(V)m_{N_{I_{Ca}}} \quad (16)$$

$$a_{m_{N_{I_{Ca}}}}(V) = \frac{0,08*(V-2)}{1 - \exp(-(0,08*(V-2)))} \quad (17)$$

$$\beta_{m_{N_{I_{Ca}}}}(V) = \frac{13}{1 + \exp(0,095(V + 39,77))} \quad (18)$$

Magát az ionáramot a következő összefüggés alapján számoltuk ki:

$$I_{Ca}(t, V) = P_{Ca}(t, V) GHK_{Ca}(V)A \quad (19)$$

Ahol P_{Ca} a membrán permeabilitása a calcium ionra nézve, A az áram amplitúdójának szorzófaktor, míg a GHK_{Ca} egy módosított GHK összefüggés^[161,169], mely leírja a kalciumáram erősen rektifikáló feszültségfüggését a következő formalizmus szerint:

$$GHK_{Ca}(V) = V \frac{(0,3933 - \exp(\frac{-V}{70,36}))}{(1 - \exp(\frac{V}{70,36}))} \quad (20)$$

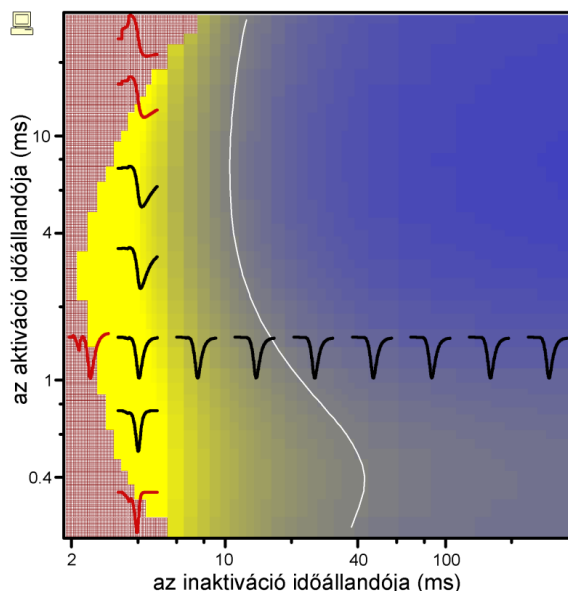
ahol V a modellezett membránpotenciál. A két modell aktivációjának lineáris kombinációja határozza meg az összesített permeabilitás értékét.

$$P_{Ca}(t, V) = P_{I_{Ca}}(t, V) + P_{N_{I_{Ca}}}(t, V) \quad (21)$$

A P_{Ca} mindig 0 és 1 közötti értéket tudott felvenni a szimulációk során, amit úgy biztosítottunk, hogy a $Pmax_{I_{Ca}}$ and a $Pmax_{N_{I_{Ca}}}$ paraméterek összege mindig 1 volt. A csatornaműködés feszültségfüggő időállandója a következő módon számítható:

$$\tau(V) = \frac{1}{\alpha(V)+\beta(V)} \quad (22)$$

Mivel nem áll rendelkezésünkre irodalmi adat a szemcsesejt R-típusú csatornáinak inaktivációs profiljáról, így az inaktiváció paramétereit úgy állítottuk be, hogy a viselkedése hasonlítson a Jaffe és munkatársai^[170] által leírt inaktivációra. A jobb időbeli felbontás eléréséhez a templátként szolgáló feszültségjeleket lineárisan interpoláltuk, így módon lehetőségessé vált a 0,5 - 2,5 μ s-os integrációs lépések használata is. A modelláramokat pontszerű mechanizmusként határoztuk meg, ahol az áram amplitúdóját egy szorzófaktor segítségével tudtuk változtatni (lásd 19. egyenlet). A következő szorzófaktorokat használtuk ahhoz, hogy a modelláram és a mért kalciumáramok közvetlenül összehasonlíthatóak legyenek (28.Ábra): -1,3295 (szomatikus AP, $N_{I_{Ca}}$ áram), -7,2618 (szomatikus AP, $I_{I_{Ca}}$ áram), -1,15504 (szomatikus AP, kevert $N_{I_{Ca}}$: $I_{I_{Ca}}$ áram), -3,6654 (dendritikus AP, $N_{I_{Ca}}$ áram), -2,7023 (dendritikus AP, $I_{I_{Ca}}$ áram), -1,7164 (dendritikus AP, kevert $N_{I_{Ca}}$: $I_{I_{Ca}}$ áram), -1,5895 (négyyszögjel, $N_{I_{Ca}}$ áram), -6,5892 (négyyszögjel, $I_{I_{Ca}}$ áram) and -1,2775 (négyyszögjel, kevert $N_{I_{Ca}}$: $I_{I_{Ca}}$ áram). A 30. Ábrán bemutatott modellezés során a $N_{I_{Ca}}$ modellt is felruháztuk az $I_{I_{Ca}}$ áram inaktivációs mechanizmusával. Ebben a szimulációban a csatornaműködés gyorsítását és lassítását úgy értük el, hogy módosítható faktorokkal szoroztuk be a sebességi állandókat leíró összefüggéseket. A csatornaműködés sebességét a 0 mV-on mutatott időállandók alapján számszerűsítettük. A sebességi állandók módosítása sok esetben olyan áramformákat eredményezett, melyek alapvetően eltértek az ismert kalciumáramok lefutásától (13.Ábra).



13.Ábra. A kalciumáramként nem értelmezhető modelláramok alakja, illetve a helyzetük a paramétertérben

A 30.A Ábrán bemutatott grafikon fölé helyezett normalizált I_{I_Ca} áramformák. Így együtt bemutatva látható, hogy a paramétertér különböző pontjain milyen alakúak a modell áramok. Feketében azok az áramok láthatók, amiket felhasználtunk az analízis során, míg a vörösben megjelenített áramokat az alakjuk miatt kizártuk a modellezés eredményéből.

Emiatt automatikusan elvetettünk minden olyan esetet, ami már az AP felfutása során is jelentős ionáramot mutatott (a csúcs előtti ionáram nagyobb volt, mint a repolarizáció alatt mért áram harmada), vagy az ionáram csúcsa nem érte el az alapvonalnál mért áramerősség ötszörösét.

3.11. Kalciumjelek mérése konfokális mikroszkóp segítségével (2. projekt)

A bAP-k terjedéséhez köthető kalciumjelek kísérletes méréséhez egy alacsony affinitású fluoreszcens kalcium indikátort, Fluo-5F festéket használtunk ($183 \mu\text{M}$ K_D , $2,3 \mu\text{M}$) a morfológiai marker (Alexa Fluor 594) mellett. Ezeket a festékeket az intracelluláris oldatban oldottuk fel. A méréshez először stabil szomatikus patch-clamp elvezetést alakítottunk ki a szemcsesejten, majd vártunk fél órát a festékek egyensúlyi koncentrációjának eléréséhez. Az inkubációs idő letelte után kis intenzitású megvilágítás mellett kiválasztottuk a mérésre alkalmas dendritikus pontokat az Alexa 594 jel alapján. A pontok kiválasztásakor több szempontot is figyelembe vettünk. Először is, az optimális dendritszakasz $20\text{-}50 \mu\text{m}$ mélyen volt, nem túl közel a

felszínhez, de a konfokális mérőrendszer által jól mérhető mélységben. Emellett arra is figyeltünk, hogy elkerüljük azokat a dendriteket, melyek láthatólag sérültek voltak vagy elvágódtak a szeletkészítés során.

A kísérlet elektrofiziológiai része a szomato-dendritikus elvezetéseknel ismertett protokollal megegyező volt, vagyis a sejttestbe injektált nagy amplitúdójú, rövid áramimpulzusok segítségével (2 ms/1,6 nA) felváltva váltottunk ki AP-kat depolarizált ($-64,0 \pm 0,3$ mV) vagy hiperpolarizált ($-77,6 \pm 0,3$ mV) kiindulási membránpotenciálról. Ebben az esetben is a szomatikus tartóáram erősségét módosítottuk a membránpotenciál értékének beállításához. Az AP-val időben összerendezve line-scan módban mértük a kalcium beáramláshoz kötődő fluoreszcens intenzitásváltozást a kiválasztott dendritikus ponton. A használt beállítások mellett (10,24 μ m hosszú vonalra fektetett 16 pixel) a leképezés sebessége 610 vonal/s volt. A kalciumfesték jele mellett mindig regisztráltuk az Alexa 594 jel intenzitását is, amit arra használtunk, hogy kiszűrjük és korigáljuk a dendrit esetleges elmozdulását. Megszakítottuk azokat a kísérleteket, amikben a kalciumjel alapvonala, vagy az intenzitásváltozás lecsengésének időállandója több mint 30%-ot változott a kiindulási értékéhez képest. Mivel a nikkel kötődni tud a kalcium indikátorhoz, alacsonyabb nikkelkoncentrációt alkalmaztunk (50 μ M), mint a kalciumáram mérések során (500 μ M). Ez a koncentráció is elegendő ahhoz, hogy gátolja a jelenlevő T és R-típusú kalciumcsatornák jelentős részét^[98,171].

A kalciumjel mérések kiértékelésekor első lépéseként a morfológiai jel alapján meghatároztuk azokat a pixeleket, melyek a dendritből eredő fluoreszcens jelet tartalmaztak (2-6 pixel). Ezt követte a háttér levonása, majd átlagot készítettünk. A számszerűsítéséhez a jel integrálját számoltuk ki egy 15 ms hosszú időablakon belül az AP-t követően. Átlagok esetén a kalciumjeleket további módosítás nélkül mutattuk be, míg az egyedi jeleknél egy 5:1-es futóátlagolást alkalmaztunk. A kísérlet végeztével részletes 3D képet készítettünk a sejtről, ami alapján később meg tudtuk határozni a dendritikus mérés pontos távolságát a sejttesttől.

3.12. Kalciumjelek mérése spinning-disc konfokális mikroszkóp segítségével (2. projekt)

A hagyományos konfokális pásztázó mikroszkópok egyik legnagyobb hátránya, hogy a lézernyaláb mozgatása és a pontról-pontra történő leképezés időigényes folyamat. Emiatt nagy látóterek leképezése csak olyan időskálán lehetséges, mely már nem alkalmas gyors biológiai változások nyomon követésére. Fel lehet gyorsítani a képalkotást, de ez mindenképpen az egyidejűleg leképezett terület jelentős csökkenésével jár. Például, a konfokális rendszerünkön úgy értük el a kalciumjelek mérését lehetővé tevő időbeli feloldást, hogy egyetlen vonal mentén pásztáztunk. A minta számos pontjának gyors, majdnem egyidejű leképezésével a spinning-disc mikroszkópia pontosan ezt a hátrányt küszöböli ki, és lehetővé teszi, hogy a kalciumjelek méréséhez szükséges sebességgel leképezzük a dendritfa jelentős részét. Az ebből adódó előnyök miatt a kísérletek egy részét spinning-disc rendszeren végeztük el (Andor iQ2 szoftver vezérelt Yokogawa CSU-X1 konfokális egységgel és Andor iXon 860 EMCCD kamerával felszerelt Andor Revolution XDv rendszer). A kísérlet menete és a használt festék koncentrációk megegyeztek a hagyományos konfokális mérésnél leírtakkal, mert így tudtuk biztosítani a kétféle mérés összehasonlíthatóságát. Ebben a rendszerben sajnos nem lehetséges többféle fluoreszcens festék egyidejű detektálása, ezért először a kalciumszint változását tükröző fluoreszcens jelet vettük fel (488 nm hullámhosszúságú gerjesztő lézer, 125-130 μW teljesítménnyel, másodpercenként 93,75 kép) majd közvetlenül utána a hozzá tartozó morfológiai információt rögzítettük (561 nm-es gerjesztés, 32-58 μW teljesítménnyel, másodpercenként 20 kép). A mért adatokat úgy számszerűsítettük, hogy a kalciumjel maximális intenzitásváltozását (ΔG) normalizáltuk a morfológiai jel erősségére (R). A spinning disc technikán alapuló méréseket témavezetőm, Szabadics János végezte.

3.13. Kételektrodás dinamikus-clamp kísérletek (2. projekt)

A dinamikus-clamp kísérletek lelke az StdpC2012 nevű szoftver (szabadon letölthető a <http://sourceforge.net/projects/stdpc> oldalról^[172]), ami a membránpotenciál ismeretében jó időbeli feloldással kiszámítja az általunk implementált konduktanciából eredő pillanatnyi áramerősséget. A program NiDAQ MIO-16E-4 (National Instruments Inc.) analóg/digitális átalakítón keresztül kommunikált az erősítővel. Azért volt szükség

a kételektrodás elrendezésre, hogy csökkenteni tudjuk a gyors, de intenzív áraminjekcióval járó esetleges feszültségjel torzulást. Az egyik elektródát csak a feszültség követésére használtuk. Ez a pipetta adta a dinamikus-clamp program bemeneti jelét. A konduktanciáknak megfelelően kiszámított áramokat aztán a másik elektróda segítségével injektáltuk vissza a sejtbe olyan gyorsasággal, hogy azok a leggyorsabb idegi jelek lefutásába is képesek beavatkozni. A repolarizáció módosítására szánt konduktancia egy inaktiválódó A-típusú káliumcsatorna jellegzetességeit mutatta. A mesterséges konduktancia feszültségfüggése és kinetikai profilja saját káliumáram méréseinken alapult, amit egy Hodgkin-Huxley típusú mechanizmus formájában határoztunk meg az StdpC2012 program számára (14.Ábra). A mechanizmus viselkedését a következő egyenletek segítségével adtuk meg:

$$\frac{dm}{dt} = \frac{m_{\infty}(V)-m}{\tau_m} \quad (23)$$

$$\frac{dh}{dt} = \frac{h_{\infty}(V)-h}{\tau_h} \quad (24)$$

Ahol m_{∞} és h_{∞} az aktivációs és az inaktivációs kapu egyensúlyi változói, míg τ_m és τ_h időállandók melyek feszültségfüggését az alábbi egyenletek írják le:

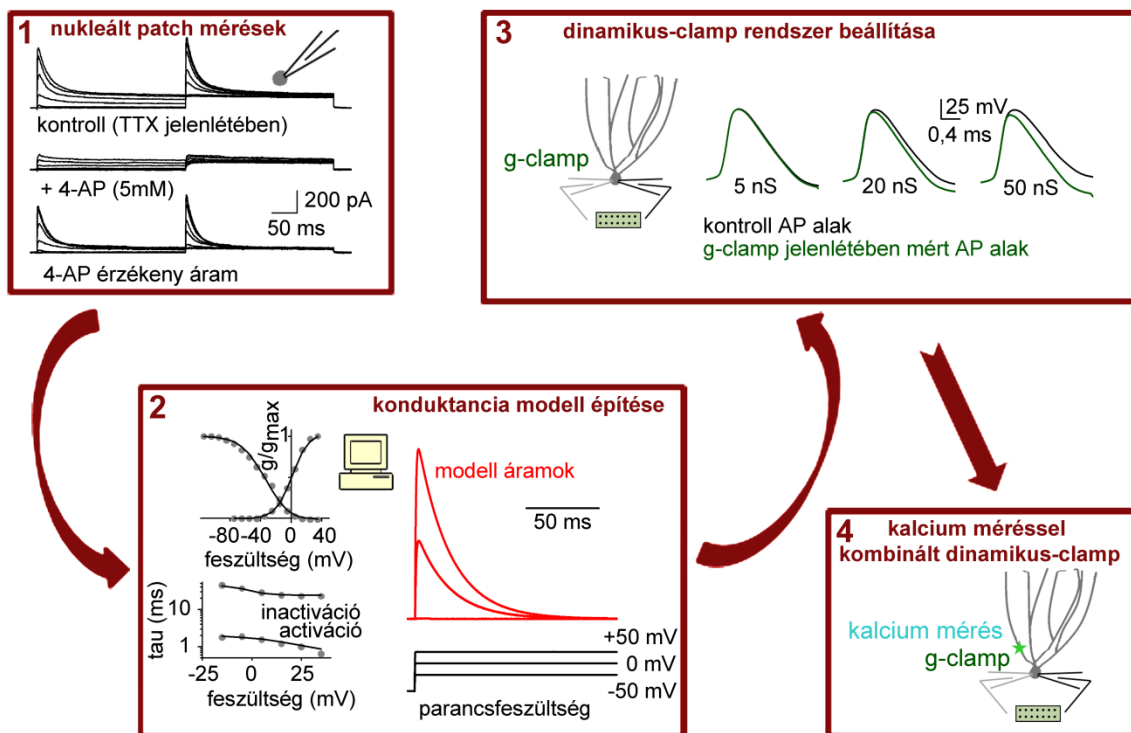
$$m_{\infty}(V) = \frac{1}{1+\exp(\frac{V-1,667}{-10,54})} \quad (25)$$

$$h_{\infty}(V) = \frac{1}{1+\exp(\frac{V+34,88}{15,99})} \quad (26)$$

$$\tau_m(V) = 1,8 - \frac{1,35}{1+\exp(\frac{V-17,74}{-10,7045})} \quad (27)$$

$$\tau_h(V) = 45 - \frac{21}{1+\exp(\frac{V+3,1}{-5,62})} \quad (28)$$

Csak ezt az egyetlen konduktanciát használva a rendszer megközelítőleg 12 μ s-os ciklusidővel működött, ami elégséges volt az AP alak érdemi befolyásolásához.



14.Ábra. A dendritikus kalciumjel mérésekkel ötvözött dinamikus-clamp kísérlet folyamatábrája

1. és 2. szakasz együtt: A dinamikus-clamp modell konduktanciájának felépítése. 1. szakasz: A modell konduktancia számára mintaként szolgáló izolált inaktiválódó kálium konduktancia feszültségfüggő viselkedésének meghatározása nukleált-patch kísérletek segítségével. 2. szakasz: A valós tulajdonságoknak megfelelő modell konduktancia építése. 3. szakasz: A dinamikus-clamp rendszer beállítása. A példaképp bemutatott kísérletben az AP alak változását teszteltük különféle nagyságú mesterséges konduktancia (g-clamp) jelenlétében. 4. szakasz: A dendritikus kalcium jelek mérésén keresztül vizsgáltuk az optimális nagyságú mesterséges konduktancia (4-8 nS) használatával módosított AP repolarizáció hatását.

A kontrollként használt passzív modellt is Hodgkin-Huxley mechanizmusként határoztuk meg. Erre azért volt szükség, mert a szoftveralapú dinamikus-clamp rendszerek ciklusideje nem egy rögzített érték, hanem tág tartományban változhat a modellezett mechanizmusok összetettségétől függően. Nagyobb számítási kapacitást igénylő esetekben hosszabb ciklusidőre számíthatunk, míg az ugyanúgy meghatározott mechanizmus összevethető ciklusidőket eredményez. A konduktanciát úgy alakítottuk passzívvá, hogy az aktivációs kinetikáját pillanatszerűvé alakítottuk, míg az inaktiváció sebességét végtelenül lassúra (10^9 ms) állítottuk be. A mesterséges konduktanciák fordulási potenciálját -70 mV-ra állítottuk, hogy minimalizáljuk az áramerősséget a nyugalmi membránpotenciál közelében. A dinamikus-clamp kísérletekben felváltva tüzeltettük a sejtet, hol a mesterséges konduktanciával hol pedig a nélkül. Ezzel

egyidejűleg a már ismertett hagyományos konfokális rendszer segítségével mértük a bAP kalciumjeleit a sejttesthez közeli dendritekben.

3.14. Lokális glutamát felszabadítás a konfokális mérőrendszer segítségével (1. és 2. projekt)

MNI-glutamát fénybontásán alapuló technikát használtunk azokban a kísérletekben, ahol a szinaptikus működésre hasonlító potenciálváltozásokat szerettünk volna kiváltani. Ehhez MNI-glutamátot használtunk, amiben a glutamáthoz fényérzékeny kötésen keresztül egy másik kémiai csoport is kapcsolódik. A csoport miatt az MNI-glutamát nem képes a glutamátreceptorokhoz kötni, vagyis ebből a szempontból inaktív vegyületnek tekinthető. UV megvilágítás hatására azonban a fényérzékeny kötés felbomlik, és a glutamát szabadon hozzáférhető lesz a receptorok számára. Ezzel a technikai megközelítéssel a glutamát felszabadulás tér- és időbeli profilját a bontáshoz használt fény tulajdonságai határozzák meg így elsősorban a különféle konfokális rendszerek optimálisak a jól kontrollált glutamát felszabadításhoz. Nikon C1Plus konfokális rendszert használtunk a kísérletekhez, melyekben Alexa Fluor 594 segítségével láthatóvá tettük az elvezetett szemcsesejt dendritfáját. A morfológiai ismeretek alapján aztán kiválasztottuk kísérlet számára optimális dendritszakaszokat a kalciumjelek mérésénél bemutatott kritériumok alapján. A használt UV fény nagymértékű elnyelődése miatt ebben a kísérletben is nagyon fontos, hogy a vizsgált dendrit szakasz ne legyen 20-50 μm -nél mélyebben, és ne mutasson morfológiai elváltozást. Bár a 405 nm-es lézerforrás távol áll az MNI vegyületek legoptimálisabb bontási hullámhosszától (350 nm,^[173]), a jobb áthatoló képessége miatt konfokális rendszerekben mégis nagyobb hatásfokot mutat a rövidebb hullámhosszú fényhez képest [174].

Az mGluR2 aktiváció hatását célzó kísérletekben egy 2,5 μm^2 nagyságú területre irányítottuk a lézert a 289 μs hosszú megvilágítás alatt. A lézer intenzitását (60-175 μW az objektív csúcán mérve) úgy állítottuk be, hogy a kiváltott potenciálválaszok (uEPSP-k) nagysága ($2,1 \pm 0,1$ mV) néhány (3-4) szinapszis egyidejű aktivitásának megfelelő tartományban maradjon (az egységnyi szinaptikus válasz 0,61 mV-os amplitúdóját véve alapul^[58]). Az MNI-glutamátot nagy koncentrációban (14 mM), helyileg juttattuk a dendrit közelébe egy patch pipettán keresztül. Mivel az előzetes

kísérletek azt mutatták, hogy a glutamát felszabadítás sok esetben egy nehezen stabilizálható, bizonytalan komponens megjelenéséhez vezetett, melyet NMDA receptorok közvetítettek, ezért a kísérletekben D-APV (20 μ M) segítségével blokkoltuk az NMDA receptorok aktivitását. Az így kiváltott válaszok hosszú távon is stabilnak bizonyultak. A kontrol periódusban és a vizsgált receptoragonisták (DCG IV vagy SKF97541) jelenlétében is legalább 20-20 egyedi esemény átlagát hasonlítottuk össze.

A szemcsesejtek bemeneti szinaptikus plaszticitásának vizsgálatához az MNI-glutamátot nem helyileg alkalmaztuk, hanem kisebb koncentrációban (1 mM) folyamatosan keringettük az elvezető oldatban azért, hogy a koncentrációja a hosszan tartó kísérletek alatt is állandó maradjon. A glutamát felszabadításhoz 740 μ s hosszú impulzusokból álló sorozatot alkalmaztunk (1 kHz, 2-7 impulzus), egy kis (<2 μ m) dendritszakasz mentén. Méréseink szerint az effektív glutamát felszabadulás x irányban 5 μ m-es, z-tengely mentén pedig 20 μ m-es térrészt érintett.

3.15. A szemcsesejt bemeneti szinaptikus plaszticitásának vizsgálata (2. projekt)

A plaszticitási folyamatok analóg modulációját vizsgálva szintén az MNI-glutamát fénybontást hívtuk segítségül. Azért ezt a módszert választottuk, mert az előnyös tér- és időbeli feloldás mellett így sikerült kiküszöbölni a lehetséges preszinaptikus mechanizmusokat is a szinaptikus receptorok aktiválásakor. Először feltöltöttük a szemcsesejtet a fluoreszcens morfológiai jelölőanyaggal (Alexa Fluor 594), majd ezt követően kiválasztottuk a kísérlethez optimális dendritszakaszt a már tárgyalt szempontok alapján. Mivel tudtuk, hogy a kalcium jelekben kódolt analóg információ jellege nem egységes a dendrit mentén, ezért igyekeztünk úgy megválasztani a stimuláció helyét, hogy az egy szűk távolságtartományba essen (150 μ m és 200 μ m között, átlagosan $179,8 \pm 2,2$ μ m, n=44 sejt). A húsz perces alapvonal felvétele során illetve a párosítást követően $-71,4 \pm 0,1$ mV-os membránpotenciálon tartottuk a sejteket, miközben 20 másodperces időközönként kiváltottunk egy uEPSP-t. A párosítás során öt percen keresztül minden másodpercben kiváltottunk egy AP/uEPSP párt (az AP és az uEPSP közötti időkülönbség ± 4 ms, átlagosan: $-0,82 \pm 0,4$ ms) mialatt a kérdésnek

megfelelően vagy depolarizált ($-62,2 \pm 0,3$ mV), vagy pedig hiperpolarizált ($-81,1 \pm 0,3$ mV) állapotban tartottuk a sejtet. Az elvégzett előkísérletek rámutattak arra, hogy nagyon nehéz hosszú távú változásokat kiváltani a sejtekben standard elvezetési körülmények között, feltehetőleg azért, mert az elvezetéssel szükségszerűen együtt járó dialízis miatt egyszerűen nem működnek a változásokat megindító és fenntartó intracelluláris folyamatok. Tapasztalatunk szerint a nagy ellenállású pipetták használata már elegendő volt a folyamatok megőrzéséhez. Ennek megfelelően $15\text{ M}\Omega$ -nál nagyobb ellenállású pipettákat alkalmaztunk, és $50\text{ M}\Omega$ soros ellenállás alatt megszakítottuk a kísérleteket. A soros- és bemenő ellenállás nyomon követéséhez 500 ms hosszú, -10 pA erősségű áramlépéseket iktattunk be minden regisztrált feszültségjel esetén. A használt csatorna blokkolókat közvetlenül az elvezető oldatban alkalmaztuk, szérum albumin (BSA, 1 mg/ml) jelenlétében. A kísérlet végeztével rögzítettük a sejt 3D alakját a szomatikus távolság meghatározásához.

A hosszú távú hatás méréséhez a fél órával a párosítás után kiváltott eseményeket hasonlítottuk össze az alapvonal eseményeivel. Kizártuk azokat a kiváltott eseményeket, ahol az egyidejűleg érkező spontán szinaptikus esemény nem tette lehetővé az uEPSP amplitúdó meghatározását. Ennek megfelelően minden kísérletet egyetlen értékkel, a potenciáció nagyságával jellemeztünk. Végül azt hasonlítottuk össze, hogy a különböző membránpotenciál mellett párosított kísérletekben eltér-e a potenciáció mértéke.

3.16. Statisztikai módszerek (1. és 2. projekt)

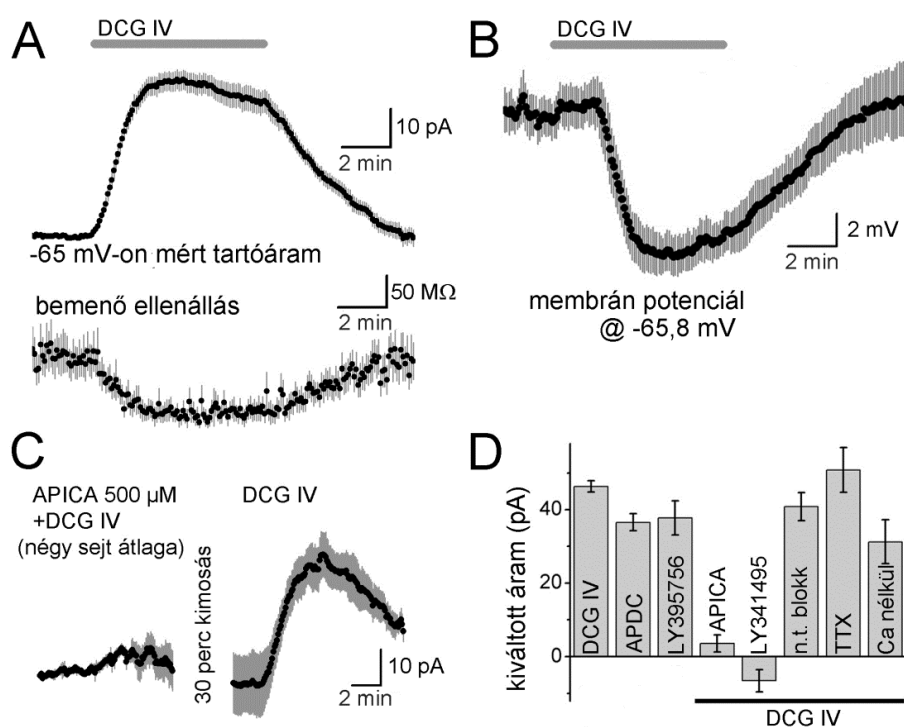
Az adatokat pClamp (Molecular Devices), Origin (OriginLab), Stimfit (^[175], <https://github.com/neurodroid/stimfit>) és Excel (Microsoft) programok felhasználásával értékeltük ki. A feszültségértékeket a junkciós potenciálból eredő eltolás korrekciója nélkül mutattuk be. Az egyes csoportok közötti eltérések vizsgálatához kétszélű páros vagy páratlan t-tesztet használtunk mivel az adatok normális eloszlást követtek (Shapiro-Wilks teszt alapján). A kiugró adatok kiszűrésére Grubb tesztet alkalmaztunk, ami egyetlen esetben, a T-típusú csatornablokkoló jelenlétében végzett kalciumméréseknél talált szignifikánsan eltérő adatpontot, amit ezért kizártunk az analízisből. Az adat eltávolítása nem változtatta meg a kísérlet eredményét. A csoportokat leíró értékek „átlag \pm az átlag szórása (SEM)” alakban kerültek bemutatásra.

4. EREDMÉNYEK I

4.1. Az mGluR2 hiperpolarizáló hatású ioncsatornát nyit ki

Az első általunk feltett kérdés az volt, hogy mi a mérhető hatása az mGluII receptoroknak a szemcsesejtek elektromos viselkedésére. A kérdést voltage-clamp mérések segítségével közelítettük meg, ahol a sejteket -65 mV-on tartva farmakológiailag aktiváltuk a receptorokat egy olyan agonista (DCG IV) alkalmazásával, mely alacsony koncentrációban specifikus az mGluII receptorokra^[176]. Ahogy a 15.A Ábrán látható, $1 \mu\text{M}$ DCG IV jelenlétében $46,3 \pm 1,5$ pA nagyságú kimenő áramot figyeltünk meg a szemcsesejteken ($n=77$ sejt). A kiváltott hatás visszafordítható, mivel a tartóáram értéke egy 8 perces kimosási periódust követően visszatért az alapvonalra ($0,8 \pm 2,3$ pA, $n=14$ sejt). Hosszan tartó agonista alkalmazás esetén sem tapasztaltunk jelentős változást az indukált áramban, ami arra utal, hogy a deszenzitizáció hiánya lehetővé teszi a vizsgált mechanizmus tartós működését. Ezeket a kísérleteket current-clamp módban is megismételtük, mert arra is kíváncsiak voltunk, hogy a kiváltott áram mekkora tényleges feszültségváltozást jelent a szemcsesejtekben. Ha a sejtet a nyugalmi membránpotenciálján tartottuk, akkor a DCG IV alkalmazása kismértékű hiperpolarizációt váltott ki, ahol a membránpotenciál értéke $-79,4 \pm 0,7$ mV-ról $-82,8 \pm 3,6$ mV-ra változott ($-3,3 \pm 0,3$ mV-os hatás, $p=7 \cdot 10^{-15}$, $n=43$ sejt, t-teszt). Ha a sejteket a voltage-clamp méréshez használt -65 mV közelébe depolarizáltuk, akkor lényegesen nagyobb hiperpolarizációt figyelhettünk meg (15.B Ábra, $-65,8 \pm 0,5$ mV-os kiindulási membránpotenciál mellett $-6,8 \pm 0,5$ mV-os hatás, $n=23$ sejt). Az elvégzett kísérletek arra utalnak, hogy az mGluII receptorok működése mérhető elektromos változást okoz a szemcsesejtekben. Ez a változás a nyugalmi membránpotenciál közelében kismértékű hiperpolarizációt jelent. Mivel a voltage-clamp kísérletek során az elvezetett sejt eredő ionáramát mérjük, így elméletben többféle jelenség is állhat egy kimenő áramkomponens háttérében. Például egy eddig folyamatosan jelen levő bemenő áramkomponens megszűnése ugyanolyan látszólagosan kimenő áramként jelenik meg a mérésekben, mintha megjelenne egy teljesen új, kimenő áramkomponens. Mindemellett a kialakult áram nem feltétlenül ioncsatorna működés eredménye, mert egy elektrogén

pumpa működése is mérhető áramot generál. A sejtek bemenő ellenállásának nyomon követésével el tudjuk dönteni, hogy milyen folyamat áll a megfigyelt kimenő áram hátterében, mivel a csatornanyitás bemenő ellenállás csökkenéssel jár (lásd a 2. egyenletet), míg a csatornazárás R_{in} növekedéshez vezet. Az elektrogén pumpaműködés nincs közvetlen hatással a bemenő ellenállásra. A méréseink szerint a kimenő áramkomponens megjelenésével párhuzamosan jelentős mértékben (15.A Ábra, $-27,7 \pm 2,1 \%$) csökkent a sejtek bemenő ellenállása, ami arra utal, hogy az mGluII receptorok aktiválása egy korábban zárt csatornapopuláció kinyitását eredményezte.



15.Ábra. Az mGluR2 hiperpolarizáló hatása a szemcsesejteken illetve a hatás farmakológiai profilja

A, 1 μ M DCG IV hatására kialakuló átlagos tartóáram változás, és a vele párhuzamosan kialakuló bemenő ellenállás csökkenés. Az egyes adatpontok 5 s hosszú időablak átlagát jelentik. B, A DCG IV hatására kialakuló hiperpolarizáció -65,8 mV-os kiindulási membránpotenciál mellett. C, A csoport specifikus antagonistá APICA jelenléte megakadályozta a hatás kialakulását, míg a kontroll körülményekre jellemző hiperpolarizáló hatást tapasztaltuk az antagonistá kimosását követően. D, Az mGluII receptor agonista APDC (50 μ M) és a specifikus mGluR2 agonista LY395756 (5 μ M) hatása összevethető a DCG IV alkalmazás esetén tapasztalt kimenő áram nagyságával. A csoportspecifikus antagonisták (APICA, 500 μ M és LY341495, 0,5 μ M) jelenléte meggátolta a DCG IV hatás kialakulását. A hálózati hatások csökkentését célzó beavatkozások (n.t. blokk: ionotróp GABA- és glutamáterg receptorok gátlása, TTX: AP keletkezés megszüntetése a nátriumcsatornák gátlásán keresztül, Ca nélkül: a hírvivő anyagok felszabaduláshoz elengedhetetlen kalcium eltávolítása az oldatból) nem befolyásolták a kimenő áram nagyságát.

Farmakológiai kísérletekben előfordulhat, hogy az agonista valamely nem specifikus hatása okozza a megfigyelt változást. Szerettük volna kizárni ezt a lehetőséget is, ezért újabb kísérleteket végeztünk más csoport specifikus agonisták és antagonisták használatával. Az eredményeket reprodukálni tudtuk egy olyan mGluII receptor agonista, az APDC (50 μM) használatával is, ami szerkezetét tekintve nem mutat rokonságot a DCG IV-al. Ebben az esetben a receptor aktiváció $36,6 \pm 2,3$ pA-es kimenő áramot eredményezett, amelyhez $-23,4 \pm 3,2$ %-os bemenő ellenállás csökkenés társult ($n=12$ sejt). Két csoportspecifikus mGluII receptor antagonistá, az APICA (500 μM) és az LY341495 (0,5 μM , ebben a koncentrációban blokkolja az mGlu2/3/8 receptorokat^[177]) jelenlétében is elvégeztük a DCG IV bemosást. Azt tapasztaltuk, hogy a specifikus antagonisták jelenléte kivédte a kimenő áram megjelenését és az ahhoz társult bemenő ellenállás változást (15.C és D Ábra, APICA jelenlétében $3,6 \pm 2,3$ pA tartóáram változás és $0,96 \pm 2,8$ % változás a bemenő ellenállásban, $n=7$ sejt; LY341495 jelenlétében $-6,5 \pm 3$ pA tartóáram változás és $1,3 \pm 3,7$ % változás a bemenő ellenállásban, $n=12$ sejt). Az antagonisták jelenléte önmagában nem okozott tartóáram változást (az átlagos tartóáram kontroll körülmények között $63,6 \pm 3,1$ pA; APICA jelenlétében: $67,3 \pm 13,2$ pA $p=0,76$; míg LY341495 jelenlétében: $66,9 \pm 9,6$ pA, $p=0,71$, t-teszt), ami arra utal, hogy az általunk használt elvezetési körülmények között nincsenek tónusosan nyitva levő mGluII receptorok a szemcsesejteken, melyek befolyásolhatnák a sejt működését. Négy sejt esetében megismételtük a DCG IV bemosást fél órával az APICA kimosása után is, és azt tapasztaltuk, hogy az antagonistá nélkül a sejtek az általában tapasztalathoz hasonló mértékű DCG IV hatást mutattak (15.C Ábra), ami arra utalt, hogy kizárólag az antagonistá felelt az mGluII receptorhatás hiányáért. Ezt a kontrol kísérletet az LY341495 esetén nem tudtuk elvégezni, mert ezt az anyagot a tapasztalatunk szerint nem lehetett kimosni a szeletből. Ezek a kísérletek megerősítették, hogy a DCG IV hatása valóban specifikusan az mGluII receptorok aktiválásán keresztül valósul meg.

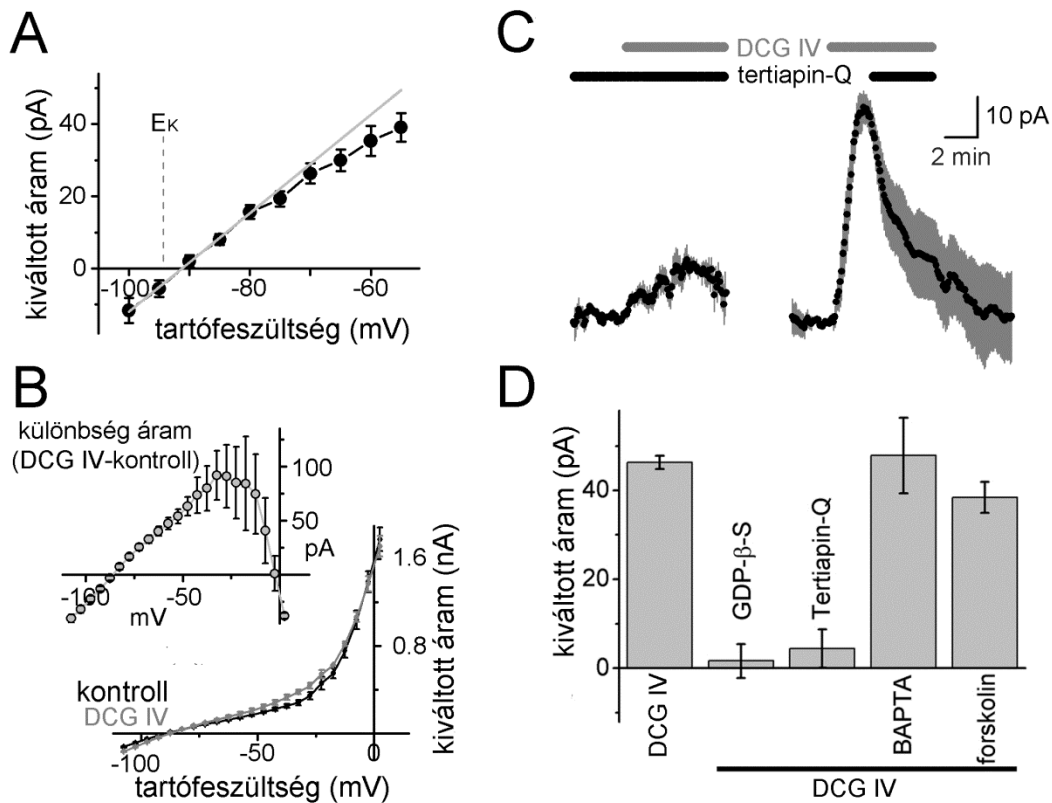
Szerettük volna azt is megvizsgálni, hogy a csoporton belül pontosan melyik receptor felelős a megfigyelt hiperpolarizáló hatásért. Az LY395756, ami az mGluR2 receptorokon agonistaként hat, míg a csoport másik tagján gátló hatást fejt ki^[178]. Kísérleteinkben az LY395756 (5 μM) a DCG IV-hoz nagyon hasonló hatást váltott ki a szemcsesejteken ($37,8 \pm 4,7$ pA tartóáram változás, $-26,0 \pm 3,0$ %-os bemenő ellenállás

csökkenéssel kísérve), ami azt bizonyítja, hogy a mért hatás mGluR2 aktivációján keresztül valósul meg. Urs Gerber munkacsoportja kollaboráció keretében megerősítette az mGluR2 kizárólagos szerepét mGluR2- és mGluR3 génkiütött állatok használatával is. Megvizsgáltuk továbbá, hogy a kiváltott jelenség lehet-e hálózati működés eredménye, ugyanis előfordulhat, hogy az mGluR2 nem közvetlenül a szemcsesejteken aktiválódik, hanem más ideg- vagy gliasejteken helyezkednek el, és ezek a sejtek befolyásolják a szemcsesejteket valamilyen közvetett mechanizmuson keresztül. Úgy vizsgáltuk meg ezt a lehetőséget, hogy olyan körülmények között aktiváltuk az mGluR2 receptorokat, ahol a neuronhálózat elemeit szétkapcsoltuk egymástól. Többféle módon is megpróbáltuk csökkenteni a hálózati hatást. Először is, 1 μM TTX segítségével blokkoltuk az akciós potenciálok kialakulását és terjedését. Más kísérletekben a szinaptikus jelátvitelt szüntettük meg, specifikus GABA- és glutamát receptor blokkolók együttes alkalmazásával (5 μM SR95531, 10 μM CNQX és 20 μM D-APV volt jelen az oldatban). Végül kalciummentes elvezető oldattal is végeztünk kísérleteket, így módon csökkentve a neurotranszmitter felszabadulás lehetőségét. A kalciummentes oldat használatával a hatás gliális eredete is vizsgálható, mivel a gliális glutamát felszabadulás döntően kalciumfüggő folyamatokon alapul^[179]. Egyik beavatkozás sem változtatta meg a DCG IV hatását (15.D Ábra, DCG IV által indukált áram TTX-ben: $40,9 \pm 3,8$ pA, n=8; ionotróp receptor blokkolók keverékében: $50,8 \pm 6,1$ pA n=4; névleg kalciummentes oldatban: $31,3 \pm 5,9$ pA, n=6), ezért megállapítottuk, hogy a hálózati aktivitás nem játszik szerepet a megfigyelt mGluR2 hatás közvetítésében, vagyis az mGluR2 közvetlenül az elvezetett szemcsesejteken aktiválódtak. Összegezve, az eredmények arra utalnak, hogy a szemcsesejteken található mGluR2 hiperpolarizáló hatású ioncsatornákat nyit ki.

4.2. Az mGluR2 aktivációja G-fehérjén keresztül GIRK csatornák kinyitásához vezet

Miután láttuk, hogy az mGluR2 hiperpolarizációt vált ki, újabb kísérleteket terveztünk, amiben azt vizsgáltuk meg, hogy mely ioncsatorna közvetíti a hatást. Ahogy a current-clamp kísérletekben láttuk, az mGluR2-aktivált hiperpolarizáció sokkal nagyobb mértékű volt akkor, ha depolarizáltabb kiindulási membránpotenciál mellett

mostuk be a DCG IV-t. A kézenfekvő magyarázat a jelenségre az, hogy a hiperpolarizáltabb membránpotenciál esetén a csatorna által közvetített ionáramra nézve kisebb a hajtóerő, mint a depolarizáltabb sejtekben, vagyis a hiperpolarizáltabb feszültség közelebb áll az ionáram fordulási potenciáljához. Ennek alapján azt gondoltuk, hogy a farmakológiailag kiváltott hiperpolarizáló áramot vagy kizárólag káliumcsatornák működése hozza létre, vagy pedig egy olyan kevert ionáram áll a háttérben, amiben dominál a káliumionok mozgása. Voltage-clamp kísérletek segítségével pontosan meghatároztuk az mGluR2-aktivált ionáram fordulási potenciálját (16.A Ábra, $-92,1 \pm 2,7$ mV, $n=8$ sejt), ami nagyon közel esett a káliumion elméleti fordulási potenciáljához ($-94,3$ mV, az általunk használt oldatok esetén). Ezzel a kísérlettel bebizonyítottuk, hogy tisztán káliumcsatornák okozzák a hiperpolarizációt. A kiváltott áram feszültségfüggését sokkal tágabb feszültségtartományban is megvizsgáltuk, mert a kiváltott ionáram feszültségfüggése utalhat a keresett csatorna típusára. Ezt egy olyan protokoll segítségével végeztük, ahol a feszültség diszkrét lépések helyett lassan (250 ms alatt), de folyamatosan a kezdeti -120 mV-ról 0 mV-ra változott (16.B Ábra). Mivel ezek a mérések a feszültségfüggő nátrium csatornák aktivációs küszöbénél lényegesen magasabb feszültségtartományt is érintettek, ezért ezeket a kísérleteket $1 \mu\text{M}$ TTX jelenlétében végeztük. A rámpaszerűen elnyújtott protokoll segítségével azt találtuk, hogy az áram a depolarizáltabb membránpotenciál tartományban jellegzetes befelé egyenirányító profilt mutat. Hasonló befelé egyenirányító feszültségfüggés a káliumcsatornák egy nagy csoportjára jellemző, melyek funkcionális szempontból további négy csoportra oszthatók fel^[180]. Vannak közöttük olyanok, melyek mindig nyitott állapotban vannak (Kir 2.x alcsalád) és a nyugalmi membránpotenciál kialakításában vesznek részt. A Kir 6.x alcsalád tagjainak aktivitása a sejtek anyagcseréjétől függ és a működésük szabályozásában kiemelt szerepet játszanak az intracelluláris nukleotidok. A harmadik csoportba azok a csatornák tartoznak, melyek az intracelluláris K^+ háztartás fenntartásához járulnak hozzá. A csoport a Kir 1.x, Kir 4.x, Kir 5.x és Kir 7.x alcsaládokat foglalja magába.



16.Ábra. A GIRK csatornák szerepe a kiváltott mGluR2 hatásában

A, A felső grafikon az 1 μ M DCG IV alkalmazásával kiváltott ionáram fordulási potenciálját mutatja. A szürke vonal az öt leghyperpolarizáltabb adatpontra (-100 mV és -80 mV közé eső tartomány) illesztett egyenes. Szaggatott vonallal jelöltük az elméleti úton számított kálium egyensúlyi potenciált. B, *lent*, A tág feszültségtartományban mért teljes ionáram kontroll körülmények között és DCG IV jelenlétében. *fent*, A DCG IV-indukált áram (itt különbség áram, vagyis a DCG IV jelenlétében mért teljes ionáram és a kontroll ionáram különbsége) erőteljes rektifikációt mutató feszültségfüggése. C, Bal oldalon látható, hogy a GIRK csatornákat gátló tertiapin-Q (0,5 μ M) jelenléte megakadályozta a DCG IV hatás kialakulását. A jobb oldali adatok tanúsága szerint a tertiapin-Q képes volt megszüntetni a már kialakult áramot is. D, Az áram kialakulásához vezető mechanizmus azonosítását célzó kísérleteink összefoglaló grafikonja. A G-fehérjékhez kapcsolt jelátviteli útvonal gátlása (GDP- β -S, 0,4 μ M), illetve a GIRK csatornák blokkolása megakadályozta a kimenő áram megjelenését. Ezzel szemben az intracelluláris kalciumszinthez kapcsolódó, vagy az adenilát-cikláz aktivitáson alapuló folyamatok befolyásolása (10 mM BAPTA vagy 10 μ M forskolin segítségével) hatástalannak bizonyult.

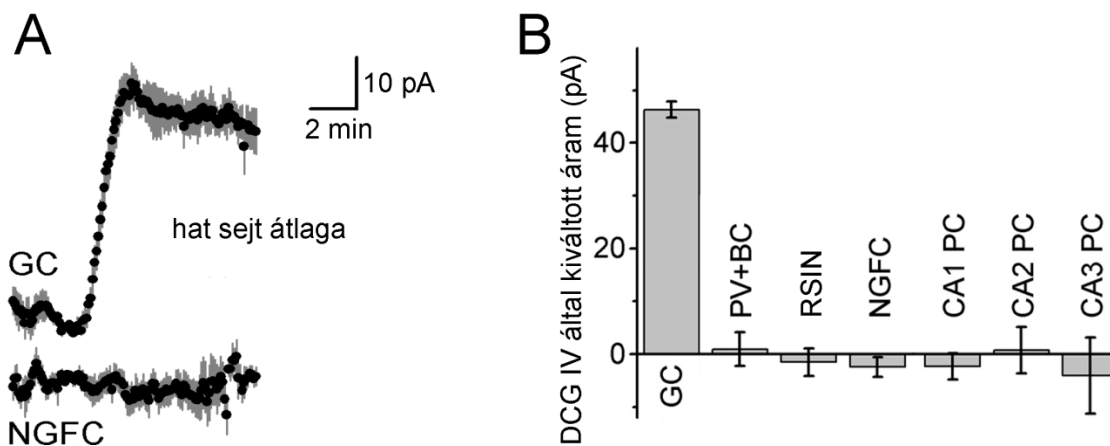
A kutatás szempontjából a GIRK (K_{ir} 3.x) csatornák csoportja a legjelentősebb, mert ezek a csatornák G-fehérjéhez kapcsolt működést mutatnak, és az irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy bizonyos sejt típusokban az mGluII receptorok aktiválódása $G_{i/o}$ fehérjéhez kapcsolt jelátviteli úton keresztül GIRK csatornák nyitására vezethet^[137,139,181]. Ezért a következőkben tisztáztuk a G-fehérjék és GIRK csatornák szerepét a vizsgált mechanizmusban. A G-fehérjéhez kapcsolt jelátvitelt úgy vizsgáltuk, hogy az intracelluláris oldatunkban jelen levő GTP-t egy stabil analógiára, a GDP- β -S-re cseréltük ki, ami gátolja a G-fehérjék működését. Az így kezelt sejtekben a DCG IV

hatására nem alakult ki a korábban megfigyelt hiperpolarizáló áram (16.D Ábra, $1,7 \pm 3,8$ pA, $n=7$ sejt), ami azt bizonyítja, hogy az mGluR2 G-fehérjéken aktiválásán keresztül hat. A GIRK csatornák szerepének bizonyításához tertiapin-Q ($0,75 \mu\text{M}$) jelenlétében végeztünk kísérleteket. Ez egy olyan peptid toxin, ami specifikusan gátolja a befelé egyenirányító káliumcsatornák egy részét, nevezetesen a ROMK1 (K_{ir} 1.1a) és a GIRK1-4 (K_{ir} 3.1- K_{ir} 3.4) csatornákat^[182,183]. Azt tapasztaltuk, hogy a tertiapin-Q meggátolta a DCG IV hatását (16.C és D Ábra, $4,4 \pm 4,3$ pA, $p=0,33$, $n=13$, t-teszt). Ez a kísérlet egyértelműen a GIRK csatornák szerepére utal, ha figyelembe vesszük, hogy a ROMK1 csatornák működése független a G-fehérje aktivitástól. A G-fehérjék részvételén kívül más jelátviteli mechanizmusokat is megvizsgáltunk. A cAMP függő útvonalak szerepét az elvezető oldathoz adott adenilát-cikláz aktivátor forskolin ($10 \mu\text{M}$) segítségével vizsgáltuk, míg az intracelluláris kalciumszint változásának szerepét egy magas affinitású kalciumkötő molekula, a BAPTA (10 mM) intracelluláris alkalmazásával teszteltük. Eredményeink alapján egyik útvonal sem játszik szerepet a DCG IV hatásában (16.D Ábra, $38,4 \pm 3,5$ pA forskolin jelenlétében, $n=6$ sejt; $47,9 \pm 8,5$ pA intracelluláris BAPTA jelenlétében, $n=7$ sejt).

A kísérletek alapján tehát arra következtettünk, hogy a szemcsesejtek mGluR2 receptorai G-fehérjék közvetítésével aktiválják a GIRK csatornákat, ami hiperpolarizációt eredményez.

4.3. Az mGluR2 hiperpolarizáló hatása csak a szemcsesejteken figyelhető meg a vizsgált hippocampalis sejtípusok között

Azt is megvizsgáltuk, hogy vajon a megfigyelt hiperpolarizáló hatás kifejezetten csak a szemcsesejtek sajátossága a hippocampus-on belül, avagy vannak más sejtípusok is, melyek hasonló szomato-dendritikus mGluII receptorhatást mutatnak. Ennek megfelelően kiterjesztettük a vizsgálatainkat mindhárom CA régió piramissejtjeire, illetve a DG három interneuron típusára is. Az interneuronok közül a parvalbumint kifejező, gyors tüzelésű kosársejteket, a periszomatikus régiót beidegző, szabályosan tüzelő interneuronokat, illetve a neurogliaform sejteket vizsgáltuk meg. Az egyes sejtípusok azonosítása a sejtek elektrofiziológiai tulajdonságain, illetve a kísérlet elvégzését követő anatómiai vizsgálatokon alapult (lásd 12. Ábra, 3.8 fejezet).



17.Ábra. Az *mGluR2* aktivációja csak a szemcsesejteken vezetett hiperpolarizációhoz

A, Neurogliaform sejteken (NGFC) és a velük egyidejűleg szemcsesejteken (GC) végzett DCG IV bemosás hatása. B, A vizsgált sejtípusok között a DCG IV által indukált kimenő áram csak a szemcsesejteken volt megfigyelhető (DGGC: szemcsesejt, PV+BC: gyors tüzelésű kosáresejt, RSIN: szabályos tüzelésű interneuron, CA1PC/CA2PC/CA3PC: CA1/2/3 piramisesejt).

A kísérleteink során azt találtuk, hogy egyetlen általunk vizsgált sejtípus sem mutatott a szemcsesejteken megfigyelthez hasonló kimenő áramkomponenst a DCG IV bemosás hatására (17.B Ábra). Kísérleten belüli pozitív kontrollként sok esetben a különféle sejtípusok mellett egyidejűleg szemcsesejteken is mértük a DCG IV hatást (17.A Ábra). Ezek a szemcsesejtek a tipikus kimenő áram megjelenésével reagáltak a DCG IV bemosására ($42,2 \pm 3,1$ pA, $n=6$ sejt átlaga). A CA3 piramisesejtek esetében megfigyeltünk egy lassan kifejlődő, kis amplitúdójú bemenő áramkomponenst ($-8,0 \pm 12,2$ pA, $p=0,53$, t-teszt), ami feltehetőleg az *mGluR3* közvetítésével kialakuló fokozott hálózati hatás eredménye^[140]. Összességében elmondhatjuk, hogy a dendritikus *mGluR2* aktiváció hatása nem egy általános sejtes mechanizmus a hippocampus-ban.

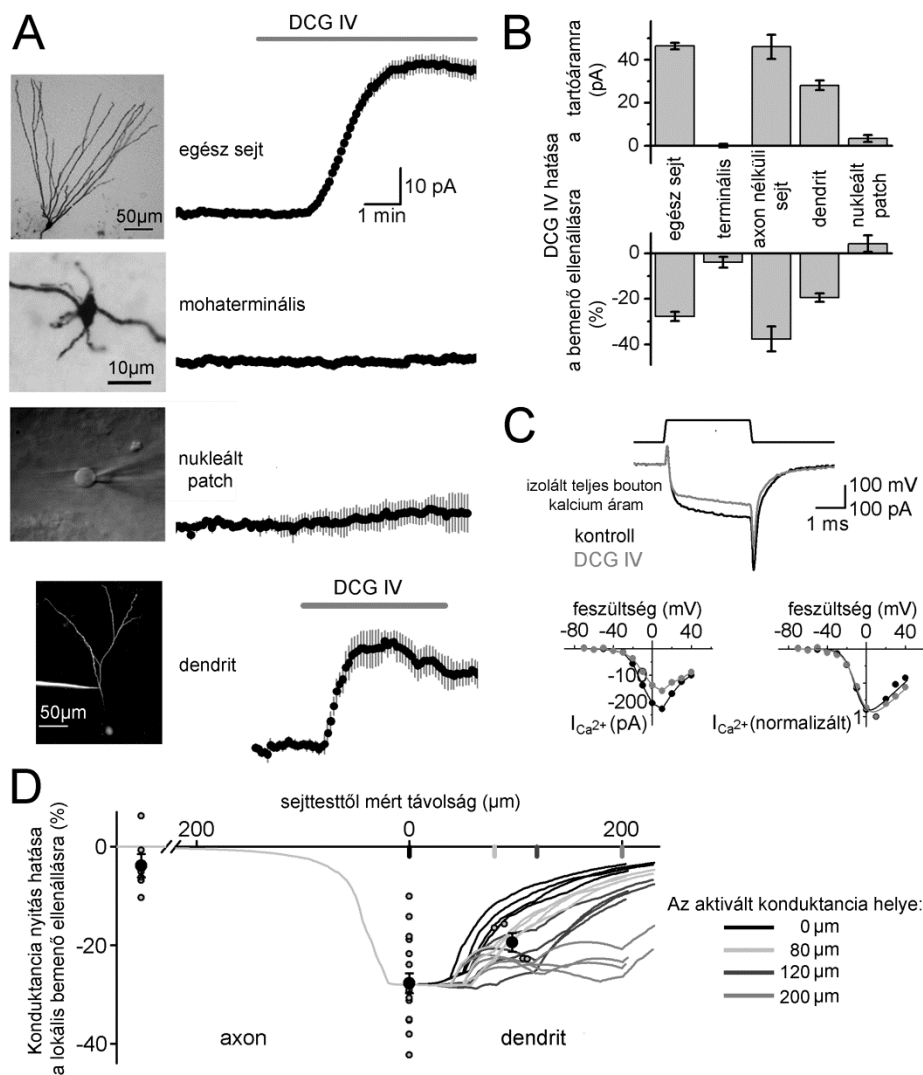
4.4. Az *mGluR2* a dendriten nyitja ki a GIRK csatornákat

Az eddig bemutatott egészsejtes kísérleti adatok tükrében még mindig nem jelenthettük ki, hogy a megfigyelt hatás valóban a sejtek szomato-dendritikus receptorainak köszönhető. Például lehetséges, hogy ugyanazok az axonális *mGluR2* felelős a GIRK csatornák aktiválódásáért, mint amik a kalcium beáramlás csökkentéséért felelnek az axonterminálisokban. Szerettük volna pontosan meghatározni, hogy a szemcsesejtek mely részén nyílnak ki a GIRK csatornák az

mGluR2 aktiválásakor, ezért közvetlen elektrofiziológiai méréseket végeztünk a szemcsesejtek axon terminálisaiból, izolált szomatikus membránokból és szemcsesejt dendritekből is (18.A Ábra).

A közvetlen terminális elvezetéseket a CA3 régió str. lucidum rétegében végeztük. Erre azért volt szükség, mert a CA3 területén futó axonok már kellően messze (több száz μm -re) vannak a sejttesttől ahhoz, hogy az elvezetett axonokat elektrotónusosan izoláltnak tekintsük^[151]. Ezáltal biztosak lehettünk benne, hogy a mért elektromos jelek az axonból erednek, nem pedig a sejttest potenciálváltozásai határozzák meg őket. A kísérletek tanúsága szerint a DCG IV bemosás nem váltott ki mérhető hatást a terminálisokban (18.A Ábra), ami azt bizonyítja, hogy az mGluR2 által aktivált káliumcsatorna nem az axonban van (voltage-clamp módban: $0,1 \pm 0,8$ pA, $p=0,89$, $n=7$ terminális, t-teszt; változás a bemenő ellenállásban: $-4,0 \pm 4,7$ %, $p=0,44$, $n=5$ terminális, t-teszt; current-clamp módban: $-0,05 \pm 0,5$ mV, $n=15$ terminális). Könnyen lehetséges azonban, hogy a közvetlen elvezetés túlságosan beavatkozik az axon érzékeny belső egyensúlyába, és ezzel szétrombolja az mGluR2 hatásmechanizmusát. Mivel az mGluR2 csökkenti a preszinaptikus kalcium beáramlást az axonban^[132], arra gondoltunk, hogy a jelátviteli út állapotát tesztelhetjük az axonális kalcium áramra kifejtett hatás mérésén keresztül. Ezért feszültségzár módban, izolált kalcium áramokon is megmértem a DCG IV hatását a terminálisokban (18.C Ábra). Azt tapasztaltuk, hogy a DCG IV nagymértékben csökkentette a mérhető kalciumáramot (változás a kalcium áram amplitúdójában: $-26,3 \pm 5,3$ %, $n=4$ terminális), amiből arra következtettünk, hogy nem sérült az mGluR2 hatásmechanizmusa. Ennek fényében a farmakológiailag indukálható GIRK áram hiánya arra utal, hogy nem az axonban, hanem egy másik sejten belüli régióban alakul ki a funkcionális kapcsolat a mGluR2 és a GIRK csatornák között. A lehetséges axonális eredet további tanulmányozásához újraelemeztük a szomatikus mérési eredményeinket, mégpedig úgy, hogy kiválogattuk azokat a sejteket, melyekről a sejttest közelében levágódott az axon a szeletkészítés során (anatómiailag igazolt módon az axon hossza $50 \mu\text{m}$ -nál rövidebb volt), mert ha az ionáram az axonból ered, akkor az axon nélküli sejteken sokkal kisebb hatást kell tapasztalnunk. Az axon nélküli sejtek méréseit vizsgálva arra a megállapításra jutottunk, hogy ezeken a sejteken a DCG IV hatása érdemben megegyezik a teljes populáción mért hatással (18.B Ábra, tartóáram változás: $46 \pm 5,6$ pA, $p = 0,001$, bemenő ellenállás változás: $-37,7 \pm 5,5$ %, $p = 0,001$).

$p=0,002$ $n=5$ sejt, t-teszt), ami tovább erősíti a feltételezésünket, miszerint az ionáram nem az axonból ered, vagyis a vizsgált mechanizmus mindenképpen szomato-dendritikus hatásnak tekinthető.



18.Ábra. A GIRK csatornák a dendriten nyílnak ki

A, 1 μM DCG IV hatására kialakuló tartóáram változások egészsejtes elvezetések, közvetlen mohaterminális elvezetések, nukleált-patch mérések és a közvetlen dendritikus elvezetések esetén. A képek balra az elvezetett struktúra alaktani sajátosságait emelik ki. A felső két képen egy szemcsesejt és egy mohaterminális látható, az elvezetést követő immunoperoxidáz reakcióval láthatóvá téve. Alattuk egy nukleált-patch DIC képe, míg legalul egy elvezetett szemcsesejt dendrit konfokális képe látható. B, A bemenő ellenállásban és a tartóáramban mért hatás összesítő grafikonja. C, DCG IV hatása a mohaterminálisból izolált kalcium áramokra. Felül egyetlen kísérlet látható, míg alul a kalciumáramok feszültségfüggését mutatjuk be. D, Számítógépes modellezés eredménye, ami a várható bemenő ellenállás változást mutatja az axo-szomato-dendritikus tengely mentén. A szimbólumok a különböző szubcelluláris régiókban mért változásokat jelölik. A körök az egyedi adatpontokat, míg a fekete pontok a kísérletek átlagát jelzik.

Azt is megvizsgáltuk, hogy lehet-e a konduktancia eredésének a helye a sejttest maga. Ehhez úgynevezett nukleált-patch kísérletes konfigurációt alkalmaztunk, ahol izolált szomatikus membránon tudtuk mérni a DCG IV hatását. A kísérlet tapasztalatai szerint az mGluII receptorok aktivációja sem tartóáramban, sem pedig a bemenő ellenállásban nem okozott mérhető változást (változás a tartóáramban: $3,4 \pm 1,6$ pA, $p=0,89$, $n=7$ nukleált patch, t-teszt; változás a bemenő ellenállásban: $4,3 \pm 3,7$ %, $p=0,3$, $n=6$ nukleált patch, t-teszt), amiből arra következtettünk, hogy a csatornanyitás nem a sejttesten történik. Az axonnal szemben a sejttestben nem bizonyított az mGluII receptorok jelenléte illetve a közvetlen kapcsolat az mGluII receptorok és a kalciumáramok között, ezért ebben az esetben nem tudtuk pozitív kontrollként használni a kalciumáramokon mérhető DCG IV hatást.

Mivel sem az axonális sem pedig a szomatikus membránon nem sikerült aktiválni a vizsgált mechanizmust, ezért arra következtettünk, hogy a GIRK csatornáknak szükségszerűen a szemcsesejt dendriteken kell kinyitnia. A dendritikus eredet további vizsgálatához közvetlen dendritikus elvezetéseket végeztünk a szemcsesejtekből (80–111 μm távolságra a sejttesttől). Azt tapasztaltuk, hogy a dendriteken mérve a DCG IV bemosása $28 \pm 2,2$ pA nagyságú áramot váltott ki, amihez $19,4 \pm 1,9$ %-os bemenő ellenállás csökkenés társult (18.B és D Ábra, $n=4$ dendrit). Bár ez az adat teljes mértékig összhangban áll a feltételezéssel, miszerint az áram a dendritfán aktiválódik, azonban a szemcsesejtek alaktani és elektromos tulajdonságait is figyelembe véve kellő óvatossággal kell kezelni a mérések eredményét. Az elektrotónusosan kompakt szemcsesejt dendriteken mérhető jelek ugyanis nem feltétlenül a közvetlenül elvezetett dendritből erednek, mivel a sejttest közvetítésével más dendritek működése is jelentkezhet a mérésben. Mindemellett a szemcsesejtek morfológiai elrendezése kedvez a jelek sejttest szintjén történő összegzésének, így az is előfordulhat, hogy a legnagyobb változás éppen a sejttesten mérhető, távol a csatornanyitás valódi helyétől^[184]. Kíváncsiak voltunk arra, hogy az általunk mért elektrofiziológiai adatok alapján meg lehet-e becsülni a csatornanyitás helyét, ezért számítógépes modellezést végeztünk egy előzetesen rekonstruált, anatómiai és biofizikai paramétereit tekintve valóság-hű szemcsesejt modellen (7. számú sejt a Schmidt-Hieber és mtsai által 2007-ben publikált szemcsesejt készletből^[46]). A modell segítségével négy különböző esetet vizsgáltunk meg. Az egyik esetben a csatornák a sejttesten nyíltak ki, míg egy másik vizsgált

elrendezésben az aktiválódó csatornák távol (200 μm távolságra) helyezkedtek el. Két olyan esetet is tanulmányoztunk, ahol a csatornák köztes pozícióban helyezkedtek el a dendriten (80 illetve 120 μm -re a sejttesttől). A GIRK csatornák a vizsgált távolságban minden dendriten jelen voltak, miközben úgy állítottuk be az egyedi dendritekre eső konduktancia értékét, hogy reprodukálni tudjuk a 28 %-os bemenő ellenállás csökkenést a sejttest szintjén. Ennek megfelelően a dendritikus távolságtól és a dendritek számától függően más és más volt az egy dendriten aktiválódó konduktancia értéke. Ahogy azt a 18.D Ábrán láthatjuk, a bemenő ellenállás változása a különböző esetekben eltérő térbeli profilt mutatott. Ha a konduktancia csak a sejttesten volt jelen, akkor a dendriten kifelé haladva folyamatosan csökkent a lokálisan mérhető változás. Ezzel szemben a disztális dendritszakaszokon aktivált konduktancia egyenletesen nagy bemenő ellenállás változást eredményezett a dendritfa mentén. A köztes pozíciókban aktivált konduktancia hatása a fent leírt két térbeli profil keverékét mutatta, vagyis a csatornaaktiváció helyétől proximális irányban nézve a hatás többé-kevésbé egyenletes volt, míg a hatás csökkent a távoli dendritek irányában. Általánosan azt láthatjuk, hogy az egyedi dendriteken kiváltott hatás mindig kisebb volt, mint a sejttesten mérhető változás, ami az egyedi konduktanciák hatékony szomatikus összegződését támasztja alá^[184]. Sajnos a dendritikus elvezetések helyén (~100 μm -re) a modellünk mind a négy esetben a mért adathoz nagyon hasonló változásokat jósolt, ami azt a félelmünket igazolta, hogy a dendritikus elvezetések önmagukban nem alkalmasak a GIRK aktiváció helyének meghatározására. Összességében azonban az eddigi elektrofiziológiai adataink összhangban állnak azzal, hogy a funkcionális mGluR2/GIRK kölcsönhatás a szemcsesejtek dendritjein alakul ki.

4.5. Az mGluR2 hatására a GIRK csatornák egy jól körülhatárolható proximális dendritszakaszon nyílnak ki

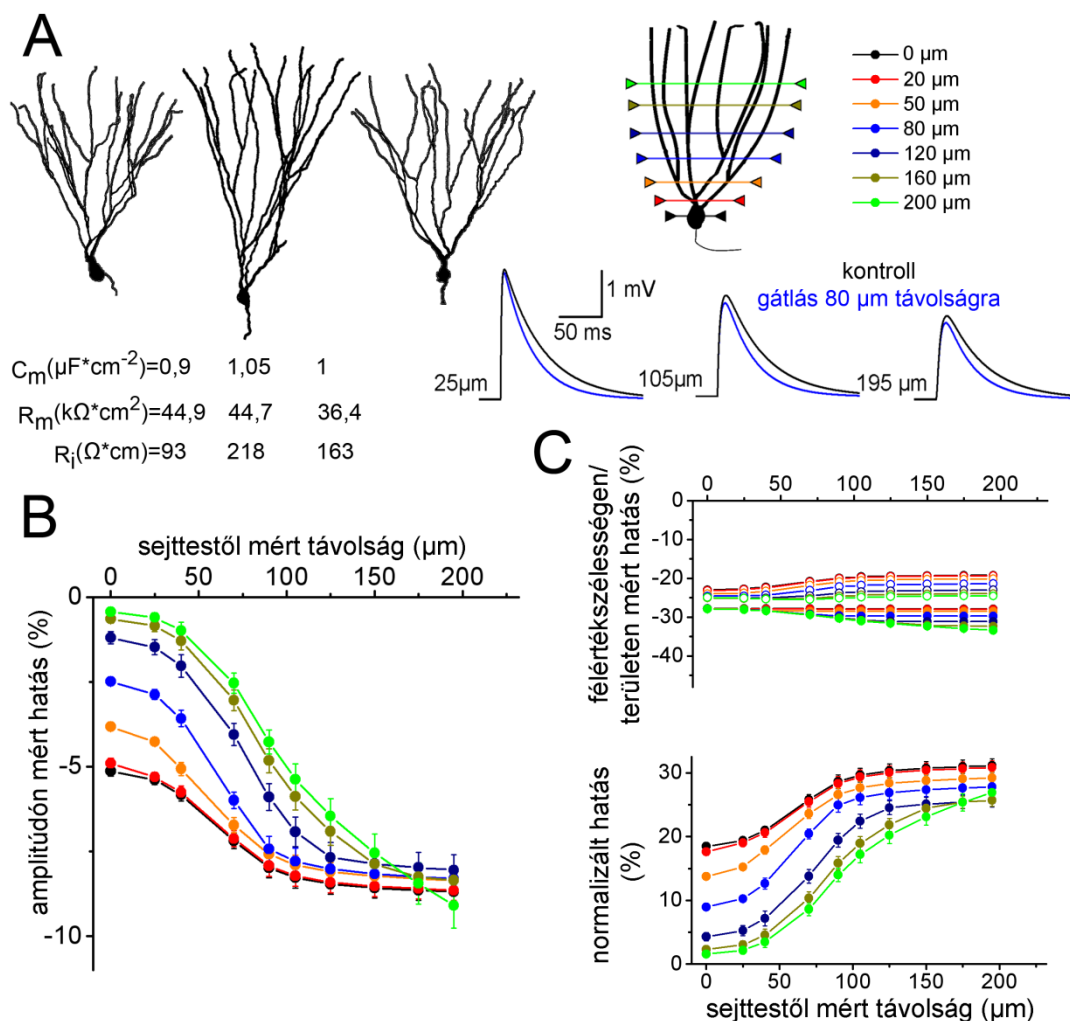
Az eddig ismertett adatok alapján elmondhatjuk tehát, hogy valahol a szemcsesejtek dendritfáján valós jelátviteli kapcsolat van az mGluR2 és a dendritikus hatást közvetítő GIRK csatornák között. A számítógépes szimulációink arra is rámutattak, hogy a hagyományos mérés technikai megközelítésünkkel sajnos nem tudtuk egyértelműen behatárolni a funkcionális kapcsolat a helyét. A modell alapján kiderült, hogy egészejtes mérésekkel még az a kérdés sem tisztázható megnyugtatóan, hogy a

csatornanyitás a sejttesten, vagy pedig egy távoli dendritszakaszon történik-e. Más megközelítésre volt tehát szükség, hogy mégis képet tudjunk alkotni a csatornanyitás pontos helyéről. Kollaborátoraink segítségével először anatómiai módszerekkel vizsgáltuk meg a kérdést. Francesco Ferragutti csoportjának segítségével arra kerestük a választ, hogy az mGluR2 milyen eloszlást mutat a szemcsesejt dendritek mentén, mert ez az eloszlási mintázat kirajzolja számunkra, hogy egyáltalán melyik dendritikus régiókban alakulhat ki a funkcionális kapcsolat az mGluR2 és a GIRK csatornák között. A GIRK csatornák a dendritfa minden részén jelen vannak, ezért azt feltételeztük, hogy az mGluR2 dendritikus eloszlása fogja meghatározni a kapcsolat lehetséges helyét. Mivel az anatómiai vizsgálat nem a saját munkám ezért nem fejtem ki az egyes részleteket. A fény- és elektronmikroszkópos immunhisztokémiai vizsgálatok leírását az értekezés alapjául szolgáló kézirat részletesen taglalja^[185]. Röviden összefoglalva az immunhisztokémiai vizsgálatok egyenlőtlen dendritikus mGluR2 eloszlást tártak fel, ahol a sejttest és a közeli dendritszakaszok gyenge mGluR2 immunoreaktivitást mutattak. Ezzel szemben 80-100 μm távolságra nagyon intenzív jelölődés jellemezte a dendriteket, ami a dendritek mentén kifelé haladva újra gyengülni kezdett.

Az egyenlőtlen receptoreloszlás felvetette azt a lehetőséget, hogy az mGluR2 nem egyenletesen nyitja ki a GIRK csatornákat a dendrit mentén, hanem csak egy kitüntetett dendritikus régióban, 80-100 μm -re a sejttesttől. Pusztán anatómiai adatok alapján nehezen bizonyítható egy ilyen feltételezés, hiszen az anatómiai eloszlás nem biztos, hogy megegyeztethető a funkcionális működés térbeli mintázatával. Például a CA1 piramissejtek A-típusú áramának háttérében álló $K_v4.2$ csatornák egyenletes eloszlást mutatnak a dendritek mentén^[186], míg a mérhető A-áramok erőssége meredeken nő a távoli dendritek felé^[94]. Szükségünk volt tehát valamilyen funkcionális bizonyítékra is, ami alátámasztja a térben erősen korlátozott mGluR2 hatást. Tudtuk azonban, hogy az eddig bemutatott kísérleti elrendezésekkel nem lehet behatárolni a konduktancia nyitás helyét. Ehelyett egy új úton indultunk el, és azt kezdtük vizsgálni, hogy milyen hatása lehet egy térben behatárolt konduktancia nyitásnak a dendritből a sejttestbe betérjedő gyors membránpotenciál változásokra. A munkahipotézisünk azon a gondolaton alapult, hogy egy megnövekedett konduktancia állapot más módon befolyásolja a dendriten kiváltott potenciálváltozás sejttestben mérhető feszültségjelét akkor, ha feszültségjel a terjedése során áthalad a konduktancianyitás helyén, mint abban az esetben, ha a

terjedés során nem érinti a gátolt régiót. Ebben az esetben a konduktancianyítás helyét meghatározhatjuk egy olyan kísérlet segítségével, amiben tranziens membránpotenciál változásokat, például serkentő szinaptikus eseményeket váltunk ki ismert távolságra a sejttesttől, és összehasonlítjuk a sejttestre beérkező eseményeket kontroll körülmények között, illetve nyitott GIRK csatornák jelenlétében. Ha a csatornanyitás hatását ábrázoljuk a szinaptikus események eredési helyének függvényében, akkor a gátló hatás térbeli profilját kapjuk meg, és a hipotézisünk szerint térbeli profil alapján megbecsülhető a gátló hatás eredési helye. Például, ha a gátlás a sejttesten van, akkor hozzávetőlegesen ugyanolyan mértékben érint minden beérkező eseményt, ezért a gátlás térbeli profilja nagymértékben független lesz a kiváltott potenciál változás eredési helyétől. Ha a gátlás valahol a dendritfa közepén van, akkor a tőle proximálisan kiváltott eseményeken egyenletesen kisebb hatást fejt ki, mert egyik ilyen esemény sem haladt át a gátolt régió. Minél messzebb helyezkedik el a gátolt dendritszakasz a sejttesttől, annál kisebb lesz a szómához közel keletkezett eseményekre kifejtett hatása. A gátló hatás szintén egyenletes, de nagyobb mértékű lesz azokon az eseményeken, amik a gátlás helyétől disztálisan keletkeztek, mert minden ilyen eseménynek át kell haladnia a gátolt dendritszakazon. A gátló hatás térbeli profilját a gátlás helyén egy karakterisztikus töréspont fogja jellemezni. A gondolatmenet helyességét realisztikus modell-szemcsesejteket használva (3., 4. és 7. számú sejt a Schmidt-Hieber és mtsai által 2007-ben publikált szemcsesejt készletből^[46]) szimulációk segítségével vizsgáltuk meg (19.A Ábra). Ezek a szimulációk igazolták a feltevésünket, miszerint a gátló hatás térbeli profilja jelentős mértékben függ a gátlás helyétől, és rávilágítottak arra, hogy a mérhető paraméterek (csúcs, félérték-szélesség, görbe alatti terület) közül leginkább az események csúcsa érzékeny arra, hogy a potenciálváltozás áthalad-e a gátolt részen a terjedése során (19.B Ábra). Az események félérték-szélességére és a görbe alatti területére kifejtett hatást sokkal inkább befolyásolják a sejt általános membrántulajdonságaiban (a bemenő ellenállásban és a membrán időállandóban) bekövetkező változások ezért a gátlás hatásának térfüggése e paraméterek esetében nem bír különösebb prediktív erővel (19.C Ábra). Mivel az egyes paraméterek változása egyaránt függ a sejtmembrán tulajdonságaitól és a kinyitott konduktanciától, csökkenthetjük a sejtek közötti különbségből eredő variabilitást úgy, hogy a gátlás helyéről specifikus információt hordozó paramétert (változás a csúcspotenciálban)

normalizáljuk a globális hatásról információt hordozó paraméterrel (változás a görbe alatti területben). Ahogy láthatjuk, az így normalizált térbeli profil továbbra is érzékeny lesz a gátlás helyére.

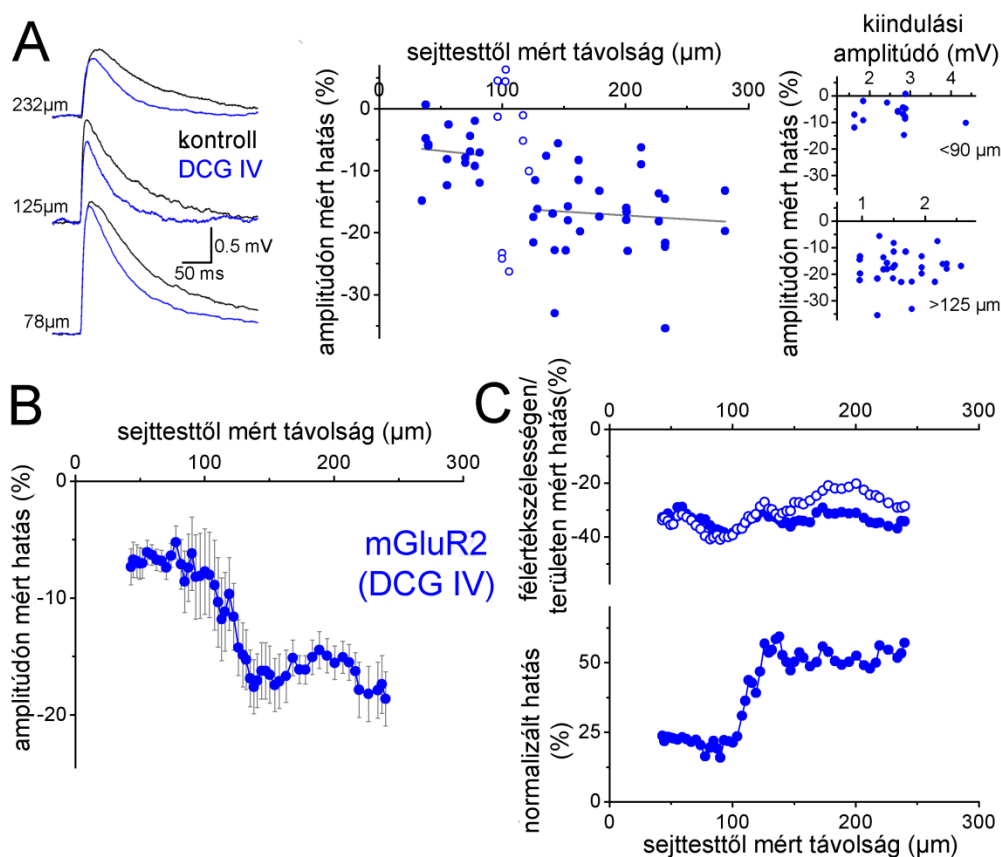


19.Ábra. A gátlás térbeli profilja kijelöli a gátlás eredési helyét

A, Bal oldalon a felhasznált modell-szemcses sejtek alakja és passzív tulajdonságai látható^[46]. Jobbra a vázlat a konduktancia vizsgált pozícióit mutatja a dendritek mentén. Az itt használt színek érvényes a grafikon többi paneljén is. Alatta a különböző távolságra kiváltott szimulált szinaptikus válaszok láthatók kontroll körülmények között (fekete), és a 80 μm távolságra aktivált gátló konduktancia jelenlétében. Az események mellett feltüntetett értékek az esemény eredési távolságát jelzik. B, A gátlás térbeli profilja az események amplitúdóját vizsgálva. Az x tengely az események eredési távolságát jelöli. C, *felül*: A gátlás térbeli profilja, az események görbe alatti területét (pontok) vagy a felérték-szélességét (körök) vizsgálva. *alul*: A csúcson mérhető hatás a területen mért hatással történő normalizálást követően.

A kísérlet megvalósításához szükségünk volt egy olyan módszerre, amivel gyors membránpotenciál változásokat tudunk létrehozni, nagy térbeli precizitás mellett. Ez megvalósítható a szemcses sejteket beidegző serkentő idegrostok pontos stimulálásával is,

azonban a szinaptikusan kiváltott eseményeket mégsem használhattunk a kísérlethez, mert az mGluII receptorok jelen vannak a perforáns pálya axonjain is, ahol hatékonyan gátolják a neurotranszmitter felszabadulást^[130]. Ehelyett a konfokális mérőrendszert használva MNI-glutamát fotolízissel váltottuk ki a gyors dendritikus potenciálváltozásokat. Ez a technika biztosította a szükséges térbeli precizitást és a segítségével kiküszöbölhettük a lehetséges preszinaptikus hatásokat is. Az elvezetések során tehát adott dendritikus pontokon glutamáterg potenciálváltozásokat generáltunk, és megmértük a sejttestbe terjedő jeleket kontroll körülmények között, illetve DCG IV jelenlétében is.



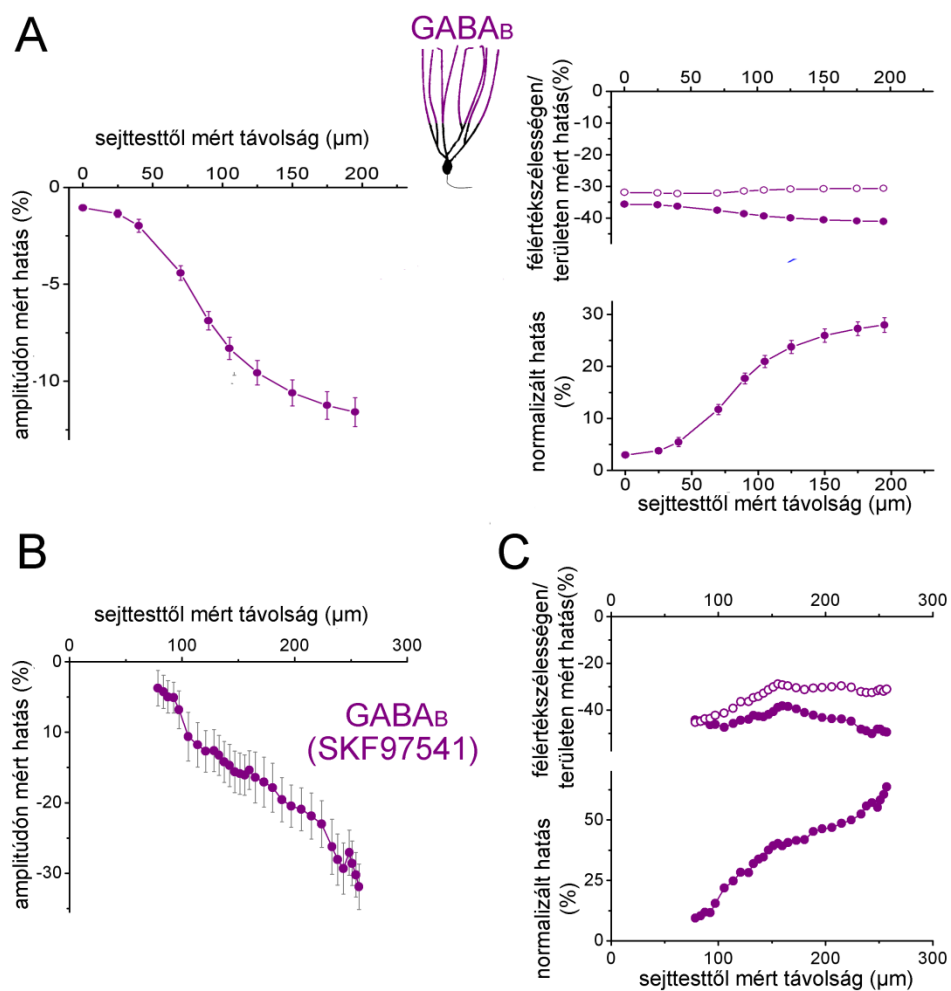
20.Ábra. Az mGluR2 aktiváció hatásának térbeli profilja

A, balra: Különböző távolságokra MNI-glutamát fotolízissel kiváltott események kontroll körülmények között (fekete), és DCG IV jelenlétében (kék). középen: A DCG IV hatása a kiváltott események amplitúdójára az események eredési helyének függvényében. jobbra: az eseményekre gyakorolt hatás mértéke független az események kiindulási amplitúdójától. B, A mGluR2 gátló hatásának térbeli profilja az események amplitúdóját vizsgálva. C, lent: Az mGluR2 hatás térbeli profilja az események görbe alatti területét (pontok) vagy a félérték-szélességét (körök) vizsgálva. lent: A csúcson mérhető hatás a területen mért hatással történő normalizálást követően.

A kísérlet végén a konfokális képalkotás segítségével aztán meg tudtuk határozni a glutamát felszabadítás pontos dendritikus távolságát. A mérések segítségével elkészítettük az mGluR2-kapcsolt GIRK csatornanyitás hatásának térbeli profilját (20. Ábra, 35 sejtből mért 57 dendritikus pozíció alapján). Az eredményeink azt mutatták, hogy a DCG IV bemosás csak kismértékben érintette a sejttesthez közeli dendritikus régiókból eredő események amplitúdóját (a proximális 90 μm -en belül a mért hatás átlagosan $-6,9 \pm 1,0 \%$ volt, 20.B Ábra), míg a távolabbi dendritszakaszokon (125 μm -nél távolabbról) eredő eseményeken sokkal nagyobb változásokat tapasztaltunk (az átlagos hatás ebben az esetben $-17 \pm 1,2 \%$ volt). A térbeli profilnak három lényeges jellemzője van: a kismértékű proximális hatás, az éles váltás 90-125 μm -es távolság között, és a nagymértékű, de egyenletes hatás a teljes disztális dendritszakaszon. Az éles átmenet és az egyenletes disztális hatás még szembetűnőbb akkor, ha a globális hatásoktól megtisztított normalizált térbeli profilt vizsgáljuk (20.C Ábra). Ezek a tulajdonságok együttesen egy olyan GIRK csatornanyitásra mutatnak, ami térben erősen lokalizált, és nem a sejttesttől, hanem a proximális dendritekből ered, valahol a sejttesttől mért 125 μm -es távolságon belül. A DCG IV nem befolyásolta az eseményeket akkor, ha tertiapin-Q jelenlétében alkalmaztuk (hatás az események csúcsán: $-2,8 \pm 1,4 \%$, hatás az események görbe alatti területén: $-3,1 \pm 1\%$; $n=6$ dendritikus pozíció, 97-158 μm -re a sejttesttől), ami megerősítette azt, hogy a DCG IV bemosásakor tapasztalt térfüggő különbségeket valóban GIRK csatornák kinyitása okozta.

Kontrollként egy másik kísérletben a GABA_B receptorokhoz kapcsolt GIRK csatorna aktiváció hatásának térbeli profilját is megvizsgáltuk. Az mGluR2 hatásához hasonlóan szintén a GIRK csatornák tekinthetők a dendritikusan elhelyezkedő GABA_B receptorok legáltalánosabb effektorának^[187]. Tudjuk azonban, hogy GABA_B receptorok a szemcsesejt dendriteken sokkal egyenletesebb eloszlást mutatnak^[188], aminek következtében az általuk aktivált kimenő áram is homogén ezeken a dendriteken^[189]. Ezen ismeretek alapján azt gondoltuk, hogy a GABA_B receptor farmakológiai aktiválását felhasználhatjuk pozitív kontrollként a kísérleti elrendezésünk érzékenységének bizonyítására. A modellezésünk szerint ugyanis ilyen receptoreloszlás mellett a GABA_B receptorhatás térbeli profiljának különböznie kell az mGluR2-mediált gátlás profiljától (21.A Ábra). Egyenletes mennyiségű gátló konduktancia esetén a

modell térbeli profilja töréspont nélküli egyenletesen növekvő hatást jósolt, amelyben minél távolabbról érkezik egy esemény annál nagyobb lesz rajta a gátlás hatása. A kísérletek során az SKF97541 nevű agonista segítségével aktiváltuk $GABA_B$ receptorokat és elkészítettük a gátlás térbeli profilját (21.B Ábra). A modell jóslatával összhangban, SKF97541 bemosása esetén az események csúcsára kifejtett hatás egyenletesen nőtt a dendritikus távolság függvényében és egyenletes növekedés jellemezte a normalizált térbeli profilt is.



21.Ábra. A $GABA_B$ receptorhatásának térbeli profilja

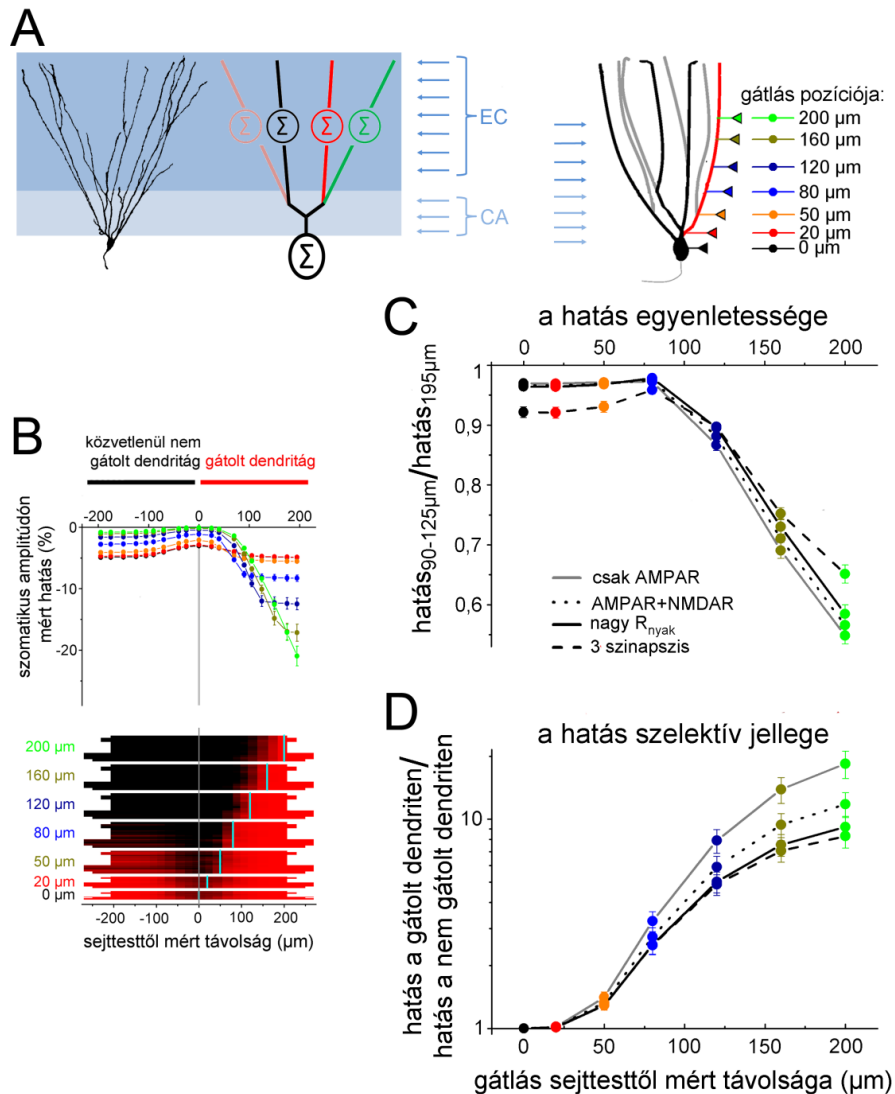
A, Térben egyenletes eloszlású gátló konduktancia jelenlétének modellezett hatása. *balra*: A gátlás térbeli profilja az események amplitúdóját vizsgálva. *jobbra,fent*: A gátlás térbeli profilja, az események görbe alatti területét (pontok) vagy a félérték-szélességét (körök) vizsgálva. *jobbra,lent*: A csúcson mérhető hatás a területen mért hatással történő normalizálást követően. B, A $GABA_B$ receptor agonista SKF97541 gátló hatásának térbeli profilja az események amplitúdóját vizsgálva. C, *fent*: A $GABA_B$ hatás térbeli profilja az események görbe alatti területét (pontok) vagy a félérték-szélességét (körök) vizsgálva. *lent*: A csúcson mérhető hatás a területen mért hatással történő normalizálást követően.

A kapott kísérletes adatok tehát megfelelnek annak a térbeli profilnak, amit egy egyenletes dendritikus eloszlást mutató gátlás esetén várnánk, ami megerősített bennünket abban, hogy a gátló konduktancia helyének funkcionális feltérképezésére kidolgozott eljárásunk megfelelően érzékeny módszer a kérdés megválaszolására. Kollaborátoraink anatómiai adatai, illetve a saját funkcionális vizsgálómódszerünk alapján tehát azt a következtetést vontuk le, hogy az mGluR2 csak egy szűk dendritszakaszon aktiválja a GIRK csatornákat a szemcsesejteken, 90-125 μm -re a sejttesttől.

4.6. A gátlás dendritikus helyzete biztosítja az egyes dendritek szelektív és egyenletes szabályozását

Az eddigi kísérletek meggyőztek minket arról, hogy a dendritikusan elhelyezkedő mGluR2 aktiválása egy gátló konduktancia megjelenéséhez vezet. De milyen élettani szerepe lehet az általunk itt leírt gátló mechanizmusnak? A dendriten kinyíló káliumcsatornák térbeli helyzete meghatározza a gátló hatás kiterjedését és ez által a gátlás szinaptikus jelfeldolgozásban betöltött szerepét is. A lehetséges funkcionális jelentőség megértéséhez tehát arra kerestük a választ, hogy miért lehet hasznos a szemcsesejtek működése szempontjából egy térben erősen lokalizált gátlás jelenléte, vagyis miért különleges az a szűk dendritikus régió, amire a sejtek az általunk vizsgált gátló jelátviteli rendszert korlátozzák? A kérdések megválaszolására irányuló gondolatmenetünk a szemcsesejtek anatómiai felépítéséből indult ki. A szemcsesejtek esetében a dendritikus elágazódási pontok zöme a sejttest közelében van, vagyis a dendritfa távolabbi részén nincsenek, vagy ritkák az elágazások^[43]. Ha figyelembe vesszük az alaktani sajátosságok mellett a szemcsesejtek elektrotónusos tulajdonságait is, akkor a disztális dendritágakat lényegében önálló integratív egységnek tekinthetjük. Érdekes módon ezek az önálló dendritikus egységek azt a régiót fogják át, ahol az entorhinális kéregből érkező serkentő idegrostok végződnek (str. moleculare külső kétharmada, 22.A Ábra). Számítógépes modellezés segítségével azt vizsgáltuk meg, hogy a gátlás térbeli helyzete milyen hatással lehet ezeknek az integratív dendrit-egységeknek a működésére. Az itt használt modell nagymértékben hasonló volt az előző részben bemutatott esethez, kivéve azt, hogy ebben az esetben mindig csak egyetlen dendritágon helyeztünk el egy állandó nagyságú (1nS) gátló konduktanciát. Azért így

használtuk a modellt, mert úgy gondoltuk, hogy a farmakológiai bemosással ellentétben fiziológiai körülmények között valószerűtlen dolog, hogy egyszerre az összes lehetséges helyen kinyíljanak az mGluR2-kapcsolt GIRK csatornák. Sokkal valószínűbb, hogy egyidejűleg csak egy-egy dendritág mentén történik csatornanyitás. Mivel most a sejtek feltételezett élettani viselkedését szerettük volna jobban megérteni, nem pedig egy kísérleti elrendezés várható eredményét vizsgáltuk, ezért a modell bizonyos értékeit (a modellsejt passzív paramétereit és a szinaptikus konduktancia kinetikai jellemzőit) úgy állítottuk be, hogy jobban közelítsen a valós élettani helyzetben várható értékekhez. Először azt kérdeztük meg a modelltől, hogy a gátlás helyzete milyen hatással lesz a dendrit különböző pontjaira érkező szinaptikus eseményekre. A kérdés tehát arra irányult, hogy hogyan befolyásolja egy ilyen integratív dendritegység homogenitását a gátlás térbeli helyzete. Ahogy a 22. Ábra B paneljén látható, minél közelebb helyezkedik el a gátlás a sejttesthez, annál egyenletesebb hatást fejt ki a sejttestbe betérjedő eseményekre, függetlenül attól, hogy melyik dendritszakaszra érkezett a szinaptikus esemény. A dendritág sejttesthez közelebbi részére érkező események gátlása (hatás₉₀₋₁₂₅), és a legtávolabbi eseményen kifejtett gátló hatás (hatás₁₉₅) hányadosának segítségével számszerűsíthetjük a gátlás egyenletességének mértékét (22.C Ábra). Ezt a mérőszámot használva egyhez közeli értéket kapunk azokban az esetekben, ha a gátlás minden sejttestbe betérjedő eseményen nagyjából ugyanakkora mértékű (ez tapasztalható proximálisan elhelyezkedő gátlás esetén). Ezzel szemben a legtávolabbi elhelyezkedő gátlás esetén nincs olyan dendritszakasz a gátolt dendriten, amin a hatás egyenletes lenne, mert a távolabbi dendritszakaszra érkező eseményeken mindig sokkal nagyobb hatást fejt ki a gátlás, mint a sejttesthez közelebbi eseményeken (20.B és C Ábra). Ilyen esetben az egyenletesség mérőszáma egynél lényegesen kisebb érték lesz.



22.Ábra. Az elhelyezkedéséből fakadóan az *mGluR2* gátló hatása szelektív és egyenletes szabályozást biztosít a dendritágon belül

A, balra: A szemsesejteken végződő serkentő szinaptikus kapcsolatok térbeli elhelyezkedése. A sötétkék terület a perforáns pályán keresztül érkező entorhinális kapcsolatok (EC) helye. A világoskék régió jelzi a mohasejtek felől érkező kommissurális/asszociációs kapcsolatok (CA) végződési helyét. Mellette a szemsesejt integratív viselkedésének dendrit-egységeken alapuló konceptuális modellje. Jobbra a modellezés során használt elrendezés vázlata látható. Minden modell sejt egyetlen dendritágán helyeztük el a gátló konduktanciát, a színekkel bemutatott szomatikus távolságban. Azt vizsgáltuk meg, hogy az adott távolságban elhelyezett gátlás milyen hatással volt a közvetlenül gátolt dendritágra (piros dendrit) és a nem gátolt szomszédos dendritekre (fekete dendritek) érkező eseményekre. *B, fent:* A sejttestbe érkező események amplitúdóján kifejtett hatás a közvetlenül gátolt dendriten (az x tengely pozitív tartománya) és a közvetlenül nem gátolt dendritek esetén (az x tengely negatív tartománya). *lent:* Az eseményeken kifejtett hatás az összes vizsgált dendriten bemutatva. Ebben az esetben minden sor egyetlen dendritet jelöl. Az x tengely pozitív tartományában a konduktancia közvetlenül a dendriten helyezkedett el, míg negatív x érték esetén nem volt közvetlenül gátolva a dendrit. Ebben az esetben a gátlás hatását a 195 μm -re érkezett eseményen kifejtett hatáshoz képest mutatjuk be a fekete/vörös színek segítségével. A vörös események a referenciaponthoz hasonlóan hatékony gátlást jelentenek, míg minél kisebb a relatív hatás, annál közelebb áll a feketehez. *C,* A gátlás egyenletessége és a gátlás térbeli helyzete között fennálló viszony. *D,* A gátlás szelektív jellege és a gátlás térbeli helyzete között fennálló viszony.

Nem csak az adott dendritágon belüli hatás függhet a gátlás elhelyezkedésétől, hanem az is, hogy az egyes dendritágak tekintetében mennyire lesz szelektív a gátlás. Míg a sejtesten elhelyezett gátlás minden egyes dendritet ugyanolyan mértékben befolyásol, addig egy adott dendrit disztális szakaszán elhelyezett gátlás a nem közvetlenül gátolt dendriteket alig érinti (22.B és D Ábra). A gátlás szelektív hatásának számszerűsítéséhez a gátolt és a közvetlenül nem gátolt dendriten kifejtett átlagos hatás arányát vizsgáltuk meg. A modellünk alapján minél távolabb helyeztük el a konduktanciát, annál nagyobb lett a hatás a gátolt dendriten, és annál kevésbé érintette a közvetlenül nem gátolt dendriteket, vagyis a szelektivitás monoton nő a gátlás helyzetének szomatikus távolságával. Ahogy a 22. Ábra D paneljén láthatjuk, jelentős szelektivitásról beszélhetünk azokban az esetekben, ha a gátlás 85 μm -nél távolabb helyezkedik el a dendriten. Azt is megvizsgáltuk, hogy milyen hatással van a modell eredményeire, ha AMPA típusú receptorok mellett NMDA receptorok is aktiválódnak, illetve ha a szinapszist hordozó dendrittüske nyakának ellenállását a kísérletes úton meghatározott nagy ellenállásértéknek megfelelően állítjuk be (500 $\text{M}\Omega$,^[167]). A modellezés során kitértünk arra az esetre is, amikor nem egy, hanem három, térben egymáshoz közel (<10 μm) elhelyezkedő AMPA/NMDA szinapszis szimultán aktivációja jelentette a bemenetet. A tapasztalatunk szerint a növekvő NMDA receptor által közvetített komponens miatt lassulhat a szinaptikus potenciálválasz, ami a független szabályozás ellen hat.

Most gondoljunk arra, hogy milyennek kell lennie egy olyan szabályozó mechanizmusnak, ami az egyes dendritágot, mint integratív egységet kezeli. Az ideális szabályozó mechanizmus maximális egyenletességre és szelektivitásra törekszik, mert nem változtathatja meg az egységen belül az egyes dendritszakaszok súlyát, vagyis egyenletesen kell gátolnia az egész egységet, miközben az adott dendritágot a sejt többi részétől függetlenül tudja szabályozni. Láthatjuk azonban, hogy a gátlás térbeli helyzetét tekintve az optimális feltételek kölcsönösen kizárják egymást. A szomatikus gátlás jelenti a legnagyobb fokú egyenletességet, de ebben az esetben megszűnik a szelektivitás, míg egy távoli dendriten ható gátló mechanizmus a lehető legszelektívebb hatást fejt ki, de már nem beszélhetünk egyenletes szabályozásról. Mivel mindkét funkció alapvető jelentőségű az integratív egység szabályozása szempontjából, ezért az ideális gátló mechanizmus helye valahol a két pont között van. Ha megvizsgáljuk az

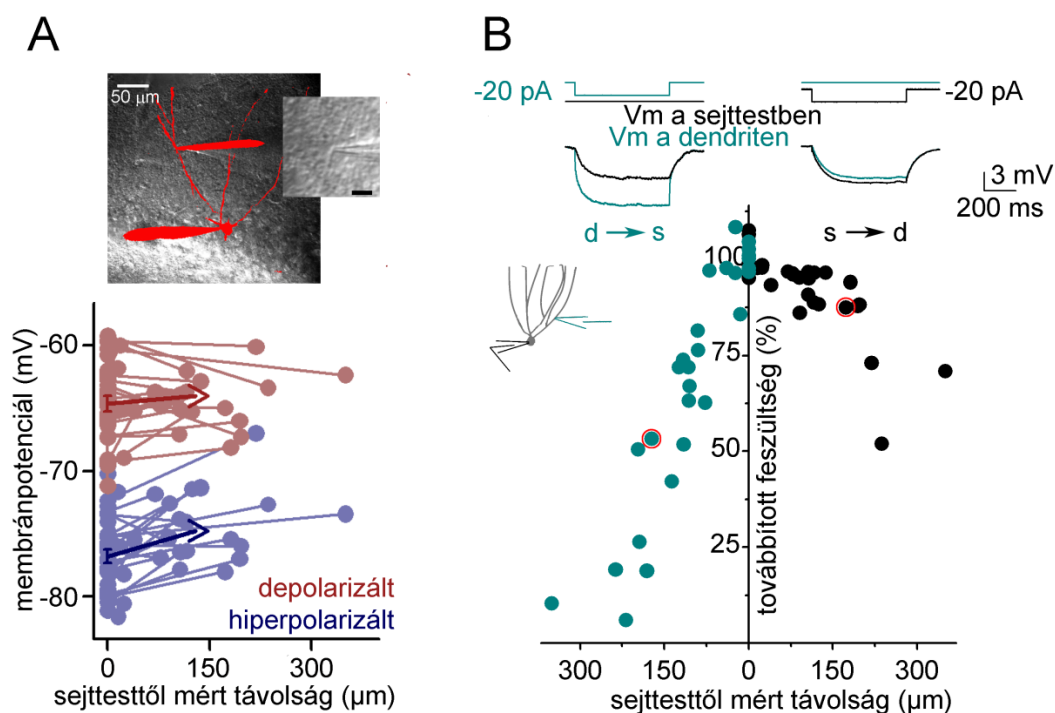
mGluR2 hatás (80-120 μm -re elhelyezkedő gátlás) dendritikus pozícióját, akkor azt láthatjuk, hogy ez a távolság már kellő szelektivitást biztosít, mindeközben nem sérül az egyenletesség követelménye sem. Tehát a vizsgált mGluR2 hatás térbeli helyzete optimális a dendritegységek független, de egyenletes szabályozásához.

5. EREDMÉNYEK II

5.1. A sejttest membránpotenciálja távolságfüggő módon befolyásolja a bAP alakját

Ha a visszaterjedő akciós potenciálok analóg információt is kódolnak a sejt általános állapotáról, akkor annak jelentkeznie kell az akciós potenciál alakjában is. Első kérdésként tehát azt vizsgáltuk meg, hogy hogyan változik a bAP-k alakja akkor, ha megváltoztatjuk a sejttest membránpotenciálját. A kérdés megválaszolásához kételektródás egyidejű szomato-dendritikus elvezetésekkel végeztünk a szemcsesejtekből. Ez a kísérleti elrendezés biztosította számunkra, hogy kontrollálni tudjuk a sejttest membránpotenciálját, ki tudjunk váltani a sejttest felől egy akciós potenciált, és ezzel egyidejűleg monitorozni tudjuk a dendritbe betérjedő bAP-k alakját is. Maga a kísérlet úgy zajlott, hogy először a DIC optika segítségével stabil elektrofiziológiai elvezetést alakítottunk ki egy dendriten. A kísérletek során használt intracelluláris oldat fluoreszcens jelölőfestéket is tartalmazott, (Alexa Fluor 594, 20 μM), melynek segítségével viszonylag rövid dialízis után a konfokális képalkotást használva azonosítani tudtuk, hogy melyik sejttest tartozik az elvezetett dendrithez. Ezt követően az azonosított sejttesten is egészsesjtes elvezetési konfigurációt alakítottunk ki.

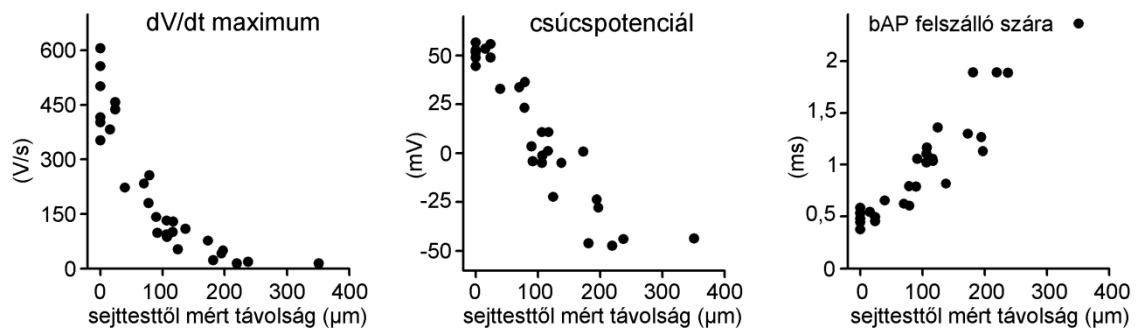
Elsőként megállapítottuk, hogy a sejttesten létrehozott lassú, időtől független membránpotenciál változások nagy hatékonysággal eléri a dendritek legtávolabbi régióit is (23.A Ábra). A dendritbe irányuló hatékony feszültségterjedés összhangban áll más laborok korábbi megfigyeléseivel^[46,58]. A jelenség hátterében valószínűleg a szemcsesejt dendritek nagymértékben passzív viselkedése áll, ami a dendritek csúcsa felé folyamatosan növekvő lokális bemenő ellenállást eredményez (7.A Ábra). Ez a fajta biofizikai viselkedés aszimmetrikus feszültségterjedést eredményez, ami azt jelenti, hogy a sejttestből a dendritek vége felé a feszültségjelek terjedése szinte veszteség nélküli, míg a dendriten kialakult jelek nagymértékben csillapítva érik el a sejttestet (23.B Ábra).



23.Ábra. A lassú szomatikus feszültségjelek elérik a dendrit távoli pontjait is

A, *lent*: Egyidejűleg két ponton elvezetett szemcsesejt egymásra vetített DIC és konfokális képe. A kisebbik képen az elvezetett dendrit felnagyított DIC képe látható. *lent*: A sejtest membránpotenciál változásainak terjedése a dendritekbe. Az összekötött pontok az egy kísérlethez tartozó adatpároknak felelnek meg. A nyilak a két állapothoz tartozó átlagvektorok (depolarizált állapot-vörös, hiperpolarizált állapot-kék). B, A lassú, állandó állapotot elérő feszültségjelek aszimmetrikus terjedési profilja. A bemutatott kísérletben a sejtest (fekete) és a dendrit (zöld) feszültségválaszát láthatjuk akkor, ha a dendritbe injektáltuk az áramot (balra) illetve szomatikus áraminjekció esetén (jobbra). A grafikonon a feszültségjelek lecsengését láthatjuk a sejtest távolságának függvényében. Pirossal bekarikáztuk a bemutatott kísérlethez tartozó adatpárt.

A lassú események viselkedésével szemben a bAP dendritikus terjedését erős lecsengés jellemzi, ami a szemcsesejtek passzív elektrotónusos tulajdonságai mellett a nátrium csatornák kismértékű dendritikus jelenlétével magyarázható^[58]. A méréseink során mi is azt tapasztaltuk, hogy a kezdetben gyors, nagy amplitúdójú bAP kifelé terjedve lelassult, amit jelentős amplitúdó csökkenés kísért.

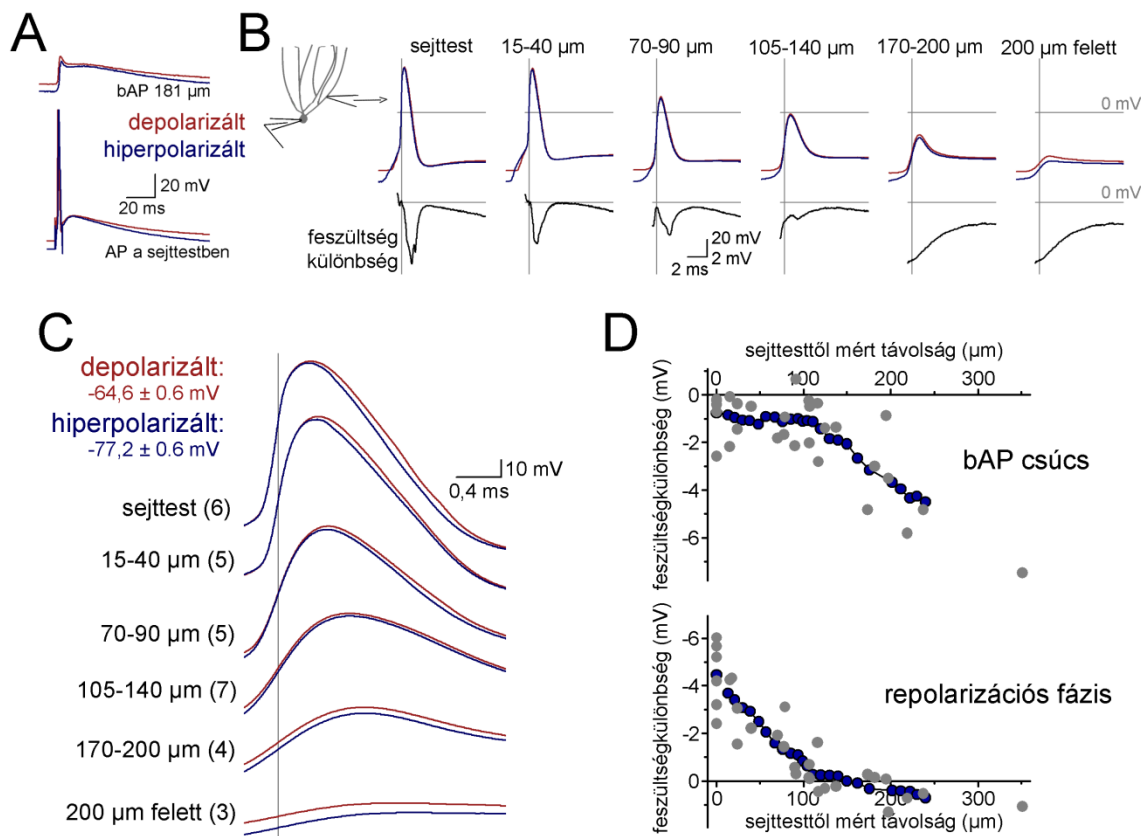


24.Ábra. A bAP alakjának változása a dendrit mentén

A bAP tulajdonságaiban bekövetkező változások a sejttesttől mért távolság függvényében.

Ahogy a 24. Ábrán megfigyelhető, a 100 μm-nél távolabbi dendritszakaszon a lokális bAP csúcsa már 0 mV közelében van, és folyamatosan csökken tovább haladva kifelé a dendriten.

A bAP alakjának állapotfüggését úgy vizsgáltuk, hogy akciós potenciálokat váltottunk ki a sejttesten, hol kissé depolarizált ($-64,6 \pm 0,6$ mV), hol pedig kismértékben hiperpolarizált ($-77,2 \pm 0,6$ mV) membránpotenciálról (25.A Ábra). Fontos megemlíteni, hogy az általunk használt 10-15 mV nagyságú feszültségváltozás azt a tartományt öleli fel, amibe a szemcses sejtek membránpotenciálja általában esik^[59,61,62] az *in vivo* méréseknek alapján.

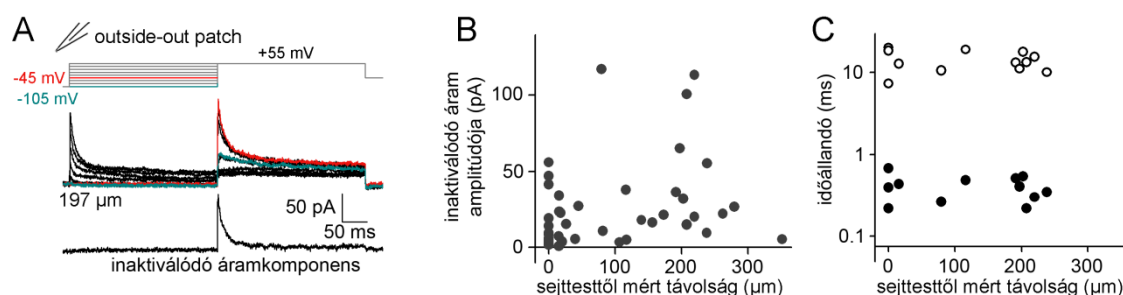


25.Ábra. A sejtestben kialakuló membránpotenciál változások távolságfüggő hatása a bAP alakjára

A, Kételektrodás szomato-dendritikus elvezetés, amiben rövid áraminjekcióval akciós potenciálokat váltottunk ki a sejtestben (alul), miközben kissé depolarizált (vörös) vagy hiperpolarizált (kék) membránpotenciálon tartottuk a sejtet. A másik pipettát nem használtuk áraminjekcióra, hanem ezen keresztül regisztráltuk a bAP alakját (felül). B, A különböző távolságra mért átlagos bAP párok. Az alsó, fekete jelek a depolarizált és a hiperpolarizált bAP alak közötti feszültségkülönbséget mutatják. C, az átlagos bAP párok egy rövidebb időskálán bemutatva. D, A bAP csúcspotenciáljában illetve a repolarizációban mért hatás a sejtest távolságának függvényében. Szürke pontok jelölik az egyedi adatpontokat, míg kékben a 9 pont alapján számolt csúszo átlag látható.

Az így kiváltott bAP párok (depolarizált és hiperpolarizált) tulajdonságait vizsgálva azt figyeltük meg, hogy a sejtest feszültségváltozása távolságfüggő módon befolyásolja a bAP alakját. A proximális dendritszakaszokon a bAP-k felszálló szakasza és a csúcsa független volt a kiindulási membránpotenciáltól, a repolarizáció fázisa azonban felgyorsult olyankor, ha a bAP-t hiperpolarizáltabb membránpotenciálról váltottuk ki (25.B-D Ábra). Ezzel szemben a disztálisabb dendritszakaszokon azt figyeltük meg, hogy a bAP-k csúcsa mutatott jelentős membránpotenciál függést (25. B-D Ábra). Az eltérő moduláció háttérében valószínűleg két független mechanizmus áll. A proximális

dendriteken mért gyorsabb repolarizációt feltehetőleg a periszomatikus régióban jelen levő tranzien, inaktíváló káliumkonduktancia, úgynevezett A-típusú káliumáram jelenléte okozza. A sejttestből kimérhető káliumáramok egy jelentős része ugyanis feszültségfüggő inaktívációt mutat, ami éppen ilyen módon fogja befolyásolni az akciós potenciál alakját^[89], vagyis hiperpolarizáltabb membránpotenciál mellett nő ezeknek a csatornáknak az elérhetősége, aminek következtében több káliumcsatorna tud kinyitni az akciós potenciál leszálló fázisában, ami gyorsabb repolarizációt eredményez. De vajon mi az oka annak, hogy a disztális dendriteken másképp változik a bAP alakja? Elméletben lehetséges, hogy ebben a régióban nincsenek is jelen I_A áram kialakításáért felelős káliumcsatornák, emiatt nem változik érdemben a repolarizáció. Hogy ezt a lehetőséget megvizsgáljuk, outside-out patch elvezetések segítségével teszteltük az I_A áramok jelenlétét a dendritek mentén (26. Ábra).



26.Ábra. Az inaktíváló káliumcsatornák mindenhol jelen vannak a dendriten

A, A káliumáramok méréséhez használt protokoll (*fent*), és a káliumáramok, amiket egy dendritből izolált membrándarabon mértünk (*középen*). *alul*: Az ionáram inaktíváló komponense. B, Az inaktíváló áramkomponens nagysága a sejttesttől mért távolság függvényében. C, Az inaktíváló káliumáram kinetikájának távolságfüggése. A fekete pontok az aktiváció időállandóját, míg a körök az inaktívációs időállandó értékét jelzik.

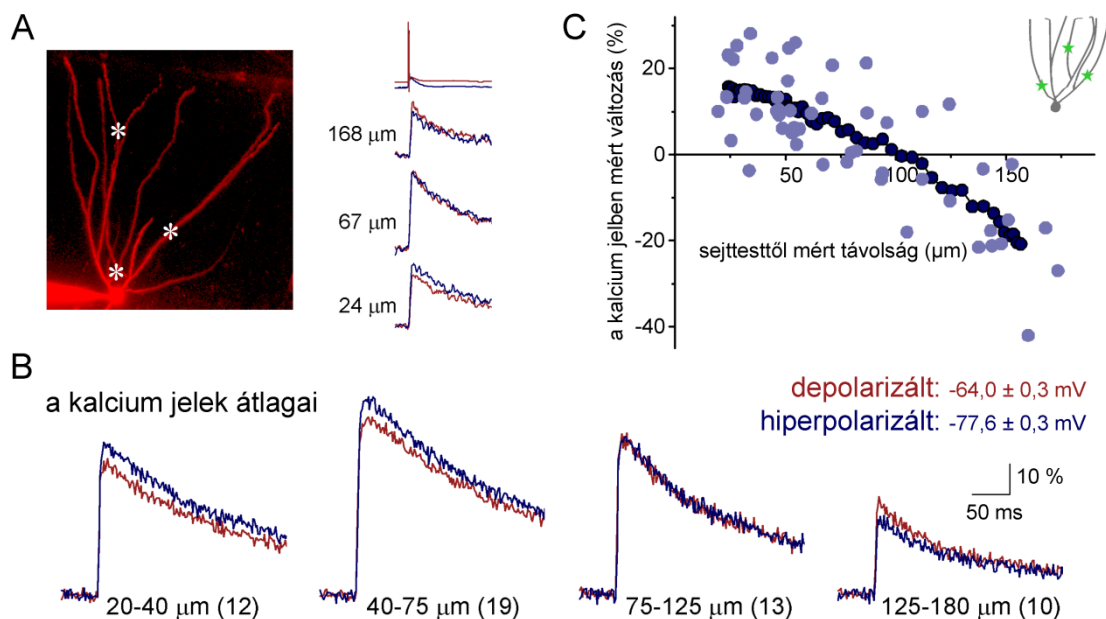
A méréseink azt mutatták, hogy az I_A áram a mennyiségét és tulajdonságait tekintve egyenletes a dendritek mentén, tehát az áram hiánya nem magyarázhatja a megfigyelt különbséget. A válasz sokkal inkább a bAP-k erőteljesen csökkenő csúcspotenciáljában keresendő. Feltehetőleg arról van szó, hogy ebben a régióban már annyira kicsi a bAP amplitúdója (lásd 24. Ábra), hogy el sem éri ezeknek a káliumcsatornáknak az aktivációs küszöbét, ezért nincs hatással a hiperpolarizáltabb membránpotenciál a repolarizáció fázisára. Mindemellett ebben a dendritikus régióban a kismennyiségű nátriumcsatorna már nem képes visszakompenzálni a kiindulási membránpotenciál

különbséget ezért a bAP csúcsa nagymértékben függ a sejttest membránpotenciál változásaitól.

Összefoglalásképp tehát elmondható, hogy a sejttest állapotának analóg információtartalma távolságfüggő módon tükröződik vissza a bAP-k alakjában. Míg a proximális dendritszakaszokon a repolarizáció fázisa képes analóg többletinformációt hordozni, addig a disztális régióban a bAP csúcsa kódol hasonló tartalmat.

5.2. A távolságfüggő kétirányú moduláltság megmutatkozik a bAP-hoz köthető kalciumjelekben is

A bAP-ban kódolt információtartalmat a depolarizációhoz kapcsolódó kalcium beáramlás és a sejten belül ennek hatására kialakuló átmeneti kalcium koncentrációnövekedés közvetítheti a különféle dendritikus folyamatok felé. A következő kísérletben arra voltunk kíváncsiak, hogy a bAP alakjában tárolt analóg információtartalom megjelenik-e a bAP-hoz kötött kalciumbeáramlás szintjén is. A kérdés megválaszolásához olyan rendszerre volt szükségünk, melyben az elektrofiziológiai méréssel egyidejűleg mérni tudtuk a dendrit mentén a bAP-hoz köthető kalciumjeleket is. Ehhez az elvezetett sejteket egy kalcium érzékeny fluoreszcens festékkel (Fluo-5F) is feltöltöttük, és a fluoreszcens jeleket mértük konfokális képalkotás segítségével (27. Ábra). A használt konfokális technika előnye, a nagy térbeli felbontása, ami fontos követelmény egy távolságfüggő változás vizsgálata során. Az intracelluláris oldat ebben az esetben is tartalmazott Alexa Fluor 594-et is, amit a képalkotáshoz megfelelő dendritszakaszok kiválasztásához, illetve a sejttest és a mért dendritszakasz közötti távolság meghatározásához használtunk. A kísérlet során egészséjtes elvezetési konfigurációt alakítottunk ki a fent említett intracelluláris oldatot használva, majd vártunk legalább fél órát, hogy legyen ideje a festékeknek a diffúzióra és az egyensúlyi koncentráció elérésére. Ezt követően kezdtük meg a tényleges kísérletet, mely abból állt, hogy váltakozva, hol depolarizáltabb ($64,3 \pm 0,3$ mV), hol pedig hiperpolarizáltabb ($-77,6 \pm 0,3$ mV) állapotból kiindulva akciós potenciálokat váltottunk ki a sejttestből, miközben a dendrit adott pontján mértük a bAP hatására kialakuló fluoreszcens kalciumjeleket. Az általunk létrehozott membránpotenciál különbség nem okozott mérhető különbséget a fluoreszcencia alapvonalában (0,8%, $p=0,17$, $n=54$ dendritikus pont, t-teszt).



27.Ábra. *A bAP-t kísérő kalciumjelek távolságfüggő változásai*

A, Pipettán keresztül feltöltött és Alexa Fluor 594 segítségével láthatóvá tett szemcsesejt. A kalciumjelek méréséhez a Fluo5-F kalcium indikátort használtuk. Csillagok jelzik a kalciumjelek (Fluo-5F jel) mérési helyét a dendritek mentén. Jobbra a kísérletben mért kalciumjel párok láthatók. B, Különböző távolságra mért átlagos depolarizált és hiperpolarizált kalciumjel párok. C, A kalciumjelben tapasztalt változások távolságfüggése. Világoskék pontok jelölik az egyedi adatpontokat, míg sötétkékben a 13 pont alapján számolt csúszó átlag látható.

A kísérletek során azt tapasztaltuk, hogy a hiperpolarizáció a sejttest távolságától függően eltérő módon befolyásolta a dendritikus kalcium jeleket (27.B és C Ábra). A sejttest közelében, 75 μm -es távolságon belül, a hiperpolarizáltabb AP kalcium jelei nagyobbak voltak, mint a depolarizált esetben mérhető jelek ($12,5 \pm 1,5$ %-os növekedés, $p=2,5 \cdot 10^{-9}$, $n=31$ dendritikus pont, t-teszt). Ezzel szemben a hiperpolarizáció a távoli dendritszakaszokon éppen ellentétes hatást fejtett ki a kalciumjelekre itt ugyanis a hiperpolarizáltabb állapot a kalcium jelek jelentős csökkenéséhez vezetett (120 μm -es távolságon túl $15,6 \pm 3,9$ %-os csökkenés, $p=0,0022$, $n=12$ dendritikus pont, t-teszt).

A kapott eredményekből arra következtettünk, hogy a sejttest állapotának analóg információtartalma nemcsak a bAP-k alakját képes befolyásolni a szemcsesejtekben, de

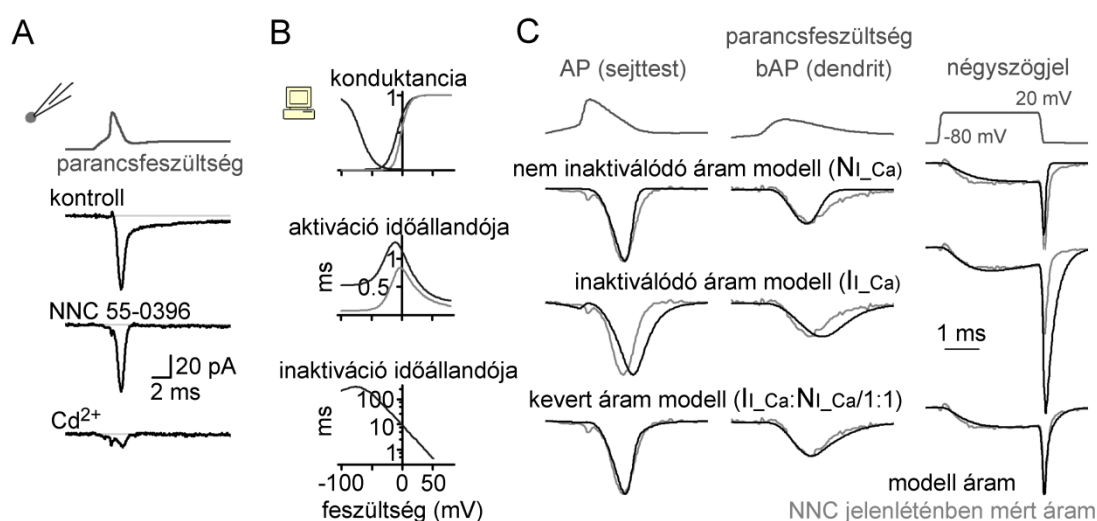
a hozzájuk kapcsolódó dendritikus kalciumjeleket is. Ugyanakkor a hatás nem egységes a dendrit mentén, mivel a dendritikus elhelyezkedés függvényében kétirányú modulációt figyeltünk meg.

5.3. Modell-áramok építése a bAP-hoz kötődő kalcium beáramlás vizsgálatához

Az eddigi eredményeink alapján tehát tudjuk, hogy a dendritekben zajló információfeldolgozásban központi szerepet játszó kalcium jelátvitel képes közvetíteni a bAP alakjában távolságfüggő módon kódolt analóg információt. Következő lépésként arra voltunk kíváncsiak, hogy milyen mechanizmus vagy mechanizmusok kapcsolják össze a bAP feszültségjelében mérhető változásokat a kalcium beáramlásban mérhető különbségekkel.

A kérdés tisztázásához újra a számítógépes modellezést hívtuk segítségül, amihez első lépésként kalcium áram modellek sorozatát hoztuk létre. Azt szerettük volna, ha a használt ionáram-modellek viselkedése a lehető legnagyobb mértékben hasonlítson azokra a kalciumáramokra, melyek a mi elvezetési körülményeink között a szemcsesejt dendriteket jellemezhetik, ezért úgy döntöttünk, hogy a használt modell-áramok viselkedését a szemcsesejtekben mérhető valós kalciumáramoknak megfelelően állítjuk be. Az ionáram modellek paramétereinek finomhangolása nagyszámú csatorna működésén alapuló, makroszkópikus áramméréseket igényelt. A dendritikus folyamatok modellezéséhez közvetlenül a dendritből mért kalcium áramok lettek volna a legalkalmasabbak, sajnos azonban a kísérleti elrendezésből fakadó nagy soros ellenállás nem teszi lehetővé a kinetikai vizsgálatokhoz szükséges minőségű gyors és pontos feszültségkontrollt ezekben az elvezetésekben. Egy másik alternatíva az outside-out patch preparátumok használata lett volna (a már bemutatott I_A mérésekhez hasonlóan), azonban ezt a lehetőséget is elvetettük, elsősorban azért, mert a kalciumcsatornák sűrűsége a dendriten nem eléggé nagy ahhoz, hogy megfelelően jó jel/zaj viszonyt biztosít, nagy ionáramot tudjunk mérni a kiszakított membrándarabokon. Végül a modellek építése során szemcsesejtből húzott nukleált-patch preparátumokat használtunk a farmakológiailag izolált kalcium áramok méréséhez (28.A Ábra). Ez az elrendezés kellően jól mérhető kalciumáramokat eredményezett, optimális feszültség kontroll mellett. Az egyedüli hátránya az volt, hogy a kísérlet jellegéből adódóan csak a

sejttesten is jelen levő csatornapopuláció viselkedéséről nyújt információt. Alapvetően háromféle, egymástól jól elkülöníthető kalciumáramot tudunk kimérni ezeken a preparátumokon. A legszembetűnőbb komponens egy lassú kinetikájú, inaktiválódó áram, melyek a T típusú kalciumcsatorna család jellegzetes tulajdonságai (28.A Ábra, [190]). Ez az áramkomponens nem volt megfigyelhető azokban a mérésekben, ahol T-típusú kalciumcsatorna blokkolót (NNC-55-0396, 10 μM) alkalmaztunk. Biztosan tudjuk tehát, hogy az alacsony feszültségküszöbön aktiválódó, lassú, inaktiválódó T-típusú kalciumcsatornák jelen vannak a periszomatikus régióban, ami összhangban áll a rendelkezésre álló irodalmi adatokkal^[95,96,191].



28.Ábra. A használt kalciumáram modellek viszonya a valós kalciumáramokhoz

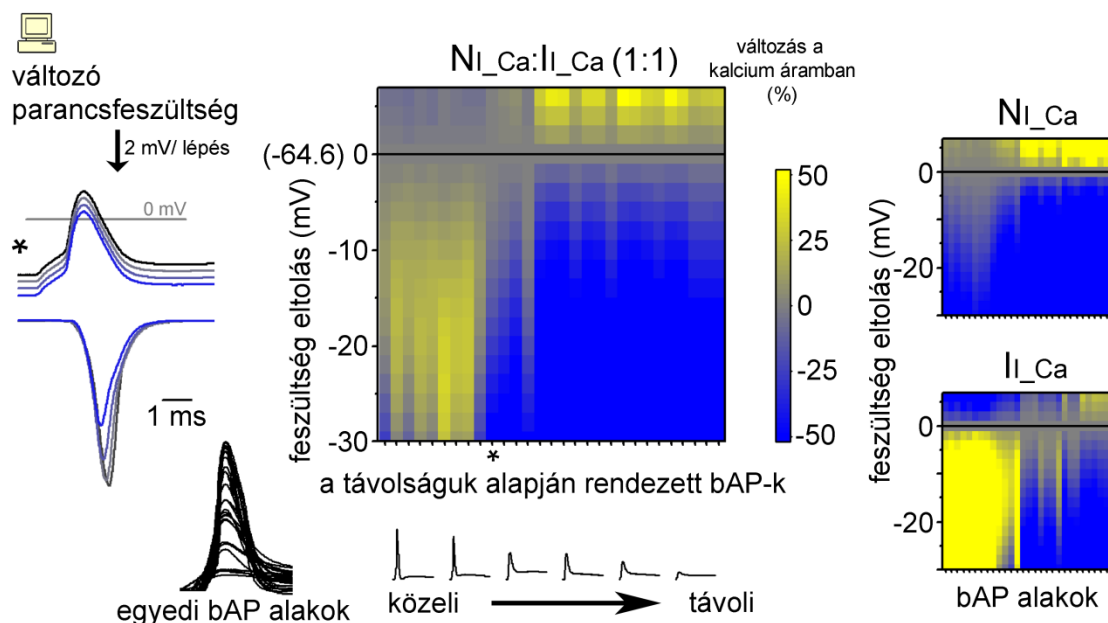
A, Nukleált-patch preparátumon mért izolált kalciumáramok (az NNC55-0396 gátolja a T-típusú csatornák működését, míg a kadmium blokkol minden feszültségfüggő kalciumcsatornát). B, A modelláramok feszültségfüggése és időbeli lefutása (világos szürke: NI_{Ca} , sötétszürke: $\text{I}_{1\text{Ca}}$). C, Az egyes modell áramok és a kevert áram összehasonlítása az NNC55-0396 jelenlétében mért valós kalciumáramokkal. A konduktancia mennyiségét a modellben úgy állítottuk be, hogy illeszkedjen a valós áram csúcsához (AP parancsfeszültség esetén), vagy a testpulsus végén mért áramerősségéhez (négyyszögjel esetén).

Ahogy az a 28. Ábra C paneljén is látható, a magas feszültségen aktiválódó kalciumcsatorna populáció sem homogén. Ha ugyanis T-csatorna-blokkoló jelenlétében vizsgáljuk az ionáramot, még mindig felfedezhető egy nagyon gyors és egy némileg lassabb komponens a kalciumáramban. Ezen megfontolások szerint legalább három különféle modellre van szükség ahhoz, hogy modellezni tudjuk a szemcsejtek kalcium áramainak viselkedését. Mivel azonban a később ismertetésre kerülő farmakológiai

vizsgálataink során azt találtuk, hogy a T-típusú kalciumcsatornák nem játszanak döntő szerepet az analóg moduláció közvetítésében, ezért a modellezésünket kétféle ionáram viselkedésének tanulmányozására korlátoztuk (28.B és C Ábra). Az ionáram-modellek egyike egy nem inaktiválódó, magas feszültségküszöbön aktiválódó áram volt (továbbiakban $N_{I_{Ca}}$, mint nem inaktiválódó kalcium áram), ami lényegében a leggyorsabb mért áramkomponensnek felelt meg. A másik vizsgált ionáram egy szintén magas aktivációs küszöbvel rendelkező, de némileg lassabb kinetikájú, inaktivációt mutató áram (továbbiakban $I_{I_{Ca}}$, mint inaktiválódó kalcium áram) volt. A modellek feszültségfüggő viselkedését az irodalomban rendelkezésre álló adatok alapján építettük fel^[162], és az alkalmazhatóságukat úgy teszteltük, hogy összevetettük a modell áramokat a bAP alakokkal illetve négyszögimpulzussal kiváltott valós kalciumáramokkal (28.C Ábra). Ahogy az látható, leginkább a két modell 1:1 arányú kevert árama feleltethető meg a valós kalciumáramnak, ezért a modellezés során az egyes modell áramok mellett mindig megvizsgáltuk a kevert ionáram viselkedését is.

5.4. Távoli dendriteken a bAP-csúcs csökkenése felel a kisebb kalcium beáramlásért

A megváltozott bAP alak és az eltérő kalcium beáramlás mechanisztikus kapcsolatának vizsgálata során először a disztális régióban megfigyelt csökkenés okát szerettük volna tisztázni. Ebben a régióban a hiperpolarizáció jelentősen csökkentette a bAP csúcsát. Modellezés segítségével arra kerestük a választ, hogy vajon a hiperpolarizációhoz kapcsolódó kisebb csúcspotenciál megmagyarázhatja-e a kisebb mértékű kalcium beáramlást? A kérdés megválaszolásához olyan szimulációkat futtattunk, ahol a sejttesttől különböző távolságra mért bAP-k szolgáltatják a feszültségjelet az ionáram modellek számára. A szimulációk során aztán 2 mV-os lépésenként eltoltuk a teljes feszültségjelet (a vizsgált tartomány +6 mV-tól -30 mV-ig terjedt, 29. Ábra), ily módon egyidejűleg változtattuk a bAP-t megelőző alapvonalat és a csúcspotenciált is, hasonlóan a disztális dendriteken megfigyelt változásokhoz. A 29. Ábrán a feszültségeltolás kalcium beáramlásra kifejtett hatását láthatjuk a különféle modell ionáramok esetén.

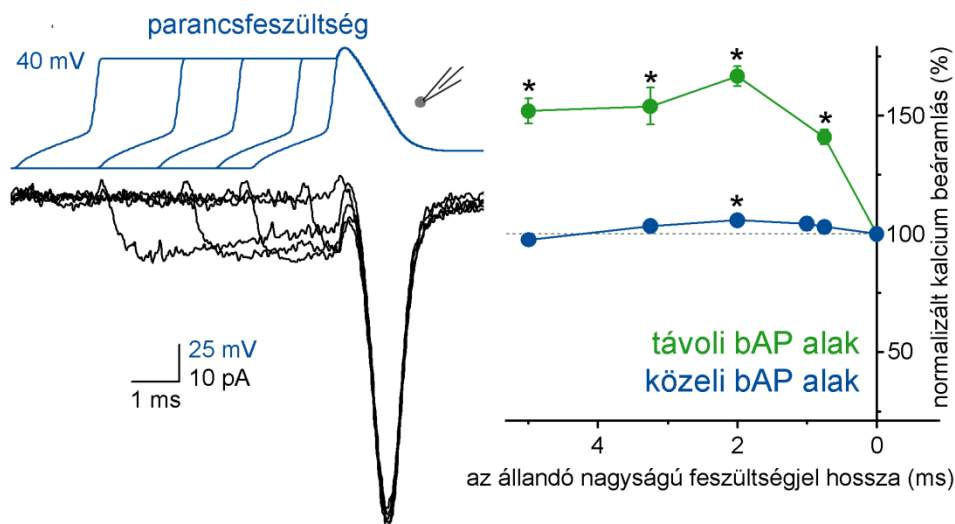


29.Ábra. A távoli bAP-t kísérő kalcium beáramlás nagyon érzékeny a csúcspotenciál változásaira

balra: A 2 mV-os lépésenként eltolts parancsfeszültséget kísérő modell áramok. A példaképp bemutatott szimulációban egy 116 μm -es távolságban mért bAP-t használtunk parancsfeszültségnek. *középen:* A feszültségeltolás hatása a kevert áramra ($N_{I_{Ca}}:I_{Ca}$). Az egyes oszlopok szimulációi más-más bAP-n alapulnak, amiket az x tengelyen a távolság függvényében rendezve mutatunk be. Az y tengelyen az eltolás mértékét ábrázoltuk, míg a kalciumjelben mért változás szinkódolva jelenik meg. *jobbra:* A két grafikon a külön-külön vizsgált modelláramokon mért hatást összegzi.

Így bemutatva a feszültségeltolás mértéke adja a grafikonok y tengelyét, míg az x tengelyt a sejtesttől mért távolság alapján rendezett különféle bAP alakok adják. A feszültségeltolás hatása szinkódolva jelenik meg. A disztális bAP alakok esetében azt figyeltük meg, hogy a szimulált kalciumáramok nagyon érzékenyen reagáltak még a viszonylag kismértékű feszültségeltolásra is. A proximális bAP alakok feszültségeltolása ezzel szemben teljesen másként hatott a kalcium beáramlásra. Az $N_{I_{Ca}}$ modell esetében még viszonylag nagy feszültségeltolás sem okozott érdemi változást az ionáramra, míg az I_{Ca} , modell esetében a negatív irányú eltolások nagyobb áramot eredményeztek. A lényegi különbség a proximális és a disztális bAP alakok között a csúcspotenciál abszolút értéke. Míg a proximális bAP-k esetén a csúcspotenciál meghaladja a +20 mV-ot, addig a disztális bAP-k esetén ez az érték -20 mV alatt van. Értelmezni tudjuk az eltérő viselkedést, ha figyelembe vesszük a kalcium csatornák aktivációs tulajdonságait (28.B Ábra). A kalciumcsatornák aktivációs görbéje alapján a disztális bAP okozta depolarizáció egyszerűen nem elegendően nagy

ahhoz, hogy maximális csatornanyitást eredményezzen. Sőt, a bAP alatt elért maximális depolarizáció mértéke éppen abban a tartományban van, ahol a csatornanyitás feszültségfüggése a lehető legérzékenyebb. Ennek következtében a csúcsfeszültség kismértékű megváltozása is jelentősen befolyásolhatja a kalciumáramot. Ahogy azt az inaktíváló I_{Ca} modell esetén láthatjuk, ebben a feszültségtartományban a rendszer annyira érzékeny a maximális depolarizáció mértékére, hogy a csúcs megváltozásának hatása teljesen elfedheti az inaktiváció jelenlétéből fakadó ellentétes irányú hatást is. Fontos látni, hogy ez a jelenség pusztán az aktiváció feszültségfüggésén alapul, tehát független mind az aktiváció sebességétől, mind pedig az inaktiváció esetleges jelenlététől, ezért ebben a feszültségtartományban a bAP csúcsának csökkenése kisebb mértékű kalcium beáramláshoz vezet minden magas feszültségküszöbön aktiválódó kalciumcsatorna típus esetén. Az aktiváció feszültségfüggése azt is megmagyarázza, hogy miért volt a kalciumáram kevésbé érzékeny a csúcs változására a proximális bAP-k esetén. A bAP lefutása során elért depolarizáció ezekben az esetekben nagyobb volt, mint amekkora a maximális csatornanyitás kiváltásához szükséges és teljes mértékű konduktancia aktiválás történt még a csúcs nagyobb mértékű negatív eltolása esetén is. Az I_{Ca} modell esetén mindemellett érvényesülni tudott az a hatás is, hogy a bAP-t megelőző hiperpolarizáció nagyobb csatorna elérhetőséget biztosított, ezért a negatív irányú feszültségetolás lényegében nagyobb kalcium beáramláshoz vezetett. A szimuláción alapuló mechanizmusjavaslatunk csak akkor lehet igaz, ha valóban helytálló az a feltételezés, hogy a proximális bAP okozta depolarizáció maximális konduktancia aktiválást eredményez, míg a disztális bAP-hoz kapcsolódó depolarizáció csak az elérhető csatornapopuláció kis részét képes aktiválni. Ezen feltételek teljesülését nukleált-patch preparátumok izolált kalcium áramait mérve kísérletes úton is sikerült megerősítenünk (30. Ábra).



30.Ábra. A nagy amplitúdójú bAP alatt közel teljes a kalciumcsatornák aktivációja

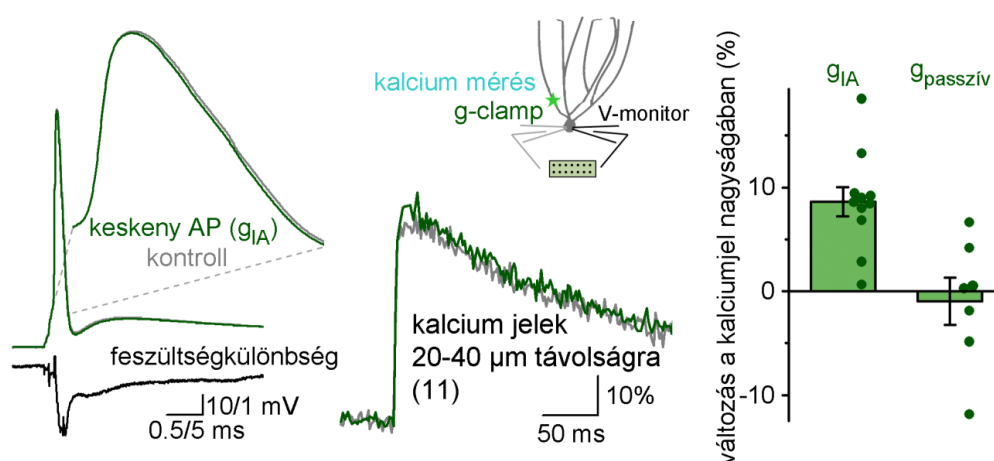
balra: A közeli bAP alakján alapuló protokoll (kék), ahol a felszálló szakasz és a csúc közre változó hosszúságú, de állandó nagyságú feszültségelet illesztettünk az aktiváció mértékének meghatározásához. Alatta láthatók az átlagolt kalciumáramok (fekete). *jobbra:* a közbeiktatott szakasz hosszának hatása a mért kalciumjelekre. A depolarizáció mesterséges elnyújtása távoli bAP alak esetén jelentősen növeli a mért kalciumáram nagyságát (zöld) ami arra utal, hogy sokkal több csatorna aktiválható, mint amennyi kinyílik a bAP alatt. Ezzel szemben a közeli bAP elnyújtása nem vezet jelentős növekedéshez a kalciumáramban (kék), jelezvén, hogy az elérhető csatornák nagy többsége kinyílik a bAP alatt.

Összegezve tehát, a szimulációnk alapján úgy gondoljuk, hogy a hiperpolarizáció esetén megfigyelt kisebb kalcium beáramlás egyenes következménye a távoli dendritekben megfigyelhető negatívabb bAP csúcspotenciálnak.

5.5. A proximális dendriteken megfigyelt keskenyebb bAP önmagában nagyobb kalcium beáramlást eredményez

Következő lépésként a sejttesthez közeli dendritikus régióban is megvizsgáltuk, hogy milyen kapcsolat áll fenn a bAP alakja és a kalcium beáramlás között. Emlékezzünk rá, hogy ebben a régióban a membránpotenciál analóg modulációja kétféleképpen jelenik meg. Az egyik maga a kiindulási membránpotenciál, ami a különféle ioncsatornák elérhetőségének változtatásával keresztül önmagában is jelentőséggel bírhat. A másik hatás pedig a hiperpolarizáció hatására megváltozó repolarizációs fázis. Szerettük volna a kétféle hatást egymástól elkülönülten kezelni, ezért egy olyan kísérleti eljárást dolgoztunk ki, ami állandó kiindulási membránpotenciál mellett is lehetővé tette a gyorsabb bAP repolarizáció kalcium beáramlásra kifejtett hatásának vizsgálatát. A kísérlet során kételektródás dinamikus-

clamp technika segítségével szabályoztuk a repolarizáció sebességét és ezzel egyidejűleg mértük a kalciumjeleket a proximális dendritekben. A technika segítségével tehát a kiindulási hiperpolarizáció nélkül hoztunk létre a megfigyelthez hasonló mértékű változást a repolarizációban, miközben nyomon követhettük a megváltozott repolarizáció hatását is. A dinamikus-clamp mesterséges kálium konduktancia modelljét a nukleált-patch preparátumon mért inaktiválódó káliumáram feszültségfüggése és kinetikai profilja alapján hoztuk létre (14. Ábra). Kételektródás elvezetésre azért volt szükség, mert mérés technikai okból nagyon nehéz megbízhatóan monitorozni az akcióspotenciál alakját, ha ugyanazon az elektródán keresztül folyamatosan változó amplitúdójú gyors áraminjekció is történik. Ha azonban két elektródát használunk, akkor az egyik pipettán keresztül tudjuk mérni a membránpotenciál pillanatnyi értékét, és ennek megfelelően pontosabban kiszámítható a konduktanciának megfelelő pillanatnyi árammennyiség, amit a másik elektróda segítségével juttathatunk a sejtbe. Várakozásunknak megfelelően a 4-8 nS mesterséges konduktancia jelenléte nem befolyásolta a kiindulási membránpotenciál értékét ($-68,7 \pm 0,6$ mV a konduktancia jelenlétében, $-68,8 \pm 0,5$ mV a konduktancia nélkül, $p=0,633$, $n=11$ sejt, páros t-teszt), de a hiperpolarizáció hatásához nagyon hasonló módon befolyásolta az AP alakját, vagyis gyorsabb repolarizációt eredményezett úgy, hogy érdemben nem befolyásolta az AP csúcsát (31. Ábra).



31.Ábra. A repolarizáció felgyorsítása önmagában elég a kalciumjelek növeléséhez

balra: A mesterséges konduktancia jelenlétében (zöld), vagy anélkül (szürke) regisztrált átlagos AP alak ($n=11$ sejt) illetve a kettő közötti feszültségkülönbség (fekete). *középen és jobbra:* a mesterséges konduktanciával felgyorsított repolarizáció hatása a proximális kalciumjelekre. A jobb oldali grafikon bemutatja a passzív konduktancia hozzáadásán alapuló kontroll kísérletek eredményeit is.

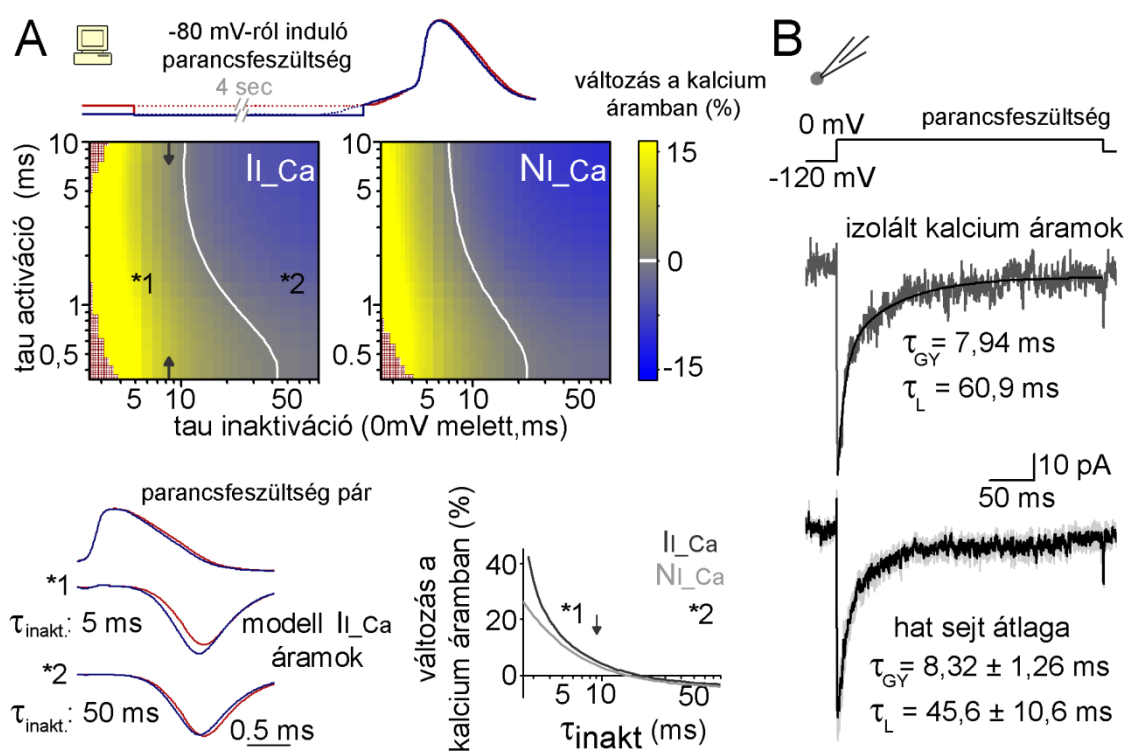
A kalcium jeleket a sejttest közelében mértük (20-40 μm -re a sejttesttől), abban a régióban, ahol feltehetőleg a szomatikus AP manipulálásával még befolyásolhattuk a bAP alakját. A kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy önmagában a repolarizáció fázisának mesterséges felgyorsítása megnövekedett kalcium beáramlást eredményezett ($8,6 \pm 1,4 \%$, $p=0,00012$, $n=11$, t-teszt, 31. Ábra). Végeztünk olyan kísérleteket is, ahol nem csak a repolarizáció fázisát módosítottuk, hanem egy passzív konduktancia használatával az AP alakjának minden paraméterét megváltoztattuk. Ebben az esetben azonban nem tapasztaltunk érdemi növekedést a kalcium beáramlásban, ami tovább hangsúlyozza a repolarizáció kritikus szerepét a folyamatban.

Összegezve tehát azt találtuk, hogy a szemcsesejtek proximális dendritjeiben a felgyorsult bAP alak önmagában elégséges ahhoz, hogy nagyobb kalcium beáramlást okozzon.

5.6. A keskenyebb bAP akkor vezet nagyobb kalcium beáramláshoz, ha kellően gyors a kalciumcsatornák inaktivációja

Láthatjuk tehát, hogy a méréseink szerint a gyorsabb akciós potenciálhoz nagyobb kalcium beáramlás társult. Ez egy nagyon érdekes eredmény, mivel az AP alak és a kalcium beáramlás közötti viszony tipikusan ezzel ellentétes irányú, vagyis a legtöbb vizsgált rendszerben a keskenyebb akciós potenciál kisebb kalcium beáramlást eredményez^[192-195] (de lásd^[196]). Szilárd bizonyítékok támasztják alá, hogy az AP kiszélesedése megnövekedett kalcium beáramlást okoz még a szemcsesejtek axonjában is^[156]. Szerettük volna feloldani a méréseink és az irodalmi adatok között felmerült ellentmondást, ezért újra a számítógépes modellezéshez fordultunk segítségért. Ebben az esetben arra kerestük a választ a szimulációk segítségével, hogy milyen körülmények között fordulhat elő növekedés a kalciumáramban egy gyorsabb AP esetén. Ezt úgy vizsgáltuk, hogy proximális dendritből elvezetett AP alakokat, egy depolarizált bAP-t és annak a hiperpolarizált párját használtunk feszültségjelként úgy, hogy az AP-t megelőző membránpotenciált az eredeti értéktől függetlenül mindkét esetben -80 mV-ra állítottuk be. Így a dinamikus-clamp kísérletekhez hasonlóan lehetőségünk van az AP alak hatásának izolált, a kiindulási membránpotenciáltól független vizsgálatára. A szimulációk során az eredeti I_{Ca} és N_{Ca} modellekből kiindulva szisztematikusan megváltoztattuk a csatornák kinetikai paramétereit és megnéztük, hogy a gyorsabb

repolarizáció milyen hatást vált ki a különféle esetekben. Ebben az esetben mindkét csatornatípusba beépítettük a feszültségfüggő inaktivációt is. A 32. Ábra a paneljén található grafikonok mutatják a modellezésünk eredményét. Itt az x tengely értéke az inaktiváció időállandójának felel meg, míg az aktiváció időállandóját az y tengelyen ábrázoltuk. Színkódolva látható a gyorsabb repolarizáció hatása a kalciumáramra. A grafikonok értelmezését érdemes a jobb oldali részükkel kezdeni. Ez az a régió a paramétertérben, ahol az inaktiváció sebessége (az inaktiváció időállandóját 300 ms-ig vizsgáltuk) nagyságrendekkel lassabb, mint egy bAP lefutása.



32.Ábra. A nagyobb kalcium beáramlás kulcsa a gyors inaktiváció

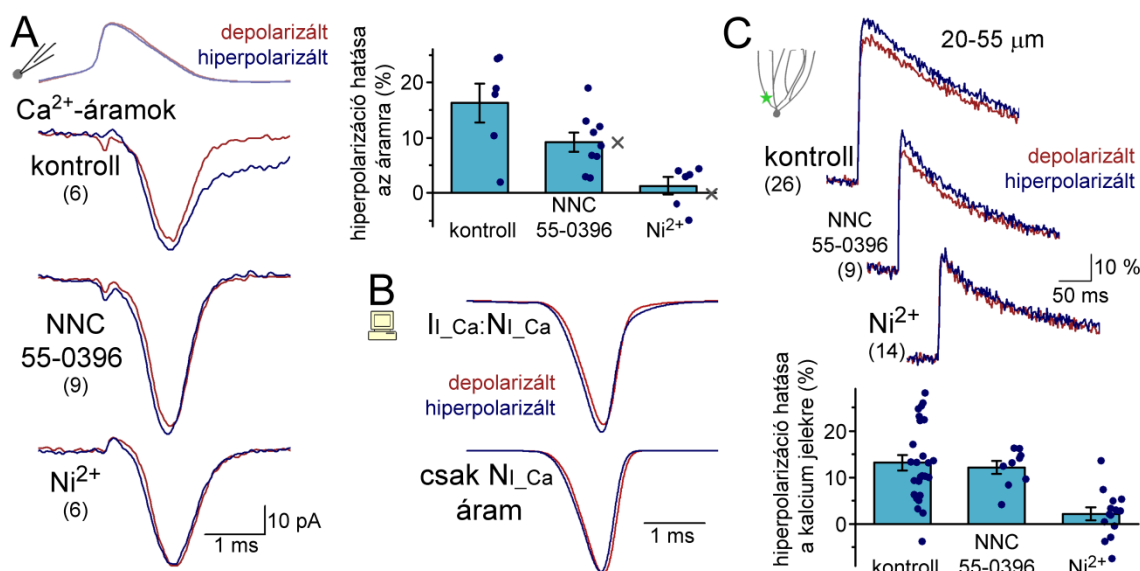
A, Számítógépes modellezés, amiben azt vizsgáltuk meg, hogy a csatornák milyen kinetikai paramétere mellett válik lehetővé a gyorsabb repolarizációhoz kötött nagyobb kalcium beáramlás. A kérdés megválaszolásához szisztematikusan változtattuk az aktiváció és az inaktiváció sebességét a csatornamodellekben. Parancsfeszültségként egy olyan proximális bAP párt alkalmaztunk, ahol az AP-t megelőző membránpotenciál értékét -80 mV-ra állítottuk be, hogy elkülönítsen tanulmányozzuk a repolarizáció hatását. A kapott modelláramok alapján meghatároztuk, hogy adott csatorna tulajdonságok mellett milyen hatást vált ki a gyorsabb repolarizáció. A színkódolt grafikonok mutatják be a szimulációk eredményeit. Csillaggal jelöltük az alul példaként bemutatott kalciumáramok helyét a paramétertérben. Emellett nyíllal jelöltük az inaktiváció kísérletes úton meghatározott sebességét is. Az alsó sorban a görbék a modelláramok eredeti aktivációja mellett mutatják be az inaktiváció sebességek hatását ($I_{L_{Ca}}$: 1,137 ms, sötétszürke, $N_{L_{Ca}}$: 0,825 ms, világosszürke). B, Izolált kalciumáram mérések, amik azt mutatják, hogy valóban jelen van a szemcsesejteken egy olyan kalciumáram, ami gyors inaktivációval rendelkezik. A szürke áram egy egyedi kísérlet, míg feketével az összes kísérlet átlaga látható.

A terület tehát gyakorlatilag megfelel a modelláramok inaktiváció nélküli viselkedésének. Azt láthatjuk, hogy ezekben az esetekben a gyorsabb AP alak mindig csökkent ionáramot eredményez, a csatornaaktiváció sebessége csak a csökkenés mértékét befolyásolja. Ahogy azonban bal felé haladva az inaktiváció sebessége egyre gyorsabbá válik, úgy változik meg a modellek viselkedése is. Megfelelő gyorsaságú inaktiváció esetén megjelennek olyan kinetikai kombinációk is, ahol már a gyorsabb akciós potenciál képes növelni az ionáramot. Egy kritikus inaktivációs sebesség felett, ahol az inaktiváció sebessége egy tartományba kerül az akciós potenciál időbeli lefutásával, azt tapasztalhatjuk, hogy a gyorsabb AP mindig növelni fogja a kalciumáramot, függetlenül az aktiváció sebességétől. A modell tehát rámutatott arra, hogy a gyorsabb repolarizáció nagyobb kalcium beáramláshoz vezethet, de csak akkor, ha a kalciumcsatorna működése a bAP lefutásával egy időskálán mozgó, gyors inaktivációt mutat. Ennek ismeretében megvizsgáltuk, vajon a szemcsesejtek periszomatikus régiójában jelen lehetnek-e olyan magas feszültségküszöbön aktiválódó kalcium csatornák, amik ennyire gyors inaktivációt mutatnak (32.B Ábra). Nukleátpatch preparátumokon izolált kalcium áramokat mértünk úgy, hogy a nátrium-, és káliumcsatornák mellett gátoltuk a T-típusú kalciumcsatornák működését is. A csatornák aktiválásához alkalmazott négyszögimpulzus ebben az esetben kellően hosszú volt ahhoz, hogy tanulmányozni tudjuk az inaktív állapot elérésének időfüggését (300 ms, 0 mV-on). A mért kalciumáramok inaktivációja többkomponensű időbeli lefutást mutatott, amit megfelelően jól tudunk közelíteni két exponenciális görbe illesztésével. Az illesztés eredményéből kiderült, hogy a mérhető ionáram egy jelentős komponensét gyors inaktiváció jellemzi (τ_{gyors} : $8,3 \pm 1,3$ ms, $\tau_{\text{lassú}}$: 46 ± 11 ms, ahol a gyors komponens súlya átlagosan $52,8 \pm 8,9\%$, $n=6$ patch). Méréseink tehát alátámasztották egy gyors inaktivációjú kalciumcsatorna populáció jelenlétét a szemcsesejteken.

5.7. A kalciumjelek analóg modulációjában alapvető szerepet játszanak a dendritikus R-típusú kalciumcsatornák

A fent ismertetett szimulációk azt sugallják, hogy a szemcsesejtek proximális dendritjein jelen kell, hogy legyen egy olyan kalciumcsatorna populáció, ami magas feszültségen aktiválódik, és nagyon gyors inaktivációt mutat. A különféle kalciumcsatorna típusok közül az R-típusú csatornák azok, amik hasonló tulajdonsággal

bírnak, és tudjuk, hogy ott vannak a szemcsesejtekben. Az R-típusú kalciumáramot ugyanis általánosságban a feszültségfüggő inaktiváció, magas aktivációs küszöb és gyors aktivációs kinetika jellemzi^[98,197]. Ezt a fajta áramot zömében $Ca_v2.3$ csatornák közvetítik, farmakológiai profilját tekintve nikkel- és kadmium érzékeny, emellett a kalcium csatornák között specifikus módon blokkolja az SNX-482 nevű peptidtoxin. Az irodalmi adatok és a saját nukleált-patch eredményeink alapján azonban azt is tudjuk, hogy a szemcsesejtek többféle kalciumcsatorna típust is kifejeznek a szomatodendritikus membránfelszín membránfelszínén. A következő kísérletsorozatban farmakológiai eszközök segítségével annak jártunk utána, hogy az egyes csatorna típusok milyen szerepet játszanak a proximális dendritek működésének bAP függő analóg modulációjában. A stratégiánk az volt, hogy specifikusan leblokkoltunk bizonyos kalciumcsatornákat és megvizsgáltuk, hogy az adott csatornatípus hiánya milyen mértékben befolyásolta a kalciumjelek analóg modulációját. Ebben az esetben is nukleált-patch preparátumok izolált kalcium áramait, illetve a proximális dendriteken mért kalcium jeleket használtunk a mérésekhez. A kalcium áram mérések során olyan feszültségjel párt használtunk az áramok kiváltására, ami nemcsak az eltérő AP alakot tartalmazta, de érintetlenül hagytuk az AP-t megelőző membránpotenciál különbséget is. Kontroll körülmények között, vagyis amikor egyik kalcium csatorna sem volt gátolva a hiperpolarizáltabb bAP jelentős növekedést okozott a kalciumáramban (33.A Ábra). Ahogy azonban látható ez elsősorban annak köszönhető, hogy a hiperpolarizáltabb membránpotenciálnál jelen van egy lassú, de hosszan tartó áramkomponens, ami hiányzik a depolarizáltabb bAP esetében. A lassú csatornakinetika és a tény, hogy az áramkomponens már -60 mV körül nem volt jelen arra utalt, hogy ez az áram T-típusú kalciumcsatornák működésének köszönhető.



33.Ábra. Nikkel érzékeny R-típusú kalciumcsatornák felelnek a kalcium beáramlás növekedéséért

A, Nukleált patch preparátumon mért, eltérő kiindulási membránpotenciált és eltérő bAP alakot egyaránt tartalmazó protokollal kiváltott, izolált kalciumáramok kontroll körülmények között, a T-csatorna gátló NNC- 55-0396 (10 μM) jelenlétében vagy a T-és R típusú csatornákat egyaránt gátló nikkellel (500 μM). B, A kevert modell (megfeleltethető az NNC jelenlétében mért kalciumáramnak) és a Ni_Ca modelláram (a nikkellel jelenlétében mért valós áram megfelelője) viselkedése az A panelen bemutatott parancsfeszültség pár esetén. C, A hiperpolarizáció hatása a sejttesthez közeli kalciumjelekre kontroll körülmények között, NNC illetve nikkellel jelenlétében.

Valóban, ha NNC-550396 segítségével szelektíven gátlottuk a T-csatornák működését, akkor ez a lassú komponens nem jelent meg a hiperpolarizáltabb bAP hatására sem. Azt tapasztaltuk azonban, hogy a hiperpolarizáltabb bAP a T-csatornák nélkül is nagyobb kalcium áramot eredményezett ($9,2 \pm 1,7\%$, $p=0,00073$, $n=9$ patch, t-teszt). Ez a kísérlet megerősítette a korábbi szimulációink eredményét miszerint magas aktivációs küszöbű csatornák is mutathatnak megnövekedett kalciumáramot a hiperpolarizáció, és az ahhoz társult keskenyebb bAP esetén. Az R csatornák szerepének tisztázásához nikkellel jelenlétében végeztünk méréseket, ugyanis a nikkellel gátlja a T és R típusú kalciumcsatornák működését. Azt találtuk, hogy a nikkellel jelenlétében a hiperpolarizált bAP már nem növelte meg a kalciumáramot ($1,3 \pm 1,6\%$, $p=0,44$, $n=6$, t-teszt), ami azt bizonyítja, hogy valamelyik nikkellel érzékeny komponens kulcsfontosságú szerepet tölt be az analóg modulációban. Mivel a T-áram szerepét a szelektív gátlószere segítségével már az előbb kizártuk, így az R-áram marad egyetlen lehetséges jelöltként. A mérésekkel párhuzamosan modellezés segítségével is megvizsgáltuk az eltérő viselkedésű csatornák szerepét (33.B Ábra). A szimulációk során teljesen ugyanazokat a feszültségjeleket használtuk, mint a valós áramméréseknél, és arra voltunk kíváncsiak,

hogy a mért adatok mennyire vannak összhangban a modell által prediktált hatással. Ebben az esetben a kevert I_{I_Ca}/N_{I_Ca} modelláram megfeleltethető az NNC jelenlétében mért ionáramnak, míg a N_{I_Ca} modell önmagában a nikkell jelenlétében mért árammal hasonlítható össze. Látható, hogy a különféle mérések jó egyezést mutatnak a szimuláció jóslataival. Ezek a kísérletek alátámasztják azt a feltételezésünket, miszerint az R-csatornák az analóg moduláció meghatározó kalcium csatornáit.

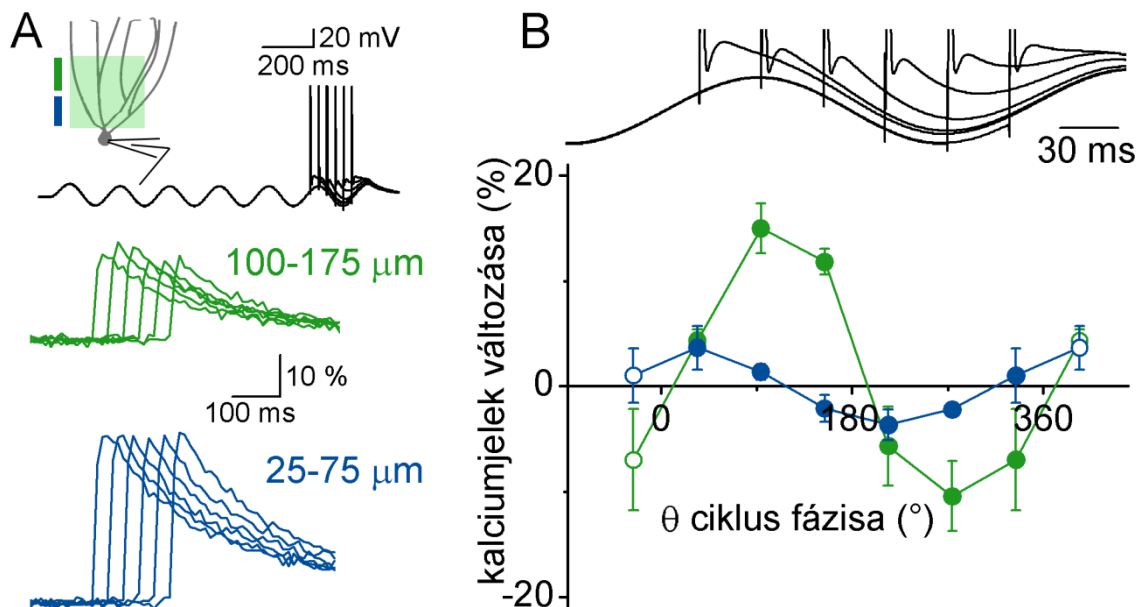
A farmakológiai kísérleteket elvégeztük a dendritikus kalcium jelek optikai mérésével is (33.C Ábra). Ez azért nagyon fontos, mert a nukleált-patch kísérletektől eltérően ebben az esetben a valódi dendritikus jeleket tudtuk tanulmányozni úgy, hogy a rendszer minden eleme érintetlen maradt. Az eddigi kísérletekkel teljes összhangban azt találtuk, hogy a T-csatornák gátlása önmagában nem befolyásolta a hiperpolarizáció hatására mérhető megnövekedett kalcium beáramlást (kontrol körülmények között $13,1 \pm 1,6\%$, $p=2 \times 10^{-8}$, $n=26$ dendritikus terület; NNC55-0396 jelenlétében $12,1 \pm 1,3\%$, $p=2 \times 10^{-5}$, $n=9$ dendritikus terület, t-teszt). Ezzel szemben nikkell jelenlétében megszűnt a kalciumjelek analóg modulációja ($2,1 \pm 1,4\%$, $n=14$ dendritikus terület, egytényezős ANOVA: $p=6 \times 10^{-5}$, post hoc Bonferroni teszt alapján szignifikáns különbség van a Ni^{2+} és az NNC55-0396 csoport között, $p=0,0046$).

Összességében tehát kijelenthetjük, hogy a hiperpolarizációhoz kapcsolódó megnövekedett kalcium beáramláshoz szükséges és elégséges feltétel az inaktiválódó R-típusú csatornák dendritikus jelenléte.

5.8. Dinamikus membránpotenciál változások moduláló hatása a dendritikus kalcium jeleken

Az eddig ismertetett összes kísérletet olyan körülmények között végeztük, ahol hosszú ideig állandó értéken tartottuk a membránpotenciált, mielőtt kiváltottuk volna a vizsgálni kívánt AP-t. Ennek az az oka, hogy ilyen körülmények között minden ioncsatornának volt ideje elérni az adott membránpotenciálra jellemző egyensúlyi állapotát. Ez a megközelítés nagyon előnyös egy jelenség leírásánál, illetve a különféle résztvevő mechanizmusok vizsgálata során. Tudjuk azonban, hogy az idegsejtek membránpotenciálja szinte soha nem állandó, hanem folyamatosan és nagyon dinamikusán változhat, és ez a rendelkezésre álló *in vivo* adatok tanúsága szerint a

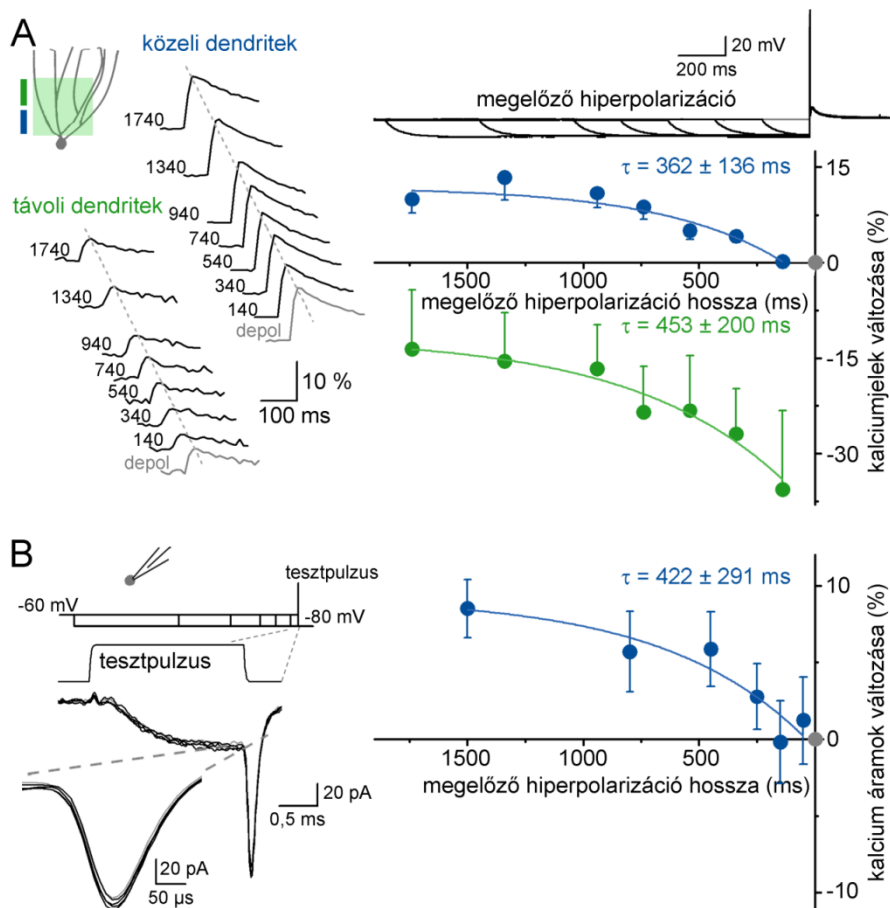
szemcsesejtek esetében sincs másként^[59,62,63,198]. A dendritikus analóg moduláció lehetséges élettani szerepének megértéséhez szükség van tehát arra, hogy megvizsgáljuk, vajon az egyensúlyi helyzetben kimért moduláló mechanizmusok a sejt rendelkezésére állnak-e a dinamikusán változó körülmények között is. A kérdés megválaszolása során a dendritikus kalcium jelek mérését használtuk az analóg moduláció indikátoraként. Ebben az esetben azonban a hagyományos konfokális mérőrendszer helyett egy másik technika, úgynevezett spinning disc konfokális képalkotás segítségével mértük a bAP-hoz kapcsolódó kalcium jeleket. Ezzel a módszerrel viszonylag jó időbeli felbontás mellett egyszerre végezhetünk méréseket a dendritfa jelentős részén, így egyidejűleg tudtuk monitorozni a proximális és a disztális hatásokat is. A méréshez használt festékek típusa és koncentrációja megegyezett a hagyományos konfokális méréseknél használttal. A kísérletben ugyanúgy akciós potenciálokat váltottunk ki, mint az alapkísérletek során, de ebben az esetben a kiváltott AP-t megelőző időszakban nem állandó értéken tartottuk a membránpotenciált, hanem egy theta frekvencia tartományba eső, 5,2 Hz-es küszöb alatti oszcillációt váltottunk ki intracelluláris áraminjekció segítségével (34.A Ábra). Az oszcilláció amplitúdója ebben az esetben is az élettanilag releváns feszültségtartományt ölelte fel ($-62,2 \pm 0,7$ mV a legdepolarizáltabb ponton, míg $-83,9 \pm 0,3$ mV a leghyperpolarizáltabb ponton). A kísérlet folyamán az AP kiváltásának időzítését változtattuk az éppen zajló theta ciklus fázisához képest, és azt mértük meg, hogy hogyan változnak a kalcium jelek az egyes fázisokban. Referenciaként az oszcilláció nélkül, nyugalmi membránpotenciálról ($-73,3 \pm 0,3$ mV) kiváltott kalcium jeleket használtuk. A kísérleteink szerint a disztális dendritekben a kalcium jelek nagymértékben függtek az éppen futó ciklus fázisától (32.B Ábra, $p=0,0066$, $n=5$ sejt, egytényezős ANOVA, Greenhouse-Geisser korrekció). Ez azt jelentette, hogy a ciklus depolarizáltabb fázisában (40° és 160° között) a referenciajelhez képest szignifikáns növekedést tapasztaltunk. Ezzel szemben a hyperpolarizáltabb fázis alatt (219° és 339° között) a kalcium jelek határozott csökkenést mutattak. Érdekes módon a proximális kalciumjelek esetén nem tapasztaltunk hasonlóan erős moduláltságot (25-100 μm távolságra eső dendritszakaszok; $p=0,062$, $n=5$ sejt, egytényezős ANOVA).



34.Ábra. A disztális moduláló hatás képes követni a dinamikus membránpotenciál változásokat is

A, Az éppen futó théta ciklus különböző fázisaiban kiváltott proximális (kék) és disztális (zöld) átlagos kalciumjelek. B, A ciklus alatt mért kalciumjelek változások a referenciaként használt, nyugalmi membránpotenciálról kiváltott jel nagyságához képest.

Az eltérő viselkedés megérthető, ha figyelembe vesszük, hogy a proximális és a disztális moduláció más-más mechanizmuson alapul. Amint azt már tudjuk, a disztális moduláció teljesen független a kalcium csatornák kinetikai paramétereitől, ezért valószínűleg még ennél is gyorsabb változásokat is követni tudna. A sejttesthez közeli dendritek modulációja viszont nagymértékben függ a kalciumcsatornák inaktivációs tulajdonságaitól. Az inaktiválódott csatornáknak azonban időre van szüksége, hogy újra aktiválhatóak legyenek, ezért lényegében az inaktivációból való visszatérés időbeli lefutása fogja meghatározni, hogy milyen időkereten belül képes hatékonyan működni az analóg moduláció a proximális dendriteken. Az időkeret meghatározásához mind optikai úton, mind pedig izolált kalciumáram mérések segítségével tanulmányoztuk a kalciumcsatornák inaktivációból való visszatéréséhez szükséges időt (35.A és B Ábra), ami a méréseink alapján sokkal hosszabb, mint egy théta ciklus fázisideje. A visszatérés időállandója ugyanis mindkét mérés szerint legalább 300 ms volt, ami azt jelenti, hogy ez a mechanizmus csak 2 Hz-nél lassabb változások esetén válik igazán hatékonyá.



35.Ábra. Az inaktivációt követő visszatérés sebessége korlátozza a proximális moduláció dinamikáját

A, Különböző ideig tartó (140-1740 ms) hiperpolarizált állapotot követő átlagos kalciumjelek (kék:proximális, zöld:disztális). A jelek mellett a számok a hiperpolarizáció időtartamát jelölik. A jobb oldali grafikonon a depolarizált kalciumjelhez (0 ms, $-62,5 \pm 0,2$ mV) viszonyított változást mutatja be a hiperpolarizált állapot ($-79,8 \pm 0,7$ mV) hosszának függvényében, a változásokra illesztett exponenciális görbékkel együtt (proximális görbe: $R^2=0,915$, $n=15$ sejt alapján; disztális görbe: $R^2: 0,896$, $n=11$). B, NNC jelenlétében mért átlagos kalcium áramok ($n=17$ nukleált patch) visszatérése az inaktív állapotból. Az áramok kiváltásához használt tesztimpulzust (+20 mV, 2 ms) egy változó hosszúságú hiperpolarizáló lépés előzte meg (-80 mV, 150-1500 ms). A jobb oldali grafikonon a hiperpolarizáció nélkül kiváltott (0 ms) kalciumáramhoz viszonyítva mutatja be a kalciumáramok változását a hiperpolarizált állapot hosszának függvényében, a pontokra illesztett exponenciális görbével együtt ($R^2: 0,837$).

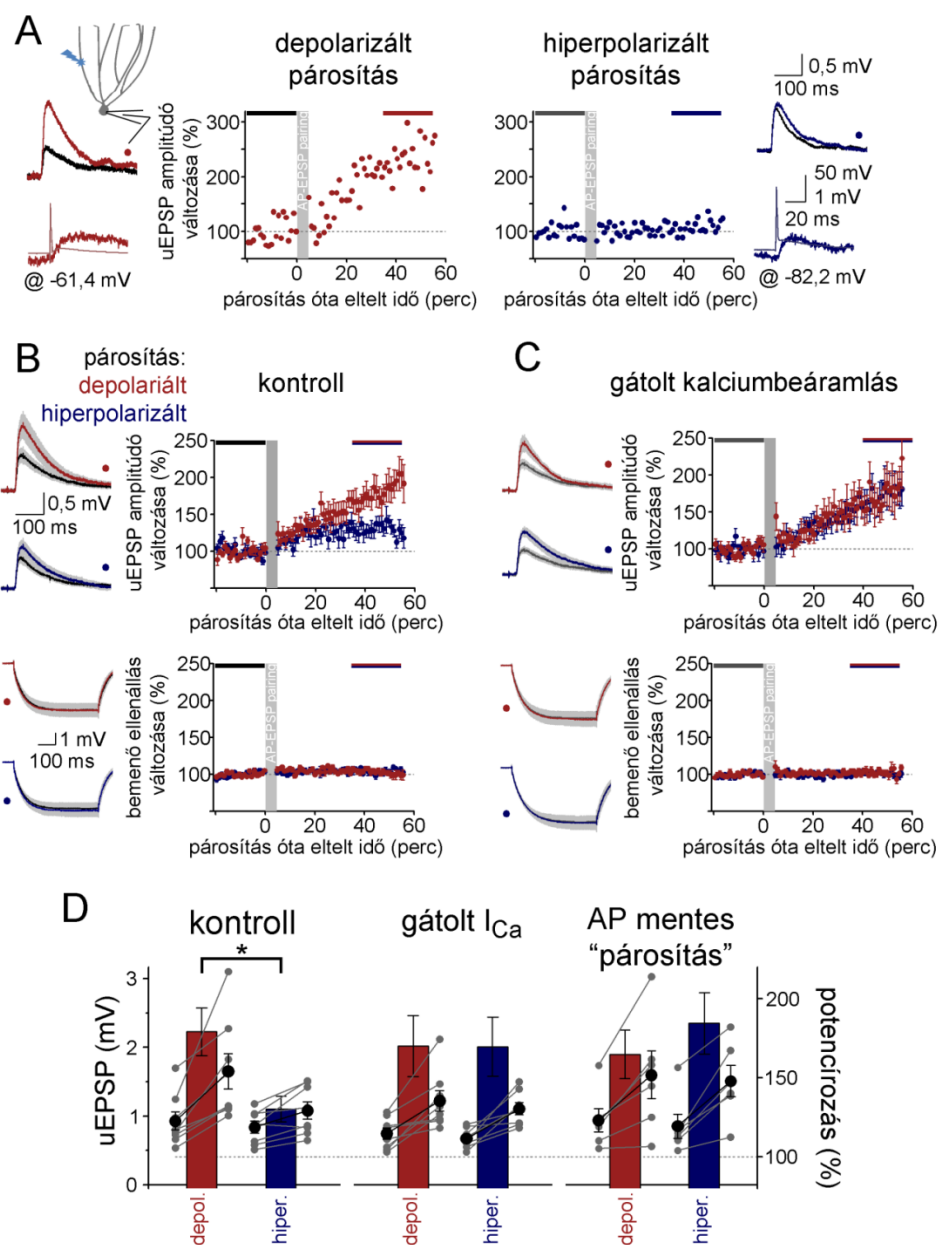
Összegezve tehát elmondhatjuk, hogy a dendritikus hibrid jelátadás dinamikus feszültségváltozásokat is követhet, bár a proximális mechanizmus igazán csak a lassú változások kódolását teszi lehetővé.

5.9. A bAP-k analóg információtartalma befolyásolja a serkentő szinapszisok plaszticitási folyamatait

A sejttest küszöbalatti membránpotenciál változásai tehát megjelennek a dendritben terjedő bAP alakjában és a hozzá kapcsolódó dendritikus kalcium beáramlásban is.

Mivel a bAP és a hozzá kötődő lokális kalcium beáramlás egyik elemi funkciója a dendriten található szinaptikus kapcsolatok erősségének dinamikus szabályozása^[112], ezért a kutatás utolsó fázisában annak jártunk utána, hogy az így kódolt analóg információ tartalom játszhat-e valamilyen szerepet ebben az összetett szabályozó folyamatban. Hogy ezt a kérdést meg tudjuk válaszolni, ahhoz egy olyan kísérletet elrendezést kellett találnunk, ami megbízható módon a dendritikus szinapszisok bAP függő hosszú távú módosulásához vezet. Ezt követően pedig azt kell megvizsgálni, hogy ez a hosszú távú változás függ-e a sejttest membránpotenciáljától. Első lépésként tehát egy olyan protokollt kellett kialakítani, ami képes a kiváltott bAP-k függvényében valamilyen irányba módosítani a szinapszisok erősségét. A dendriten található szinaptikus receptorok aktiválásának legáltalánosabb módja a szinapszist formáló preszinaptikus rostok stimulálása. Ez a módszer azonban több szempontból is előnytelen lett volna a kísérleteinkben. Először is tudjuk azt, hogy a vizsgált dendritikus analóg moduláció erőteljes térfüggést mutat, és a molekuláris réteg rostkötegeinek stimulálásával nehéz, vagy éppen lehetetlen lett volna biztosítani a szinapszisok térben precíz aktiválását. Emellett a szinapszisok erősségének hosszú távú módosítása nemcsak a posztszinaptikus oldalról lehetséges, de preszinaptikus mechanizmusok egyaránt közrejátszhatnak az esetleges változások kialakításában. Mi azonban a posztszinaptikus változásokat önmagában, minden preszinaptikus hatást kiküszöbölve szeretnénk vizsgálni. Ennek megfelelően extracelluláris stimuláció helyett MNI-glutamát fotolízisével szabadítottuk fel a szinaptikus receptorok aktiválásához szükséges glutamátot, és az így kiváltott uEPSP-eket használtuk fel a szinapsztikus potenciózódás hosszú távú méréséhez (36. Ábra). A fényaktivált glutamát felszabadulás mindkét fent vázolt akadályra megoldást jelentett, hiszen csak posztszinaptikus hatásokat láthattunk, jó térbeli felbontás mellett. Egy ilyen kísérlet beállítása esetén a kutató többféle nehézségbe is ütközhet. Az első ilyen problémaforrás az, hogy a kísérlet folyamatos feszültségkontrollt igényel, hiszen monitorozni kell a kiváltott uEPSP-eket kontroll körülmények között illetve az indukciós protokollt követő tesztidőszak folyamán. Emellett időben rendezett módon ki kell tudni váltani a plaszticitási folyamat elindításához szükséges bAP-kat is. A megfelelő feszültségkontrollhoz intracelluláris elvezetésre van szükség. Tudjuk azonban, hogy az plaszticitási folyamatok tanulmányozása a lehető legérzékenyebb intracelluláris környezetet igényli, mert a

sejtek dialízise a plaszticitási folyamathoz nélkülözhetetlen komponensek kimosásával járhat, ami nagyon megbízhatatlanná teheti a mérések kimenetelét. Másik kulcsfontosságú paraméter maga a párosítási protokoll, vagyis hogy a kellő számban és a szükséges időzítés mellett alkalmazzuk a bAP-k és az uEPSP-k társítását ahhoz, hogy megbízható plaszticitási folyamatot indítsunk be. Mindemellett azt is el kellett dönteni, hogy melyik dendritszakaszra fókuszálva végezzük el a kísérleteket. Ennek megfelelően kiterjedt előkísérleteket végeztünk az kísérletes elrendezés optimalizálása érdekében. Ezek a kísérletek azt mutatták, hogy az uEPSP-eket elegendő egy másodpercenként párosítani a kiváltott bAP-kkal. 300 ilyen párosítást követően robosztus hosszú távú megerősödést (potencírozódást) tapasztaltunk a disztális dendritek szinapszisaiban (36. Ábra). A párosítások viszonylag nagy számát az indokolja, hogy nem a potencírozás minimális követelményeinek feltárása volt az elsődleges célunk, hanem az, hogy a lehető legmegbízhatóbbá tegyük az indukciós protokollt. A megbízható plaszticitás-indukció másik sarkalatos pontja az elvezetés soros ellenállása volt. Azt tapasztaltuk ugyanis, hogy nagyellenállású pipetták alkalmazása esetén nagy biztonsággal ki tudtuk váltani a kívánt hosszú távú változásokat. Ez valószínűleg összefüggésben áll a sejt belső közegének a lehető legnagyobb mértékű megőrzésével, ugyanis a 20 M Ω ellenállású pipetták használata minden bizonnyal lassította az elvezetett sejtek dialízisét. A soros ellenállás kritériumaként 50 M Ω -os határt alkalmaztunk és abbahagytuk azokat a kísérleteket, ahol ennél a küszöbértéknél kisebb ellenállást tapasztaltunk. Maga a kísérlet tehát úgy zajlott, hogy a sejtet -70 mV körüli membrán potenciálon tartva húsz percen keresztül rögzítettük a kiváltott uEPSP-k paramétereit. Ha az uEPSP-k tulajdonságai kellően stabilnak bizonyultak, akkor elindítottuk a párosítási protokollt (300 AP/uEPSP, 1Hz), amit hosszú tesztfázis követett (36. Ábra).



36.Ábra. A bAP-ban kódolt analóg információ hatással van a szinapszisok hosszú távú szabályozására

A, Két példakísérlet, ami bemutatja a bAP-val párosított uEPSP-k hosszútávú változásait. A bal oldali példán (vörös) a párosítás (1 Hz 300 AP) során a sejtet depolarizált állapotban tartottuk, míg a jobb oldalon bemutatott kísérletben a párosítás hiperpolarizált membránpotenciál mellett történt (kék). A grafikonok minden pontja három egymást követő esemény átlaga. B, *fent*: A kiváltott uEPSP-k átlagos hosszú távú változása depolarizált (vörös, $-62,5 \pm 0,5$ mV), illetve hiperpolarizált (kék, $-81,4 \pm 0,5$ mV) párosítás esetén ($n=8$ -sejt). *lent*: A sejtek bemenő ellenállása változatlan maradt a párosítást követő időszakban is. C, Az előzőleg bemutatott elrendezéssel megegyező kísérletek, de ebben az esetben gátoltuk a kalciumcsatornák működését nikkell, nifedipin, ω -conotoxin GVIA és NNC55-0396 együttes alkalmazásával ($n=8$ -8 sejt). D, A hosszú távú szinaptikus változások analóg modulációját vizsgáló kísérleteink összefoglaló grafikonja. Az oszlopok az uEPSP-k relatív változásait mutatják, míg körökkel jelöltük az uEPSP párosítás előtt és után (30-50 perccel később) mért amplitúdóját (kontroll: $p=0,013$; gátolt I_{Ca} : $p=0,99$; AP nélkül: $p=0,45$).

A potencírozás számszerűsítéséhez fél órával a párosítást követően megmértük az uEPSP amplitúdóját, és azt hasonlítottuk össze a kiindulási állapottal. Ezekben a kísérletekben azt találtuk, hogy sokkal nagyobb volt a potencírozás mértéke abban az esetben, ha a párosítást -60 mV-os kiindulási membránpotenciál mellett végeztük, mint akkor, ha -80 mV-ról váltottuk ki a bAP-kat (depolarizált: $179,1 \pm 15,1\%$; $-62,6 \pm 0,5$ mV-os membránpotenciál mellett, hiperpolarizált: $130,2 \pm 8,1\%$; $-81,4 \pm 0,5$ mV-os membránpotenciál mellett, $n=8$ sejt mindkét csoportban, $p=0,013$, t-teszt).

További kontroll kísérleteket is végeztünk azért, hogy a megváltozott hosszú távú potencírozás és a bAP analóg modulációja közötti ok-okozati viszonyt bizonyítani tudjunk. Erre azért volt szükség, mert bármiféle feszültségfüggő mechanizmus jelenléte hasonló eredményre vezethet. Arra kerestünk kísérletes bizonyítékot, hogy a megfigyelt membrán potenciál-függő eltéréshez valóban szükség van a bAP-ra és az ahhoz kapcsolt kalcium beáramlásra. Azt tapasztaltuk, hogy ugyanez a kísérleti protokoll a párosítási membránpotenciáltól független potencírozást eredményezett abban az esetben, ha farmakológiai gátlók segítségével megszüntettük a feszültségfüggő kalciumcsatornák működését (nikkel, nifedipin, ω -conotoxin GVIA és NNC55-0396 együttes alkalmazásával, depolarizált: $170,0 \pm 19,4\%$, hiperpolarizált: $169,7 \pm 18,6\%$, $p=0,99$, $n=8$ sejt mindkét csoportban). Akkor is megszűnt a szinapszisok erősödésének membránpotenciál-függése, ha bAP nélkül, pusztán a 300 uEPSP-t váltottuk ki a párosítási periódusban (depolarizált: $164,7 \pm 15,4 \%$, hiperpolarizált: $184,4 \pm 19,5 \%$, $n=6$ sejt mindkét csoportban, $p=0,447$, t-teszt). Ez együttesen azt jelenti, hogy mind a bAP, mind pedig a kalcium beáramlás alapvető fontosságú a megfigyelt membránpotenciál-függő szinaptikus potencírozódás kialakulásához.

A sejtestest membránpotenciálja tehát hatással van a disztális szinapszisok hosszú távú szabályozására, vagyis elmondhatjuk, hogy sejt képes a szinaptikus kapcsolatok szintjén is értelmezni a bAP-ban kódolt analóg információ tartalmát.

6. MEGBESZÉLÉS

Az értekezés első felében egy olyan kutatást mutattam be, amelyben a szemcsesejtek szomato-dendritikus membránfelszínén elhelyezkedő mGluII receptorok celluláris hatását és potenciális szerepét vizsgáltuk meg. A vizsgálataink alapján a receptor csoport farmakológiai aktiválása hiperpolarizáló hatású csatornanyitást eredményez. Bár a hasonló glutamáterg gátló folyamatok nem tekinthetők általánosnak, előfordulásukat több példa is bizonyítja a központi idegrendszerben^[137,139,181]. Megállapítottuk, hogy a hiperpolarizációt a szemcsesejtek dendritfájának egy rövid szakaszán elhelyezkedő mGluR2 receptor váltja ki, mely G-fehérjék közvetítésével GIRK csatornák nyitását idézi elő. A szemcsesejtekben tehát a preszinaptikus gátló hatáshoz hasonlóan az mGluR2 felelős a posztzinaptikus hatások kialakulásáért is. Az mGluII receptorokkal lényegében azonos jelátviteli útvonalakat használó GABA_B receptorok esetén leírták, hogy a receptor aktiváció hiperpolarizációt okozhat az axonális membránban is, ami a kalcium beáramlást gátló folyamatok mellett szintén hozzájárul a neurotranszmitter felszabadulás csökkenéséhez^[199]. A közvetlen axonális méréseink alapján a preszinaptikus mGluR2 működését nem kíséri hiperpolarizáció, vagyis a szemcsesejtekben a pre- és posztzinaptikus hatások elkülönülnek, ami az mGluR2 befolyásolását célzó gyógyszertervezések szempontjából is meghatározó tényező lehet.

Kísérleteink alapján a káliumionra ható minimális hajtóerő miatt a hiperpolarizáció mindössze 2-4 mV nagyságú változást jelent a nyugalmi membránpotenciál közelében. Ebben a feszültségtartományban feltehetőleg sokkal nagyobb jelentőséggel bír a bemenő ellenállásban mutatkozó erőteljes csökkenés (-28%), mint a csekély mértékű hiperpolarizáció. A bemenő ellenállás ilyen nagymértékű változása ugyanis már hatékonyan szabályozhatja a sejtekre érkező szinaptikus események feldolgozását. Mindemellett a sejt jelentősebb depolarizációja esetén már a hiperpolarizáció is komoly szabályozó erőként léphet fel, hiszen a méréseinknek megfelelően -65 mV-os membránpotenciál mellett már közel -7 mV nagyságú változást okoz az mGluR2 dendritikus aktivációja.

A kutatást kiterjesztettük más hippocampalis sejtípusokra is, hogy azonosítani tudjuk azokat a sejteket, melyeknek hasonló mechanizmus szabályozhatja a működését. Ebből a célból a CA régiók piramissejtjeit és három helyi interneuron típust vizsgáltunk meg, azonban egyik sejtípus sem mutatott mGluII receptorokhoz köthető posztzinaptikus gátló hatást, vagyis a mechanizmus csak a szemcsesejtekre jellemző a hippocampusban.

Az mGluR2 és a GIRK csatornák közötti kapcsolat helyének feltérképezéséhez egy olyan funkcionális vizsgálatot dolgoztunk ki, ami azon a gondolaton alapult, hogy egy térben korlátozott dendritikus konduktancia másképp hat a sejttestben mérhető feszültségjelre akkor, ha a dendriten keletkezett feszültségjel a terjedése során áthalad a konduktancia nyitás helyén, mint olyankor, amikor a terjedés nem érinti a gátolt régiót. Számítógépes modellezés segítségével igazoltuk, hogy a sejttestbe érkező események vizsgálata valóban alkalmas arra, hogy kijelölje a térben behatárolt konduktancia nyitás helyét. Az elvégzett kísérletek alapján a farmakológiailag aktiválható GIRK csatornák jelenléte a sejttest közelében (100–130 μm -re) a dendritfa egy rövid szakaszára korlátozódik. A modellezésünk alapján ez a specifikus elhelyezkedés a sejt integratív működésének összetett szabályozását teszi lehetővé. Az elhelyezkedéséből fakadóan ugyanis a mechanizmus nagy hatékonysággal és egyenletes mértékben képes gátolni az egyes dendritek külső részére érkező szinaptikus eseményeket. Emellett a gátlás kellően távol helyezkedik el a sejttesttől ahhoz, hogy csak kismértékben befolyásolja a közvetlenül nem érintett szomszédos dendritágak működését. Összességében tehát a gátló mechanizmus stratégiai elhelyezkedése lehetőséget ad a szemcsesejtek dendritág-specifikus szabályozására. Elméleti modellek alapján az egymástól független integrációs egységként működő szemcsesejt dendritek szerepet játszhatnak olyan alapvető folyamatokban, mint a tipikus térmezők kialakítása és dinamikus megváltoztatása, vagy az egymáshoz hasonló bemeneti mintázatok hatékony elkülönítése^[200-202]. A szemcsesejt dendritek erősen passzív viselkedése olyan impedancia viszonyokat teremt a dendritekben (lásd az értekezés második részét), amely nem kedvez a dendritágak izolált működésének. Az itt leírt gátló folyamat azonban az egyes dendritágak integratív „súlyát” finom hangolva bizonyos mértékű autonómiát biztosít a dendritágaknak. Bár úgy vélem, hogy a következtetéseink megalapozottak, a valós élettani szerep részletes megismeréséhez olyan ismeretre is szükség lenne, melyek pillanatnyilag még nem

állnak rendelkezésünkre. Fontos lenne tudni például, hogy honnan származik, és milyen élettani folyamatok hatására szabadul fel a receptorokat aktiváló glutamát. Természetesen az mGluR2 receptor térbeli elhelyezkedése adhat némi támpontot a glutamát lehetséges forrásának azonosításához is. A proximális dendriteken végződő idegrostok egyaránt származhatnak a mediális entorhinális kéreg projekciós neuronjaitól^[16,203], a hiláris mohasejtektől^[204], a nucleus supramammillarius vagy a ventralis tegmentum glutamáterg neuronjaitól^[24-26]. Mindemellett az is elképzelhető, hogy a glutamát nem is idegi rostokból, hanem a helyi gliasejtekből, például a dendritek közelében elhelyezkedő asztrocitákból szabadul fel^[205].

A másik bemutatott kísérletsorozatban annak jártunk utána, hogy a szemcsesejt dendritekbe visszaterjedő akciós potenciálok képesek lehetnek-e analóg információtartalom közvetítésére, hasonlóan, mint az axonban terjedő akciós potenciálok. Alapvetően két kérdéskört kellett megnyugtató módon tisztázni a válaszhoz. Először is, függ-e a bAP alakja a sejttest membránpotenciáljától, vagyis maga a bAP alkalmas-e az analóg információ tárolására és közvetítésére a digitális időzítési információ mellett. Másodszor, van-e olyan dendritikus folyamat, ami képes a felé irányított analóg többletinformációt hasznosítani. Vizsgálataink alapján ma már mindkét kérdésre igennel felelhetünk, hiszen bebizonyítottuk, hogy a bAP alakja függ a szomatikus membránpotenciáltól, és azt is láttuk, hogy az így kódolt információ hasznosul a szinapszisokban. Az eredményeink szerint a dendritikus kalcium beáramlás biztosítja a lehetőséget, hogy a feszültségjelként tárolt analóg információ elérhető legyen a dendritben zajló folyamatok számára.

Bár az elemi lépéseit tekintve a dendritikus hibrid moduláció nagyban hasonlít az axonális folyamatra, bizonyos vonatkozásaiban mégis eltér attól. Az egyik ilyen eltérés a jelenség távolságfüggése. Bár az axon elektrotónusos viselkedéséből adódóan az analóg moduláló hatás itt is mutathat távolságfüggést, ami abban nyilvánul meg, hogy a sejttesttől távolodva csökken a hatás mértéke. Ezzel szemben a dendritekben azt tapasztaltuk, hogy a sejttesttől távolodva egy ponton megváltozik a kódolási séma, mert a dendritek különböző pontjain a bAP más-más tulajdonsága hordozza ugyanazt az információt. A hatás kettőssége tükröződik a bAP-t kísérő kalcium beáramlásban is, hiszen ugyanaz az analóg információ a közeli és a távoli dendritek esetében egymással

ellentétes irányú változásokat eredményez. Érdekes módon ez a távolságfüggés jól korrelálható a szemcsesejtekre érkező serkentő szinaptikus kapcsolatok anatómiai elrendezésével. Nevezetesen a repolarizáció tükrözi az analóg állapotot abban a régióban, ahol a hippocampus-on belülről induló kapcsolatok, a mohasejt bemenetek végződnek. Míg az entorhinális kéregből érkező rostok a szemcsesejtek távolabbi dendrit szakaszára érkeznek, ahol a bAP csúcsa modulált. Ennek megfelelően a bAP kalcium jelei ugyanazt az állapotot ellentétes módon közvetítik e két serkentő pálya felé, vagyis a szemcsesejt depolarizált állapota a bAP-hoz társult kalcium jelek erősödését váltja ki a perforáns pálya szinapszisoknál, miközben az intrahippocampalis szinapszisok szintjén csökken a jel erőssége.

Azt is megmutattuk, hogy a dendrit mentén jól elkülönülő modulációs folyamatok a mechanizmusukból fakadóan eltérő időskálán állnak a sejt rendelkezésére. Míg a disztális dendritek kalciumjelei a gyors időskálán mozgó az analóg állapotváltozásokat is képesek közvetíteni, addig a bAP analóg modulációja sokkal lassabb változásokat tükröz a sejttesthez közeli dendritszakaszok esetében. A több időskálán mozgó analóg moduláció lehetősége az axonok esetében sem példa nélküli^[206], az igazán jelentős különbség az az, hogy az eltérő időskálán mozgó mechanizmusok térben is elkülönülve érvényesülnek a dendritekben. A kísérleteink rávilágítottak arra, miszerint a távoli dendritekben az analóg információátadás teljes mértékben elérhető a théta frekvenciájú membrándinamika mellett. Azt is tudjuk, hogy a DG-ben kialakuló théta ritmus egyik elsődleges forrása maga a perforáns pálya aktivitása, vagyis azoké a szinapszisoké, amikről most bemutattuk, hogy valóban érzékenyek a bAP analóg információtartalmára. Ennek alapján tehát joggal következtethetünk arra, hogy a szomatikus membránpotenciál valóban hatékony eszköz az új információt hordozó szinapszisok szabályozásában a hippocampus működése szempontjából kiemelt théta aktivitás alatt. A szemcsesejtek szomatikus membránpotenciálja követi a mély alvásra illetve altatott állapotra jellemző kérgi lassúhullám működést^[62], melynek lassabb dinamikája (~ 0,5 Hz) kedvező a proximális dendritekben zajló analóg jelátadás szempontjából. Tekintettel arra, hogy a lassúhullám aktivitás egyik lehetséges feladata az ébren begyűjtött információk utólagos feldolgozása^[207,208], az is elképzelhető, hogy míg a disztális hibrid jelátadás a memóriajelek kialakításában játszik szerepet, addig a

proximális dendritek analóg jelátadása funkcionálisan a memóriajelek konszolidációjához kapcsolható.

A bemutatott kísérletek alapján a dendritikus analóg moduláló hatás meglehetősen visszafogott mértékű, hiszen a bAP alakjának néhány mV-os eltéréséről és a kalcium beáramlás 10-20 %-os változásáról beszélünk. Nem szabad azonban elfelejteni, hogy ez egy moduláló mechanizmus, ami nem írhatja felül magát az elsődleges jelnek tekintett digitális tartalmat. A hasonló célt szolgáló axonális analóg folyamatok mértéke szintén ebben a tartományban mozog, ami arra utal, hogy a mért hatás egy általános és szükségszerű optimumnak tekinthető. Mindemellett az intracelluláris kalciumszint változásain alapuló folyamatok nagyon érzékenyek a kismértékű változásokra is, ami akár fel is erősítheti az analóg információ-többlet hatását, ahogy ezt tapasztaltuk a szinaptikus plasztikusságra gyakorolt hatás esetén.

A hibrid információ-továbbítás egyes elemei az irodalmi forrásokból is visszaköszönnek, bár ebben a kontextusban még senki nem vizsgálta a dendritek viselkedését. Például a striatum közepesen tüskés idegsejtjeiben megfigyelték, hogy a sejttesten végbemenő potenciálváltozások befolyásolják a bAP kalcium jeleit^[209]. Sajnálatos módon ez a megfigyelés egy szűk periszomatikus dendritszakasról ered, így nem ismerhetjük a folyamatok esetleges távolságfüggését. A bAP-alak membránpotenciál függő szabályozása pedig lehetséges a kérgi interneuronok esetében is^[89]. Az itt felhozott példák megerősítik, hogy a bAP-k dendritikus analóg modulációja nem a szemcsesejtek megkülönböztető tulajdonsága, hanem más idegsejtben információ feldolgozásában is szerepet játszhat.

Az az általános tapasztalat, hogy az AP keskenyedés törvényszerűen kisebb kalcium beáramlást von maga után. Ennek tükrében különösen érdekes az a megfigyelésünk, hogy a keskenyebb AP nagyobb kalcium beáramlással is járt. Azt is bemutattuk azonban, hogy több peremfeltételnek is teljesülnie kell ahhoz, hogy az AP szélessége és a kalcium beáramlás közötti viszony megfordulhasson. Az egyik ilyen feltétel a gyorsan inaktiválódó kalciumcsatornák jelenléte. Számos adat utal arra, hogy az ilyen tulajdonságokkal bíró R-típusú kalciumáramok általánosan előfordulnak a különféle idegsejtben. Az is kiderült azonban, hogy az R-áram feszültségfüggése és kinetikai profilja sejttípusonként változhat. Ennek megfelelően jelenleg még megbecsülni is

nehéz lenne, hogy melyek azok a sejtek, ahol az AP és a kalcium beáramlás viszonya az általunk a szemcsesejteken leírt módon valósul meg. Különösen, ha figyelembe vesszük azt is, hogy a gyors inaktiváció csak szükséges, de nem elégséges feltétele a kalcium és az AP alak közötti viszony megfordulásának. Ugyanígy szükséges az is, hogy az AP felfutása alatt eltelt idő elegendő legyen az összes elérhető kalciumcsatorna aktiválásához. Ha ez a feltétel nem teljesül, akkor az AP szélesedése további kalciumcsatornák kinyílásához illetve nyitva maradásához, vagyis nagyobb kalcium beáramláshoz vezet. Kísérletesen igazoltuk, hogy az elvezetési körülményeink között a szemcsesejteken közel teljes csatorna aktiváció kíséri az AP felfutását. Ez a feltétel azonban nem valószínű, hogy teljesülni tud például egy axonban, ahol az AP lefutása általában sokkal gyorsabb, mint a sejttestben vagy a dendriteken.

Mindkét kutatásom sarkalatos pontja a megfigyelt folyamatok térfüggése, ugyanis az eredményeim jól példázzák, hogy maga a térfüggés előre nem látható többletfunkciókat rendelhet hozzá egy vizsgált folyamathoz.

Végezetül szeretnék még pár gondolatot írni a két kutatás meg nem válaszolt jövőbeli kérdéseiről, ami későbbi vizsgálatok táptalaja lehet. A glutamáterg gátlással kapcsolatban a legfontosabb nyitott kérdés egyértelműen a glutamát forrásának azonosítása, ami kulcsfontosságú lépés lenne annak részletes megértése felé, hogy a most bemutatott folyamat hogyan juthat érvényre a sejtekben. Azt gondolom, hogy az optogenetika segítségével a kérdés a jövőben megválaszolható lesz. Nem foglalkoztunk a kérdéssel, de mindenképpen érdekes lenne tudni, hogy a szemcsesejteken az mGluR2 aktivitása mely más metabotróp receptorok működésére lehet hatással. Tudjuk ugyanis, hogy a metabotróp receptorok - többek között az mGluR2 is - egyrészt funkcionális heteromer komplexet formálva közvetlenül is kapcsolódhatnak más típusú receptorokhoz, másrészt a metabotróp receptorok befolyásolják egymás intracelluláris jelátviteli folyamatait is. Ennek megfelelően a dendritikus mGluR2 nemcsak az itt bemutatott közvetlen folyamaton keresztül szabályozhatja a szemcsesejt működését, hanem más metabotróp folyamatok szabályozásán keresztül is. Például a kérgi piramissejteken az mGluR2 komplexet képezhet az 5-HT_{2A} metabotróp szerotonin receptorral. Ebben az esetben a fizikai kölcsönhatás módosítja a receptorok farmakológiai profilját, és befolyásolja a jelátviteli mechanizmust is^[210]. Természetesen

a kérdés fordítva is feltehető, vagyis az is különösen érdekes lehet, hogy más metabotróp folyamatok milyen mértékben képesek hatni az itt bemutatott posztszinaptikus mGluR2 hatásra.

A dendritikus analóg moduláció vizsgálata szintén további kérdéseket vet fel. Először is látni kell, hogy a bAP hibrid információtartalmát felhasználó lehetséges folyamatok tárháza sokkal szélesebb, mint a szinapszisok erősségének változtatása, amit mi példaként bemutatottunk. A bAP-hoz kötött kalciumbeáramlás közvetlen kapcsolatot biztosít a sejt elektromos aktivitása és a sejten belüli jelátviteli útvonalak között., ezért minden olyan mechanizmus felhasználhatja a bAP alakjába csomagolt többletinformációt, amit befolyásol a dendriten belüli kalciumkoncentráció aktivitásfüggő dinamikája. Ilyen folyamat lehet például az idegi aktivitás homeosztatikus szabályozása, amikor az idegsejtek aktivitása belső („intrinsic”) plaszticitási mechanizmusokon keresztül visszahat a sejtek serkentetőségére. Ebben a folyamatban az intracelluláris kalciumszint aktivitásfüggő változásai a sejtmembrán ioncsatorna készletének átalakulásához vezetnek^[211].

Ha azonban csak a szinaptikus plasztikusságra fókuszálunk, akkor is a lehetséges hatások zavarba ejtő sokaságával találjuk szembe magunkat, ami a különféle szinapszisok szabályozásának eltérő tér-, idő-, és aktivitásigényéből fakad.

7. KÖVETKEZTETÉSEK

A doktori értekezés következtetései az alábbi pontokban foglalhatók össze:

- Kimutattuk, hogy a dendritikusan elhelyezkedő mGluR2 aktivációja GIRK csatornák kinyitását eredményezi a szemcsesejtekben.
- Vizsgálataink alapján az mGluR2-kapcsolt káliumcsatorna nyitás egy jól körülhatárolható, rövid dendritszakaszon történik, a sejttest közelében.
- A gátlás térbeli helyzete alapján arra következtettünk, hogy az mGluR2-kapcsolt mechanizmus az egyes dendritágak szelektív és egyenletes szabályozását segítheti elő.
- Méréseink szerint a hippocampus-ban csak a szemcsesejtekben van jelen a vizsgált metabotróp szabályozó mechanizmus.
- A sejttest membránpotenciálja távolságfüggő módon befolyásolja a visszaterjedő akciós potenciálok alakját a szemcsesejt dendritekben.
- A sejttest membránpotenciálja távolságfüggő és kétirányú módon befolyásolja a visszaterjedő akciós potenciálokhoz kapcsolódó dendritikus kalciumjelek nagyságát.
- A távoli dendritszakaszokon a kalciumjelek követik a bAP csúcsában bekövetkező változásokat.
- A sejttesthez közeli dendritekben a gyorsabb lefutású akciós potenciálokhoz nagyobb kalcium beáramlás társul, amiben kulcsszerepet játszanak az R-típusú kalciumcsatornák.
- A bAP-k analóg modulációja követheti a sejttest membránpotenciáljának dinamikus változásait is.
- Az általunk leírt dendritikus hibrid jelátadás analóg információtartalma hasznosul a dendritekben zajló folyamatokban, például a szinapszisok erősségének szabályozásában.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

A gyurus dentatus szemcsesejtek aktív résztvevői a hippocampus-ban zajló információ feldolgozási és tanulási folyamatoknak. Egy ilyen összetett feladatkör ellátása sokrétű jelfeldolgozást feltételez a szemcsesejtek dendritjeiben, és a háttérben álló dendritikus mechanizmusok ismerete – a sejt eszköztárának megismerése – megkerülhetetlen lépés a szemcsesejtek működésének megértéséhez. A doktori értekezésemben két olyan tanulmányt mutatok be, melyek e dendritikus folyamatok vizsgálatát célozták.

Az elsőként bemutatott munkában az volt a célunk, hogy feltárjuk a dendritikus mGluII receptorok hatását a szemcsesejteken. Tudtuk, hogy ezek a receptorok jelen vannak a szemcsesejtek dendritfáján, de a hatásuk és feltételezett szerepük mindeddig tisztázatlan maradt. A vizsgálat során egy olyan gátló mechanizmust írtunk le, melyben az mGluR2 aktiválása dendritikus GIRK csatornák nyílását eredményezi. Azt is megmutattuk, hogy ez a funkcionális csatornanyitás egy szűk dendritikus régióban történik, közel a sejttesthez. Eredményeink rávilágítottak, hogy ez a különleges elhelyezkedés lehetővé teszi az egyes dendritágak szelektív és hatékony szabályozását miközben egyenletes hatást biztosít az adott dendritágon belül.

Az értekezés második felében arra kerestük a választ, hogy a dendritekbe visszaterjedő akciós potenciálok (bAP-k) képesek-e a sejttest pillanatnyi állapotát tükröző analóg információ tárolására és továbbítására a dendritek felé. Eredményeink azt bizonyítják, hogy a sejttest állapotát jelző analóg információ távolságfüggő módon kódolva van a bAP alakjában és az ahhoz társuló kalcium beáramlásban. Vizsgálataink alapján elmondhatjuk, hogy többféle mechanizmus térben összehangolt működése felelős a dendritikus analóg jelátadásért. Azt is megmutattuk, hogy a bAP-ban kódolt analóg információ tartalom hasznosul a távoli dendritek szinapszisaiban, például a plaszticitási folyamatok során.

9. SUMMARY

Granule cells of the dentate gyrus are active participants in the hippocampus-related information processing. Serving such complex neuronal functions require multifarious dendritic signal processing in granule cells. Exploring the underlying dendritic mechanisms – the so called dendritic toolbox – is an inevitable step toward the understanding of the granule cell function. Two studies aimed to reveal such dendritic mechanisms are presented in this thesis.

In the first part of the dissertation we examined the role of the dendritically localized type II metabotropic glutamate receptors (mGluII receptors) in granule cells. Localization of these mGluII receptors have been described in granule cells but their function has not been investigated so far. We characterized an inhibitory mechanism in the granule cells in which dendritic mGluR2-activation leads to G-protein mediated activation of GIRK channels. We also showed that the mGluR2-associated GIRK channel opening is restricted to a short dendritic segment in the proximal dendrites close to the soma. We demonstrated that the strategic dendritic location of the mGluR2 effect enables the selective and uniform control of individual dendrites.

In the second part of the dissertation we asked whether backpropagating action potentials (bAPs) in granule cells are able to convey analog information about the overall state of the soma toward the dendrites. We found that analog information about the soma is retained by the bAP waveform and by local dendritic calcium signaling. The analog modulation of bAPs in the dendrites is mediated by multiple mechanisms that are coordinated in a location-dependent manner. We also showed that analog information content of hybrid bAP signaling is reflected by the long-term modulation of distal dendritic synapses.

10. IRODALOMJEGYZÉK

1. Buzsaki G & Moser EI. (2013) Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system. *Nat Neurosci*, 16(2):130-138.
2. Ito HT, Zhang SJ, Witter MP, Moser EI, & Moser MB. (2015) A prefrontal-thalamo-hippocampal circuit for goal-directed spatial navigation. *Nature*, 522(7554):50-55.
3. Preston AR & Eichenbaum H. (2013) Interplay of hippocampus and prefrontal cortex in memory. *Curr Biol*, 23(17):R764-773.
4. Harrison PJ. (2004) The hippocampus in schizophrenia: a review of the neuropathological evidence and its pathophysiological implications. *Psychopharmacology (Berl)*, 174(1):151-162.
5. Ball MJ, Fisman M, Hachinski V, Blume W, Fox A, Kral VA, Kirshen AJ, Fox H, & Merskey H. (1985) A new definition of Alzheimer's disease: a hippocampal dementia. *Lancet*, 1(8419):14-16.
6. Lorente de Nó R. (1934) Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *J. Psychol. Neurol.*, 46:133-177.
7. Amaral DG. (1978) A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *J Comp Neurol*, 182(4 Pt 2):851-914.
8. Deng W, Aimone JB, & Gage FH. (2010) New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci*, 11(5):339-350.
9. Ramón y Cajal S Estructura del asta de Ammon y fascia dentata. *Anal. Soc. Esp. Hist. Nat.* , Madrid, 1893: 53–114.
10. Ramón y Cajal S & Azoulay L *Histologie du système nerveux de l'homme & des vertébrés*. Maloine, Paris, 1911: 733-799.
11. Scharfman HE. (2007) The CA3 "backprojection" to the dentate gyrus. *Prog Brain Res*, 163:627-637.
12. Witter MP. (2007) The perforant path: projections from the entorhinal cortex to the dentate gyrus. *Prog Brain Res*, 163:43-61.

13. Lein ES, Callaway EM, Albright TD, & Gage FH. (2005) Redefining the boundaries of the hippocampal CA2 subfield in the mouse using gene expression and 3-dimensional reconstruction. *J Comp Neurol*, 485(1):1-10.
14. Lee SE, Simons SB, Heldt SA, Zhao M, Schroeder JP, Vellano CP, Cowan DP, Ramineni S, Yates CK, Feng Y, Smith Y, Sweatt JD, Weinshenker D, Ressler KJ, Dudek SM, & Hepler JR. (2010) RGS14 is a natural suppressor of both synaptic plasticity in CA2 neurons and hippocampal-based learning and memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(39):16994-16998.
15. Kohara K, Pignatelli M, Rivest AJ, Jung HY, Kitamura T, Suh J, Frank D, Kajikawa K, Mise N, Obata Y, Wickersham IR, & Tonegawa S. (2014) Cell type-specific genetic and optogenetic tools reveal hippocampal CA2 circuits. *Nat Neurosci*, 17(2):269-279.
16. Deller T, Martinez A, Nitsch R, & Frotscher M. (1996) A novel entorhinal projection to the rat dentate gyrus: direct innervation of proximal dendrites and cell bodies of granule cells and GABAergic neurons. *J Neurosci*, 16(10):3322-3333.
17. Buzsaki G *Rhythms of the Brain*. Oxford University Press, New York, 2006: 277-333.
18. Kullmann DM. (2011) Interneuron networks in the hippocampus. *Curr Opin Neurobiol*, 21(5):709-716.
19. Roux L & Buzsaki G. (2015) Tasks for inhibitory interneurons in intact brain circuits. *Neuropharmacology*, 88:10-23.
20. Kepecs A & Fishell G. (2014) Interneuron cell types are fit to function. *Nature*, 505(7483):318-326.
21. Wyss JM, Swanson LW, & Cowan WM. (1979) A study of subcortical afferents to the hippocampal formation in the rat. *Neuroscience*, 4(4):463-476.
22. Leranath C & Hajszan T. (2007) Extrinsic afferent systems to the dentate gyrus. *Prog Brain Res*, 163:63-84.
23. Wyss JM, Swanson LW, & Cowan WM. (1979) Evidence for an input to the molecular layer and the stratum granulosum of the dentate gyrus from the supramammillary region of the hypothalamus. *Anat Embryol (Berl)*, 156(2):165-176.

24. Ntamati NR & Luscher C. (2016) VTA Projection Neurons Releasing GABA and Glutamate in the Dentate Gyrus. *eneuro*, 3(4).
25. Magloczky Z, Acsady L, & Freund TF. (1994) Principal cells are the postsynaptic targets of supramammillary afferents in the hippocampus of the rat. *Hippocampus*, 4(3):322-334.
26. Soussi R, Zhang N, Tahtakran S, Houser CR, & Esclapez M. (2010) Heterogeneity of the supramammillary-hippocampal pathways: evidence for a unique GABAergic neurotransmitter phenotype and regional differences. *Eur J Neurosci*, 32(5):771-785.
27. Boulland JL, Jenstad M, Boekel AJ, Wouterlood FG, Edwards RH, Storm-Mathisen J, & Chaudhry FA. (2009) Vesicular glutamate and GABA transporters sort to distinct sets of vesicles in a population of presynaptic terminals. *Cereb Cortex*, 19(1):241-248.
28. Marr D. (1971) Simple memory: a theory for archicortex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 262(841):23-81.
29. Treves A & Rolls ET. (1994) Computational analysis of the role of the hippocampus in memory. *Hippocampus*, 4(3):374-391.
30. Leutgeb JK, Leutgeb S, Moser MB, & Moser EI. (2007) Pattern separation in the dentate gyrus and CA3 of the hippocampus. *Science*, 315(5814):961-966.
31. Santoro A. (2013) Reassessing pattern separation in the dentate gyrus. *Front Behav Neurosci*, 7:96.
32. Tonegawa S, Liu X, Ramirez S, & Redondo R. (2015) Memory Engram Cells Have Come of Age. *Neuron*, 87(5):918-931.
33. Denny CA, Kheirbek MA, Alba EL, Tanaka KF, Brachman RA, Laughman KB, Tamm NK, Turi GF, Losonczy A, & Hen R. (2014) Hippocampal memory traces are differentially modulated by experience, time, and adult neurogenesis. *Neuron*, 83(1):189-201.
34. O'Keefe J & Dostrovsky J. (1971) The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res*, 34(1):171-175.

35. GoodSmith D, Chen X, Wang C, Kim SH, Song H, Burgalossi A, Christian KM, & Knierim JJ. (2017) Spatial Representations of Granule Cells and Mossy Cells of the Dentate Gyrus. *Neuron*, 93(3):677-690.e675.
36. Jung MW & McNaughton BL. (1993) Spatial selectivity of unit activity in the hippocampal granular layer. *Hippocampus*, 3(2):165-182.
37. Neunuebel JP & Knierim JJ. (2012) Spatial firing correlates of physiologically distinct cell types of the rat dentate gyrus. *J Neurosci*, 32(11):3848-3858.
38. Senzai Y & Buzsaki G. (2017) Physiological Properties and Behavioral Correlates of Hippocampal Granule Cells and Mossy Cells. *Neuron*, 93(3):691-704.e695.
39. Danielson NB, Turi GF, Ladow M, Chavlis S, Petrantonakis PC, Poirazi P, & Losonczy A. (2017) In Vivo Imaging of Dentate Gyrus Mossy Cells in Behaving Mice. *Neuron*, 93(3):552-559.e554.
40. Bittner KC, Grienberger C, Vaidya SP, Milstein AD, Macklin JJ, Suh J, Tonegawa S, & Magee JC. (2015) Conjunctive input processing drives feature selectivity in hippocampal CA1 neurons. *Nat Neurosci*, 18(8):1133-1142.
41. Bayer SA. (1982) Changes in the total number of dentate granule cells in juvenile and adult rats: a correlated volumetric and 3H-thymidine autoradiographic study. *Exp Brain Res*, 46(3):315-323.
42. Schneider CJ, Bezaire M, & Soltesz I. (2012) Toward a full-scale computational model of the rat dentate gyrus. *Front Neural Circuits*, 6:83.
43. Claiborne BJ, Amaral DG, & Cowan WM. (1990) Quantitative, three-dimensional analysis of granule cell dendrites in the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol*, 302(2):206-219.
44. Desmond NL & Levy WB. (1985) Granule cell dendritic spine density in the rat hippocampus varies with spine shape and location. *Neurosci Lett*, 54(2-3):219-224.
45. Hama K, Arii T, & Kosaka T. (1989) Three-dimensional morphometrical study of dendritic spines of the granule cell in the rat dentate gyrus with HVEM stereo images. *J Electron Microsc Tech*, 12(2):80-87.

46. Schmidt-Hieber C, Jonas P, & Bischofberger J. (2007) Subthreshold dendritic signal processing and coincidence detection in dentate gyrus granule cells. *J Neurosci*, 27(31):8430-8441.
47. Megias M, Emri Z, Freund TF, & Gulyas AI. (2001) Total number and distribution of inhibitory and excitatory synapses on hippocampal CA1 pyramidal cells. *Neuroscience*, 102(3):527-540.
48. Claiborne BJ, Amaral DG, & Cowan WM. (1986) A light and electron microscopic analysis of the mossy fibers of the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol*, 246(4):435-458.
49. Acsady L, Kamondi A, Sik A, Freund T, & Buzsaki G. (1998) GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus. *J Neurosci*, 18(9):3386-3403.
50. Mori M, Abegg MH, Gahwiler BH, & Gerber U. (2004) A frequency-dependent switch from inhibition to excitation in a hippocampal unitary circuit. *Nature*, 431(7007):453-456.
51. Lawrence JJ & McBain CJ. (2003) Interneuron diversity series: containing the detonation--feedforward inhibition in the CA3 hippocampus. *Trends Neurosci*, 26(11):631-640.
52. Zucca S, Griguoli M, Malezieux M, Grosjean N, Carta M, & Mulle C. (2017) Control of Spike Transfer at Hippocampal Mossy Fiber Synapses In Vivo by GABAA and GABAB Receptor-Mediated Inhibition. *J Neurosci*, 37(3):587-598.
53. Roy DS, Arons A, Mitchell TI, Pignatelli M, Ryan TJ, & Tonegawa S. (2016) Memory retrieval by activating engram cells in mouse models of early Alzheimer's disease. *Nature*, 531(7595):508-512.
54. O'Malley A, O'Connell C, Murphy KJ, & Regan CM. (2000) Transient spine density increases in the mid-molecular layer of hippocampal dentate gyrus accompany consolidation of a spatial learning task in the rodent. *Neuroscience*, 99(2):229-232.
55. Ruediger S, Vittori C, Bednarek E, Genoud C, Strata P, Sacchetti B, & Caroni P. (2011) Learning-related feedforward inhibitory connectivity growth required for memory precision. *Nature*, 473(7348):514-518.

56. Scharfman HE & Schwartzkroin PA. (1990) Responses of cells of the rat fascia dentata to prolonged stimulation of the perforant path: sensitivity of hilar cells and changes in granule cell excitability. *Neuroscience*, 35(3):491-504.
57. Staley KJ, Otis TS, & Mody I. (1992) Membrane properties of dentate gyrus granule cells: comparison of sharp microelectrode and whole-cell recordings. *J Neurophysiol*, 67(5):1346-1358.
58. Krueppel R, Remy S, & Beck H. (2011) Dendritic integration in hippocampal dentate granule cells. *Neuron*, 71(3):512-528.
59. Munoz MD, Nunez A, & Garcia-Austt E. (1990) In vivo intracellular analysis of rat dentate granule cells. *Brain Res*, 509(1):91-98.
60. Penttonen M, Kamondi A, Sik A, Acsady L, & Buzsaki G. (1997) Feed-forward and feed-back activation of the dentate gyrus in vivo during dentate spikes and sharp wave bursts. *Hippocampus*, 7(4):437-450.
61. Kowalski J, Gan J, Jonas P, & Pernia-Andrade AJ. (2016) Intrinsic membrane properties determine hippocampal differential firing pattern in vivo in anesthetized rats. *Hippocampus*, 26(5):668-682.
62. Hahn TT, Sakmann B, & Mehta MR. (2007) Differential responses of hippocampal subfields to cortical up-down states. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(12):5169-5174.
63. Pernia-Andrade AJ & Jonas P. (2014) Theta-gamma-modulated synaptic currents in hippocampal granule cells in vivo define a mechanism for network oscillations. *Neuron*, 81(1):140-152.
64. Lee SH, Marchionni I, Bezaire M, Varga C, Danielson N, Lovett-Barron M, Losonczy A, & Soltesz I. (2014) Parvalbumin-positive basket cells differentiate among hippocampal pyramidal cells. *Neuron*, 82(5):1129-1144.
65. Valero M, Cid E, Averkin RG, Aguilar J, Sanchez-Aguilera A, Viney TJ, Gomez-Dominguez D, Bellistri E, & de la Prida LM. (2015) Determinants of different deep and superficial CA1 pyramidal cell dynamics during sharp-wave ripples. *Nat Neurosci*, 18(9):1281-1290.
66. Nakamura NH, Flasbeck V, Maingret N, Kitsukawa T, & Sauvage MM. (2013) Proximodistal segregation of nonspatial information in CA3: preferential

- recruitment of a proximal CA3-distal CA1 network in nonspatial recognition memory. *J Neurosci*, 33(28):11506-11514.
67. van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, & Gage FH. (2002) Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*, 415(6875):1030-1034.
 68. Zhao C, Deng W, & Gage FH. (2008) Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell*, 132(4):645-660.
 69. Wang S, Scott BW, & Wojtowicz JM. (2000) Heterogenous properties of dentate granule neurons in the adult rat. *J Neurobiol*, 42(2):248-257.
 70. Schmidt-Hieber C, Jonas P, & Bischofberger J. (2004) Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature*, 429(6988):184-187.
 71. Laplagne DA, Esposito MS, Piatti VC, Morgenstern NA, Zhao C, van Praag H, Gage FH, & Schinder AF. (2006) Functional convergence of neurons generated in the developing and adult hippocampus. *PLoS Biol*, 4(12):e409.
 72. Toni N, Laplagne DA, Zhao C, Lombardi G, Ribak CE, Gage FH, & Schinder AF. (2008) Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. *Nat Neurosci*, 11(8):901-907.
 73. Mongiat LA, Esposito MS, Lombardi G, & Schinder AF. (2009) Reliable activation of immature neurons in the adult hippocampus. *Plos One*, 4(4):e5320.
 74. Gu Y, Arruda-Carvalho M, Wang J, Janoschka SR, Josselyn SA, Frankland PW, & Ge S. (2012) Optical controlling reveals time-dependent roles for adult-born dentate granule cells. *Nat Neurosci*, 15(12):1700-1706.
 75. Marin-Burgin A, Mongiat LA, Pardi MB, & Schinder AF. (2012) Unique processing during a period of high excitation/inhibition balance in adult-born neurons. *Science*, 335(6073):1238-1242.
 76. Vivar C, Potter MC, Choi J, Lee JY, Stringer TP, Callaway EM, Gage FH, Suh H, & van Praag H. (2012) Monosynaptic inputs to new neurons in the dentate gyrus. *Nat Commun*, 3:1107.
 77. Dieni CV, Nietz AK, Panichi R, Wadiche JI, & Overstreet-Wadiche L. (2013) Distinct determinants of sparse activation during granule cell maturation. *J Neurosci*, 33(49):19131-19142.

78. Markwardt SJ, Dieni CV, Wadiche JI, & Overstreet-Wadiche L. (2011) Ivy/neurogliaform interneurons coordinate activity in the neurogenic niche. *Nat Neurosci*, 14(11):1407-1409.
79. Chancey JH, Poulsen DJ, Wadiche JI, & Overstreet-Wadiche L. (2014) Hilar mossy cells provide the first glutamatergic synapses to adult-born dentate granule cells. *J Neurosci*, 34(6):2349-2354.
80. Brunner J, Neubrandt M, Van-Weert S, Andrasi T, Kleine Borgmann FB, Jessberger S, & Szabadics J. (2014) Adult-born granule cells mature through two functionally distinct states. *eLife*, 3:e03104.
81. Henze DA, Wittner L, & Buzsaki G. (2002) Single granule cells reliably discharge targets in the hippocampal CA3 network in vivo. *Nat Neurosci*, 5(8):790-795.
82. Lisman JE. (1997) Bursts as a unit of neural information: making unreliable synapses reliable. *Trends Neurosci*, 20(1):38-43.
83. Sherman SM. (2001) Tonic and burst firing: dual modes of thalamocortical relay. *Trends Neurosci*, 24(2):122-126.
84. Kaifosh P & Losonczy A. (2016) Mnemonic Functions for Nonlinear Dendritic Integration in Hippocampal Pyramidal Circuits. *Neuron*, 90(3):622-634.
85. London M & Hausser M. (2005) Dendritic computation. *Annu Rev Neurosci*, 28:503-532.
86. Silver RA. (2010) Neuronal arithmetic. *Nat Rev Neurosci*, 11(7):474-489.
87. Gullledge AT, Kampa BM, & Stuart GJ. (2005) Synaptic integration in dendritic trees. *J Neurobiol*, 64(1):75-90.
88. Riazanski V, Becker A, Chen J, Sochivko D, Lie A, Wiestler OD, Elger CE, & Beck H. (2001) Functional and molecular analysis of transient voltage-dependent K⁺ currents in rat hippocampal granule cells. *J Physiol*, 537(Pt 2):391-406.
89. Korngreen A, Kaiser KM, & Zilberter Y. (2005) Subthreshold inactivation of voltage-gated K⁺ channels modulates action potentials in neocortical bitufted interneurons from rats. *J Physiol*, 562(Pt 2):421-437.

90. Migliore M, Hoffman DA, Magee JC, & Johnston D. (1999) Role of an A-type K⁺ conductance in the back-propagation of action potentials in the dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *J Comput Neurosci*, 7(1):5-15.
91. Johnston D, Christie BR, Frick A, Gray R, Hoffman DA, Schexnayder LK, Watanabe S, & Yuan LL. (2003) Active dendrites, potassium channels and synaptic plasticity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 358(1432):667-674.
92. Goldberg JH, Tamas G, & Yuste R. (2003) Ca²⁺ imaging of mouse neocortical interneurone dendrites: Ia-type K⁺ channels control action potential backpropagation. *J Physiol*, 551(Pt 1):49-65.
93. Beck H, Ficker E, & Heinemann U. (1992) Properties of two voltage-activated potassium currents in acutely isolated juvenile rat dentate gyrus granule cells. *J Neurophysiol*, 68(6):2086-2099.
94. Hoffman DA, Magee JC, Colbert CM, & Johnston D. (1997) K⁺ channel regulation of signal propagation in dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Nature*, 387(6636):869-875.
95. Blaxter TJ, Carlen PL, & Niesen C. (1989) Pharmacological and anatomical separation of calcium currents in rat dentate granule neurones in vitro. *J Physiol*, 412:93-112.
96. Eliot LS & Johnston D. (1994) Multiple components of calcium current in acutely dissociated dentate gyrus granule neurons. *J Neurophysiol*, 72(2):762-777.
97. Beck H, Steffens R, Heinemann U, & Elger CE. (1997) Properties of voltage-activated Ca²⁺ currents in acutely isolated human hippocampal granule cells. *J Neurophysiol*, 77(3):1526-1537.
98. Sochivko D, Pereverzev A, Smyth N, Gissel C, Schneider T, & Beck H. (2002) The Ca(V)_{2.3} Ca(2⁺) channel subunit contributes to R-type Ca(2⁺) currents in murine hippocampal and neocortical neurones. *J Physiol*, 542(Pt 3):699-710.
99. Johnston D, Hoffman DA, Magee JC, Poolos NP, Watanabe S, Colbert CM, & Migliore M. (2000) Dendritic potassium channels in hippocampal pyramidal neurons. *J Physiol*, 525 Pt 1:75-81.
100. Magee JC. (2000) Dendritic integration of excitatory synaptic input. *Nat Rev Neurosci*, 1(3):181-190.

101. Stuart G, Spruston N, Sakmann B, & Hausser M. (1997) Action potential initiation and backpropagation in neurons of the mammalian CNS. *Trends Neurosci*, 20(3):125-131.
102. Waters J, Schaefer A, & Sakmann B. (2005) Backpropagating action potentials in neurones: measurement, mechanisms and potential functions. *Prog Biophys Mol Biol*, 87(1):145-170.
103. Stuart GJ & Hausser M. (2001) Dendritic coincidence detection of EPSPs and action potentials. *Nat Neurosci*, 4(1):63-71.
104. Golding NL, Staff NP, & Spruston N. (2002) Dendritic spikes as a mechanism for cooperative long-term potentiation. *Nature*, 418(6895):326-331.
105. Lisman J & Spruston N. (2005) Postsynaptic depolarization requirements for LTP and LTD: a critique of spike timing-dependent plasticity. *Nat Neurosci*, 8(7):839-841.
106. Kampa BM, Letzkus JJ, & Stuart GJ. (2007) Dendritic mechanisms controlling spike-timing-dependent synaptic plasticity. *Trends Neurosci*, 30(9):456-463.
107. Caporale N & Dan Y. (2008) Spike timing-dependent plasticity: a Hebbian learning rule. *Annu Rev Neurosci*, 31:25-46.
108. Magee JC & Johnston D. (1997) A synaptically controlled, associative signal for Hebbian plasticity in hippocampal neurons. *Science*, 275(5297):209-213.
109. Larkum ME, Zhu JJ, & Sakmann B. (1999) A new cellular mechanism for coupling inputs arriving at different cortical layers. *Nature*, 398(6725):338-341.
110. Waters J & Helmchen F. (2004) Boosting of action potential backpropagation by neocortical network activity in vivo. *J Neurosci*, 24(49):11127-11136.
111. Markram H, Helm PJ, & Sakmann B. (1995) Dendritic calcium transients evoked by single back-propagating action potentials in rat neocortical pyramidal neurons. *J Physiol*, 485 (Pt 1):1-20.
112. Sjostrom PJ, Rancz EA, Roth A, & Hausser M. (2008) Dendritic excitability and synaptic plasticity. *Physiol Rev*, 88(2):769-840.
113. Golding NL & Spruston N. (1998) Dendritic sodium spikes are variable triggers of axonal action potentials in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Neuron*, 21(5):1189-1200.

114. Schiller J, Schiller Y, Stuart G, & Sakmann B. (1997) Calcium action potentials restricted to distal apical dendrites of rat neocortical pyramidal neurons. *J Physiol*, 505 (Pt 3):605-616.
115. Schiller J, Major G, Koester HJ, & Schiller Y. (2000) NMDA spikes in basal dendrites of cortical pyramidal neurons. *Nature*, 404(6775):285-289.
116. Major G, Larkum ME, & Schiller J. (2013) Active properties of neocortical pyramidal neuron dendrites. *Annu Rev Neurosci*, 36:1-24.
117. Polsky A, Mel B, & Schiller J. (2009) Encoding and decoding bursts by NMDA spikes in basal dendrites of layer 5 pyramidal neurons. *J Neurosci*, 29(38):11891-11903.
118. Grienberger C, Chen X, & Konnerth A. (2014) NMDA receptor-dependent multidendrite Ca(2+) spikes required for hippocampal burst firing in vivo. *Neuron*, 81(6):1274-1281.
119. Swanson CJ, Bures M, Johnson MP, Linden AM, Monn JA, & Schoepp DD. (2005) Metabotropic glutamate receptors as novel targets for anxiety and stress disorders. *Nat Rev Drug Discov*, 4(2):131-144.
120. Patil ST, Zhang L, Martenyi F, Lowe SL, Jackson KA, Andreev BV, Avedisova AS, Bardenstein LM, Gurovich IY, Morozova MA, Mosolov SN, Neznanov NG, Reznik AM, Smulevich AB, Tochilov VA, Johnson BG, Monn JA, & Schoepp DD. (2007) Activation of mGlu2/3 receptors as a new approach to treat schizophrenia: a randomized Phase 2 clinical trial. *Nat Med*, 13(9):1102-1107.
121. Kenny PJ & Markou A. (2004) The ups and downs of addiction: role of metabotropic glutamate receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 25(5):265-272.
122. Moussawi K & Kalivas PW. (2010) Group II metabotropic glutamate receptors (mGlu2/3) in drug addiction. *Eur J Pharmacol*, 639(1-3):115-122.
123. Schoepp DD, Johnson BG, Salhoff CR, Valli MJ, Desai MA, Burnett JP, Mayne NG, & Monn JA. (1995) Selective inhibition of forskolin-stimulated cyclic AMP formation in rat hippocampus by a novel mGluR agonist, 2R,4R-4-aminopyrrolidine-2,4- dicarboxylate. *Neuropharmacology*, 34(8):843-850.
124. Yoshino M & Kamiya H. (1995) Suppression of presynaptic calcium influx by metabotropic glutamate receptor agonists in neonatal rat hippocampus. *Brain Res*, 695(2):179-185.

125. Schoepp DD. (2001) Unveiling the functions of presynaptic metabotropic glutamate receptors in the central nervous system. *J Pharmacol Exp Ther*, 299(1):12-20.
126. Shigemoto R, Kinoshita A, Wada E, Nomura S, Ohishi H, Takada M, Flor PJ, Neki A, Abe T, Nakanishi S, & Mizuno N. (1997) Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus. *J Neurosci*, 17(19):7503-7522.
127. Scanziani M, Salin PA, Vogt KE, Malenka RC, & Nicoll RA. (1997) Use-dependent increases in glutamate concentration activate presynaptic metabotropic glutamate receptors. *Nature*, 385(6617):630-634.
128. Zamponi GW & Currie KP. (2013) Regulation of Ca(V)2 calcium channels by G protein coupled receptors. *Biochim Biophys Acta*, 1828(7):1629-1643.
129. Kilbride J, Rush AM, Rowan MJ, & Anwyl R. (2001) Presynaptic group II mGluR inhibition of short-term depression in the medial perforant path of the dentate gyrus in vitro. *J Neurophysiol*, 85(6):2509-2515.
130. Macek TA, Winder DG, Gereau RWt, Ladd CO, & Conn PJ. (1996) Differential involvement of group II and group III mGluRs as autoreceptors at lateral and medial perforant path synapses. *J Neurophysiol*, 76(6):3798-3806.
131. Kamiya H, Shinozaki H, & Yamamoto C. (1996) Activation of metabotropic glutamate receptor type 2/3 suppresses transmission at rat hippocampal mossy fibre synapses. *J Physiol*, 493 (Pt 2):447-455.
132. Kamiya H & Ozawa S. (1999) Dual mechanism for presynaptic modulation by axonal metabotropic glutamate receptor at the mouse mossy fibre-CA3 synapse. *J Physiol*, 518 (Pt 2):497-506.
133. Ferraguti F, Baldani-Guerra B, Corsi M, Nakanishi S, & Corti C. (1999) Activation of the extracellular signal-regulated kinase 2 by metabotropic glutamate receptors. *Eur J Neurosci*, 11(6):2073-2082.
134. Schmitz SK, King C, Kortleven C, Huson V, Kroon T, Kevenaar JT, Schut D, Saarloos I, Hoetjes JP, de Wit H, Stiedl O, Spijker S, Li KW, Mansvelder HD, Smit AB, Cornelisse LN, Verhage M, & Toonen RF. (2016) Presynaptic inhibition upon CB1 or mGlu2/3 receptor activation requires ERK/MAPK phosphorylation of Munc18-1. *Embo j*, 35(11):1236-1250.

135. Hayashi Y, Momiyama A, Takahashi T, Ohishi H, Ogawa-Meguro R, Shigemoto R, Mizuno N, & Nakanishi S. (1993) Role of a metabotropic glutamate receptor in synaptic modulation in the accessory olfactory bulb. *Nature*, 366(6456):687-690.
136. Ohishi H, Ogawa-Meguro R, Shigemoto R, Kaneko T, Nakanishi S, & Mizuno N. (1994) Immunohistochemical localization of metabotropic glutamate receptors, mGluR2 and mGluR3, in rat cerebellar cortex. *Neuron*, 13(1):55-66.
137. Knoflach F & Kemp JA. (1998) Metabotropic glutamate group II receptors activate a G protein-coupled inwardly rectifying K⁺ current in neurones of the rat cerebellum. *J Physiol*, 509 (Pt 2):347-354.
138. Cox CL & Sherman SM. (1999) Glutamate inhibits thalamic reticular neurons. *J Neurosci*, 19(15):6694-6699.
139. Lee CC & Sherman SM. (2009) Glutamatergic inhibition in sensory neocortex. *Cereb Cortex*, 19(10):2281-2289.
140. Ster J, Mateos JM, Grewe BF, Coiret G, Corti C, Corsi M, Helmchen F, & Gerber U. (2011) Enhancement of CA3 hippocampal network activity by activation of group II metabotropic glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(24):9993-9997.
141. Koszeghy A, Kovacs A, Biro T, Szucs P, Vincze J, Hegyi Z, Antal M, & Pal B. (2015) Endocannabinoid signaling modulates neurons of the pedunculopontine nucleus (PPN) via astrocytes. *Brain Struct Funct*, 220(5):3023-3041.
142. Petralia RS, Wang YX, Niedzielski AS, & Wenthold RJ. (1996) The metabotropic glutamate receptors, mGluR2 and mGluR3, show unique postsynaptic, presynaptic and glial localizations. *Neuroscience*, 71(4):949-976.
143. Alle H & Geiger JR. (2006) Combined analog and action potential coding in hippocampal mossy fibers. *Science*, 311(5765):1290-1293.
144. Debanne D, Bialowas A, & Rama S. (2013) What are the mechanisms for analogue and digital signalling in the brain? *Nat Rev Neurosci*, 14(1):63-69.
145. Shu Y, Hasenstaub A, Duque A, Yu Y, & McCormick DA. (2006) Modulation of intracortical synaptic potentials by presynaptic somatic membrane potential. *Nature*, 441(7094):761-765.

146. Kim S. (2014) Action potential modulation in CA1 pyramidal neuron axons facilitates OLM interneuron activation in recurrent inhibitory microcircuits of rat hippocampus. *Plos One*, 9(11):e113124.
147. Bialowas A, Rama S, Zbili M, Marra V, Fronzaroli-Molinieres L, Ankri N, Carlier E, & Debanne D. (2015) Analog modulation of spike-evoked transmission in CA3 circuits is determined by axonal Kv1.1 channels in a time-dependent manner. *Eur J Neurosci*, 41(3):293-304.
148. Bouhours B, Trigo FF, & Marty A. (2011) Somatic depolarization enhances GABA release in cerebellar interneurons via a calcium/protein kinase C pathway. *J Neurosci*, 31(15):5804-5815.
149. Rowan MJ & Christie JM. (2017) Rapid State-Dependent Alteration in Kv3 Channel Availability Drives Flexible Synaptic Signaling Dependent on Somatic Subthreshold Depolarization. *Cell Rep*, 18(8):2018-2029.
150. Vivekananda U, Novak P, Bello OD, Korchev YE, Krishnakumar SS, Volynski KE, & Kullmann DM. (2017) Kv1.1 channelopathy abolishes presynaptic spike width modulation by subthreshold somatic depolarization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(9):2395-2400.
151. Scott R, Ruiz A, Henneberger C, Kullmann DM, & Rusakov DA. (2008) Analog modulation of mossy fiber transmission is uncoupled from changes in presynaptic Ca²⁺. *J Neurosci*, 28(31):7765-7773.
152. Clark B & Hausser M. (2006) Neural coding: hybrid analog and digital signalling in axons. *Curr Biol*, 16(15):R585-588.
153. Bischofberger J, Engel D, Li L, Geiger JR, & Jonas P. (2006) Patch-clamp recording from mossy fiber terminals in hippocampal slices. *Nat Protoc*, 1(4):2075-2081.
154. Szabadics J & Soltesz I. (2009) Functional Specificity of Mossy Fiber Innervation of GABAergic Cells in the Hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 29(13):4239-4251.
155. Ogden D & Stanfield P. (1994) Patch clamp techniques for single channel and whole-cell recording. *Microelectrode techniques*:53-78.

156. Geiger JR & Jonas P. (2000) Dynamic control of presynaptic Ca²⁺ inflow by fast-inactivating K⁺ channels in hippocampal mossy fiber boutons. *Neuron*, 28(3):927-939.
157. Szabadics J & Soltesz I. (2009) Functional specificity of mossy fiber innervation of GABAergic cells in the hippocampus. *J Neurosci*, 29(13):4239-4251.
158. Perkins KL. (2006) Cell-attached voltage-clamp and current-clamp recording and stimulation techniques in brain slices. *J Neurosci Methods*, 154(1-2):1-18.
159. Tyzio R, Ivanov A, Bernard C, Holmes GL, Ben-Ari Y, & Khazipov R. (2003) Membrane potential of CA3 hippocampal pyramidal cells during postnatal development. *J Neurophysiol*, 90(5):2964-2972.
160. Engel D & Jonas P. (2005) Presynaptic action potential amplification by voltage-gated Na⁺ channels in hippocampal mossy fiber boutons. *Neuron*, 45(3):405-417.
161. Bischofberger J, Geiger JR, & Jonas P. (2002) Timing and efficacy of Ca²⁺ channel activation in hippocampal mossy fiber boutons. *J Neurosci*, 22(24):10593-10602.
162. Li L, Bischofberger J, & Jonas P. (2007) Differential gating and recruitment of P/Q-, N-, and R-type Ca²⁺ channels in hippocampal mossy fiber boutons. *J Neurosci*, 27(49):13420-13429.
163. Bezanilla F & Armstrong CM. (1977) Inactivation of the sodium channel. I. Sodium current experiments. *J Gen Physiol*, 70(5):549-566.
164. Clay JR. (2009) Determining k channel activation curves from k channel currents often requires the goldman-hodgkin-katz equation. *Front Cell Neurosci*, 3:20.
165. Trevelyan AJ & Jack J. (2002) Detailed passive cable models of layer 2/3 pyramidal cells in rat visual cortex at different temperatures. *J Physiol*, 539(Pt 2):623-636.
166. Jahr CE & Stevens CF. (1990) Voltage dependence of NMDA-activated macroscopic conductances predicted by single-channel kinetics. *J Neurosci*, 10(9):3178-3182.

167. Harnett MT, Makara JK, Spruston N, Kath WL, & Magee JC. (2012) Synaptic amplification by dendritic spines enhances input cooperativity. *Nature*, 491(7425):599-602.
168. Hines ML & Carnevale NT. (1997) The NEURON simulation environment. *Neural Comput*, 9(6):1179-1209.
169. Sala F. (1991) Activation kinetics of calcium currents in bull-frog sympathetic neurones. *J Physiol*, 437:221-238.
170. Jaffe DB, Ross WN, Lisman JE, Lasser-Ross N, Miyakawa H, & Johnston D. (1994) A model for dendritic Ca²⁺ accumulation in hippocampal pyramidal neurons based on fluorescence imaging measurements. *J Neurophysiol*, 71(3):1065-1077.
171. Lee JH, Gomora JC, Cribbs LL, & Perez-Reyes E. (1999) Nickel block of three cloned T-type calcium channels: low concentrations selectively block α 1H. *Biophys J*, 77(6):3034-3042.
172. Kemenes I, Marra V, Crossley M, Samu D, Staras K, Kemenes G, & Nowotny T. (2011) Dynamic clamp with StdpC software. *Nat Protoc*, 6(3):405-417.
173. Ellis-Davies GC, Matsuzaki M, Paukert M, Kasai H, & Bergles DE. (2007) 4-Carboxymethoxy-5,7-dinitroindolyl-Glu: an improved caged glutamate for expeditious ultraviolet and two-photon photolysis in brain slices. *J Neurosci*, 27(25):6601-6604.
174. Trigo FF, Corrie JE, & Ogden D. (2009) Laser photolysis of caged compounds at 405 nm: photochemical advantages, localisation, phototoxicity and methods for calibration. *J Neurosci Methods*, 180(1):9-21.
175. Guzman SJ, Schlogl A, & Schmidt-Hieber C. (2014) Stimfit: quantifying electrophysiological data with Python. *Front Neuroinform*, 8:16.
176. Conn PJ & Pin JP. (1997) Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 37:205-237.
177. Kingston AE, Ornstein PL, Wright RA, Johnson BG, Mayne NG, Burnett JP, Belagaje R, Wu S, & Schoepp DD. (1998) LY341495 is a nanomolar potent and selective antagonist of group II metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology*, 37(1):1-12.

178. Dominguez C, Prieto L, Valli MJ, Massey SM, Bures M, Wright RA, Johnson BG, Andis SL, Kingston A, Schoepp DD, & Monn JA. (2005) Methyl substitution of 2-aminobicyclo[3.1.0]hexane 2,6-dicarboxylate (LY354740) determines functional activity at metabotropic glutamate receptors: identification of a subtype selective mGlu2 receptor agonist. *J Med Chem*, 48(10):3605-3612.
179. Ben Achour S, Pont-Lezica L, Bechade C, & Pascual O. (2010) Is astrocyte calcium signaling relevant for synaptic plasticity? *Neuron Glia Biol*, 6(3):147-155.
180. Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, & Kurachi Y. (2010) Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev*, 90(1):291-366.
181. Dutar P, Petrozzino JJ, Vu HM, Schmidt MF, & Perkel DJ. (2000) Slow synaptic inhibition mediated by metabotropic glutamate receptor activation of GIRK channels. *J Neurophysiol*, 84(5):2284-2290.
182. Jin W & Lu Z. (1999) Synthesis of a stable form of tertiapin: a high-affinity inhibitor for inward-rectifier K⁺ channels. *Biochemistry*, 38(43):14286-14293.
183. Kitamura H, Yokoyama M, Akita H, Matsushita K, Kurachi Y, & Yamada M. (2000) Tertiapin potently and selectively blocks muscarinic K(+) channels in rabbit cardiac myocytes. *J Pharmacol Exp Ther*, 293(1):196-205.
184. Gidon A & Segev I. (2012) Principles governing the operation of synaptic inhibition in dendrites. *Neuron*, 75(2):330-341.
185. Brunner J, Ster J, Van-Weert S, Andrasi T, Neubrandt M, Corti C, Corsi M, Ferraguti F, Gerber U, & Szabadics J. (2013) Selective silencing of individual dendritic branches by an mGlu2-activated potassium conductance in dentate gyrus granule cells. *J Neurosci*, 33(17):7285-7298.
186. Kerti K, Lorincz A, & Nusser Z. (2012) Unique somato-dendritic distribution pattern of Kv4.2 channels on hippocampal CA1 pyramidal cells. *Eur J Neurosci*, 35(1):66-75.
187. Luscher C, Jan LY, Stoffel M, Malenka RC, & Nicoll RA. (1997) G protein-coupled inwardly rectifying K⁺ channels (GIRKs) mediate postsynaptic but not presynaptic transmitter actions in hippocampal neurons. *Neuron*, 19(3):687-695.

188. Kulik A, Vida I, Lujan R, Haas CA, Lopez-Bendito G, Shigemoto R, & Frotscher M. (2003) Subcellular localization of metabotropic GABA(B) receptor subunits GABA(B1a/b) and GABA(B2) in the rat hippocampus. *J Neurosci*, 23(35):11026-11035.
189. Degro CE, Kulik A, Booker SA, & Vida I. (2015) Compartmental distribution of GABAB receptor-mediated currents along the somatodendritic axis of hippocampal principal cells. *Front Synaptic Neurosci*, 7:6.
190. Perez-Reyes E. (2003) Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol Rev*, 83(1):117-161.
191. McKay BE, McRory JE, Molineux ML, Hamid J, Snutch TP, Zamponi GW, & Turner RW. (2006) Ca(V)₃ T-type calcium channel isoforms differentially distribute to somatic and dendritic compartments in rat central neurons. *Eur J Neurosci*, 24(9):2581-2594.
192. Augustine GJ. (1990) Regulation of transmitter release at the squid giant synapse by presynaptic delayed rectifier potassium current. *J Physiol*, 431:343-364.
193. Kawaguchi SY & Sakaba T. (2015) Control of inhibitory synaptic outputs by low excitability of axon terminals revealed by direct recording. *Neuron*, 85(6):1273-1288.
194. Rowan MJ, Tranquil E, & Christie JM. (2014) Distinct Kv channel subtypes contribute to differences in spike signaling properties in the axon initial segment and presynaptic boutons of cerebellar interneurons. *J Neurosci*, 34(19):6611-6623.
195. Sabatini BL & Regehr WG. (1997) Control of neurotransmitter release by presynaptic waveform at the granule cell to Purkinje cell synapse. *J Neurosci*, 17(10):3425-3435.
196. Pattillo JM, Yazejian B, DiGregorio DA, Vergara JL, Grinnell AD, & Meriney SD. (2001) Contribution of presynaptic calcium-activated potassium currents to transmitter release regulation in cultured *Xenopus* nerve-muscle synapses. *Neuroscience*, 102(1):229-240.
197. Randall A & Tsien RW. (1995) Pharmacological dissection of multiple types of Ca²⁺ channel currents in rat cerebellar granule neurons. *J Neurosci*, 15(4):2995-3012.

198. Ylinen A, Soltesz I, Bragin A, Penttonen M, Sik A, & Buzsaki G. (1995) Intracellular correlates of hippocampal theta rhythm in identified pyramidal cells, granule cells, and basket cells. *Hippocampus*, 5(1):78-90.
199. Fernandez-Alacid L, Aguado C, Ciruela F, Martin R, Colon J, Cabanero MJ, Gassmann M, Watanabe M, Shigemoto R, Wickman K, Bettler B, Sanchez-Prieto J, & Lujan R. (2009) Subcellular compartment-specific molecular diversity of pre- and post-synaptic GABA-activated GIRK channels in Purkinje cells. *J Neurochem*, 110(4):1363-1376.
200. Rolls ET & Kesner RP. (2006) A computational theory of hippocampal function, and empirical tests of the theory. *Prog Neurobiol*, 79(1):1-48.
201. Hayman RM & Jeffery KJ. (2008) How heterogeneous place cell responding arises from homogeneous grids--a contextual gating hypothesis. *Hippocampus*, 18(12):1301-1313.
202. Ujfalussy B, Kiss T, & Erdi P. (2009) Parallel computational subunits in dentate granule cells generate multiple place fields. *PLoS Comput Biol*, 5(9):e1000500.
203. Steward O & Scoville SA. (1976) Cells of origin of entorhinal cortical afferents to the hippocampus and fascia dentata of the rat. *J Comp Neurol*, 169(3):347-370.
204. Buckmaster PS, Wenzel HJ, Kunkel DD, & Schwartzkroin PA. (1996) Axon arbors and synaptic connections of hippocampal mossy cells in the rat in vivo. *J Comp Neurol*, 366(2):271-292.
205. Jourdain P, Bergersen LH, Bhaukaurally K, Bezzi P, Santello M, Domercq M, Matute C, Tonello F, Gundersen V, & Volterra A. (2007) Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nat Neurosci*, 10(3):331-339.
206. Rama S, Zbili M, Bialowas A, Fronzaroli-Molinieres L, Ankri N, Carlier E, Marra V, & Debanne D. (2015) Presynaptic hyperpolarization induces a fast analogue modulation of spike-evoked transmission mediated by axonal sodium channels. *Nat Commun*, 6:10163.
207. Buzsaki G. (1989) Two-stage model of memory trace formation: a role for "noisy" brain states. *Neuroscience*, 31(3):551-570.
208. Steriade M & Timofeev I. (2003) Neuronal plasticity in thalamocortical networks during sleep and waking oscillations. *Neuron*, 37(4):563-576.

209. Carter AG & Sabatini BL. (2004) State-dependent calcium signaling in dendritic spines of striatal medium spiny neurons. *Neuron*, 44(3):483-493.
210. Gonzalez-Maeso J, Ang RL, Yuen T, Chan P, Weisstaub NV, Lopez-Gimenez JF, Zhou M, Okawa Y, Callado LF, Milligan G, Gingrich JA, Filizola M, Meana JJ, & Sealfon SC. (2008) Identification of a serotonin/glutamate receptor complex implicated in psychosis. *Nature*, 452(7183):93-97.
211. Frick A & Johnston D. (2005) Plasticity of dendritic excitability. *J Neurobiol*, 64(1):100-115.

11. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

I. Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények:

Brunner Janos , Szabadics Janos

Analogue modulation of back-propagating action potentials enables dendritic hybrid signalling

NATURE COMMUNICATIONS 7: Paper 13033. 13 p. (2016)

Brunner J, Ster J , Van-Weert S , András T , Neubrandt M , Corti C , Corsi M , Ferraguti F , Gerber U , Szabadics J

Selective Silencing of Individual Dendritic Branches by an mGlu2-Activated Potassium Conductance in Dentate Gyrus Granule Cells

JOURNAL OF NEUROSCIENCE 33:(17) pp. 7285-7298. (2013)

II. Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – eredeti közlemények:

Brunner J, Neubrandt M , Van-Weert S , Andrasi T , Kleine Borgmann FB , Jessberger S , Szabadics J

Adult-born granule cells mature through two functionally distinct states.

ELIFE 3: Paper e03104. 12 p. (2014)

Szabadics J , Varga C , Brunner J, Chen K , Soltesz I

Granule cells in the CA3 area

JOURNAL OF NEUROSCIENCE 30:(24) pp. 8296-8307. (2010)

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Szabadics Jánosnak, aki feltárta előttem a tudományos megismerés, különösen az elektrofiziológiai kutatások szépségét. Köszönöm neki, hogy a munkám minden vadhajtása ellenére töretlen bizalommal segítette a kutatóvá érésemet.

Köszönet illeti a Celluláris Neurofarmakológia Labor minden volt és jelenlegi munkatársát, a segítő és motiváló környezetért.

Köszönet illeti a Nusser és a Makara labor tagjait is. A tudományos fejlődésem egyik motorja volt a közösen tartott Journal Club.

Köszönöm Barna Lászlónak azt a sokoldalú segítséget, amiben a Nikon-KOKI központban eltöltött több évnyi munka alatt nyújtott.

Nem múló hálával tartozom szüleimnek és testvéremnek, azért a pótolhatatlan légkörért, amiben fiatalságom alatt részesülhettem. Ez az értekezés egészen biztosan nem jöhetett volna létre nélkülük.

Végül, de nem utolsó sorban mindent köszönök a feleségemnek, Krisztinának, aki áldozatos munkával és sok-sok szeretettel a vállán viszi közös életünk mindennapi terheit. Fiam, János pedig a legtöbb örömöm forrása mióta velünk van.

Az értekezésemet édesapám emlékének ajánlom.