

HIPPOKAMPÁLIS CA1 PIRAMISSEJT DENDRITEKRE ÉRKEZŐ BEMENETI MINTÁZATOK KÖLCSÖNHATÁSAI

Ph.D. tézis

Magó Ádám

Semmelweis Egyetem

Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Makara Judit Katalin PhD, csoportvezető

Hivatalos bírálók:

Dr. Enyedi Péter DSc, egyetemi tanár

Dr. Szegedi Viktor PhD, egyetemi kutató

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Kamondi Anita DSc, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Wittner Lucia PhD, tudományos főmunkatárs

Dr. Kozsurek Márk PhD, egyetemi adjunktus

Budapest
2021

Bevezetés

Az agykérgi piramisisejtek több ezer serkentő szinaptikus bemenetet kapnak, melyek különböző tér-időbeli mintázatokban akívtak. A különböző bemeneti mintázatok integrációját a bemenetek tér-időbeli mintázatán kívül a dendritek aktív (expresszált ioncsatornáktól függő) illetve passzív (dendritfa morfológiájától és membrántulajdonságoktól függő) jellemzői határozzák meg. Attól függően, hogy a mért EPSP milyen viszonyban áll az egyes bemenetek által kiváltott egyedi EPSP-k matematikai összegével, három különféle dendritikus integrációs módot különböztetünk meg. Szublineáris integráció, ahol a mért EPSP amplitúdója kisebb, mint az egyedi EPSP-k matematikai összege; lineáris integráció során a két amplitúdó érték közel megegyezik, illetve a szupralineáris integráció, ahol az aritmetikai összeget meghaladja a mért EPSP. Utóbbi akkor jöhet létre, ha kellően nagy mennyiségű bemenet aktiválódik egyszerre, melynek hatására lokális regeneratív depolarizáló feszültségválasz alakul ki a dendritben. Ezeket a dendritikus eseményeket nevezzük dendritikus spike-oknak, melyek között megkülönböztetünk Na^+ , NMDAR illetve Ca^{2+} spike-okat, attól függően, hogy milyen ioncsatornák felelősek a regeneratív depolarizáció létrejöttéért.

A dendritfára jellemző elágazódási struktúra felvetette a lehetőséget annak, hogy az egyes dendritágak önálló integrációs egységként (kompartmentként) viselkednek. Az elágazódási pontok például akadályozzák a regeneratív feszültség jelek (pl. Na^+ spike-ok) más dendritágakba való terjedését. Továbbá az is bizonyított, hogy akár rövidebb dendritszakasz is viselkedhet integrációs kompartmenként, ahol egy csoport szinkron aktív szinapszis képes NMDA

receptor függő, tovább nem terjedő lokális spike-ot kiváltani; az ilyen spike-ok fontos szerepet játszanak egyes hosszútávú potencírozódás (LTP) mechanizmusokban. A kis kompartmentek létezésére több *in vivo* bizonyíték is található a szakirodalomban, ahol Ca^{2+} képalkotó módszerek segítségével térben klaszterezett szinaptikus aktivitást figyeltek meg rövid dendritszakaszon (egyéb agyi régiók mellett) fejlődő és felnőtt hippocampusban is. Más tanulmányok rávilágítottak arra is, hogy szomszédos szinapszisok, melyek 16 mikrométernél közelebb helyezkednek el egymáshoz, nagyobb valószínűséggel mutatnak szinkron aktivitást. Funkcionális klaszterek mellett megfigyeltek ún. plaszticitási klasztereket is, melyekben hasonlóan kis dendritszakaszokon egymás közelében elhelyezkedő kisszámú szinapszis mutatott összehangolt LTP-re utaló jeleket.

Az említett tanulmányokban is leírt bemenet-klaszterekben kisszámú szinapszis mutat szinkron aktivitást, ezért az általuk kiváltott integrált EPSP-k nem befolyásolják hatékonyan a szomatikus kimenetet, így valójában keveset tudunk a klaszterezett bemenetek lokális kölcsönhatásairól és hosszútávú hatásairól. Ezért kísérleteink elsődleges célja az volt, hogy *in vitro* módszerek alkalmazásával megértsük a különböző bemeneti mintázatok lokális posztzinaptikus kölcsönhatásait, és feltérképezzük a lokális funkcionális változásokat a rágcsháló hippocampusz CA3-CA1 Schaffer kollaterális szinapszisaiban.

Célok:

PhD munkám során az alábbi kérdések megválaszolását tűztem ki célul:

1. Milyen funkcionális változások figyelhetők meg egy szinapszisban, ha a közelében elhelyezkedő más szinapszisok egyidejűleg aktívak? Hogyan függ ez a kölcsönhatás a szinapszisok dendriten elfoglalt pozíciójától?
2. Kialakulhat-e klaszterezett, szinkron aktivált szinapszisokban lokális hosszútávú szinaptikus plaszticitás? Hogyan függenek a plaszticitás szabályai az aktív szinapszisok számától és egymástól való távolságától?
3. Hogyan befolyásolja a lokális plaszticitási szabályokat a dendritikus integráció módja, különösképpen dendritikus spike kiváltása?

Módszerek

Elektrofiziológia: Felnőtt hím Wistar patkányok (7-11 hetesek) hippocampusából 400 μm vastag transzverzális szeleteket készítettünk. A szeletek készítése során az állatetikai szabályozásoknak megfelelően jártunk el.

Az állatokat mélyen bealtattuk 5%-os izofluránnal (~5 percig), majd gyorsan perfundáltuk a szíven keresztül jéghideg „szeletvágó” oldattal 95 % O_2 és 5 % CO_2 -dal buborékoltatva. A perfúzió után az agyat gyorsan kivettük, és vibratómmal 400 μm vastag szeleteket készítettünk vágóoldatban. Ezután a szeleteket egy tartókamrában ACSF-ben inkubáltuk 30 percig 35 °C-on, majd szobahőmérsékleten tartottuk. A kísérletekhez a szeleteket a mikroszkóp alatt elhelyezkedő, saját készítésű

mérési kamrába helyeztük, ahol a kísérleteket 32-35 °C-os ACSF-ben végeztük, 95 % O₂ and 5 % CO₂-el buborékoltatva.

A sejteket DIC-vel (differential interference contrast) felszerelt epifluoreszcens mikroszkóp segítségével tettük láthatóvá, infravörös megvilágítást és vízimmerziós objektívet használva (60x vagy 63x). CA1-es piramis sejtek sejttestjéből teljes sejt current clamp elvezetéseket végeztünk aktív „bridge” módban, 3-5 kHz-re szűrve, és 50kHz-en digitalizálva. Patch pipettáink ellenállása 2-6 MΩ között volt, és a kísérletek során alacsony Cl⁻ tartalmú intracelluláris oldattal töltöttük meg őket (pH=7.25) melyhez Alexa Fluor 488 (100 μM) fluoreszcens festéket is hozzáadtunk, mely segítségével láthatóvá tettük a megszárt idegsejteket. Ca²⁺ mérések kísérleteinkben az intracelluláris oldatban Ca²⁺ érzékeny OGB-1 (100 μM) valamint Alexa Fluor 594 (50 μM) fluoreszcens festéket használtunk. Csak azokat a kísérleteket használtuk fel az analízishez, ahol a soros ellenállás 30 MΩ-nál kevesebb, illetve ahol a CA1-es piramis sejtek nyugalmi membránpotenciálja -55 mV-nál negatívabb volt.

Két-foton képalkotás és glutamát felszabadítás:

Egy két galvanométerrel ellátott két-foton pásztázó rendszert használtunk a sejtek image-eléséhez és a glutamát felszabadításához. Két ultragyors pulzáló lézer sugarat alkalmaztunk, egyet a fluorofórok image-elésére (920nm vagy 860nm), másikat az MNI-kötött L-glutamát (10mM; puffoló pipetta segítségével juttattunk a szeletre) fotolíziséhez (720nm) az egyedű dendrit tüskék közelében.

A kísérletek során tipikus morfológiájú, jól elhatárolható dendrittüskéket választottunk a stimuláláshoz. A tüskék stimulálásához szükséges glutamát felszabadítást a dendrittüskék fejtől ≤0.5 μm-rel laterálisan végeztük, 0.5 ms

hosszú stimulussal. Az egyes stimulált dendrittüskéket úgy választottuk ki, hogy a stimulált pontok között a távolság ne legyen kisebb, mint 1.1 μm . Az egyes stimulusok között eltelt idő 200 ms volt az egyedi EPSP-k mérésénél, és 0.1 ms a kvázi-szinkron aktiváció esetén, melyet az LTP indukciós protokoll alatt alkalmaztunk. Az egyedi EPSP-k amplitúdójának mérésénél 6-12 feszültség görbét vettünk fel, minden 5. percben.

Ca²⁺ mérés: A kísérletek többségében, ahol a dendrit tüskék Ca²⁺ jel nonlinearitását mértük, az ACSF 0.5-1 mM TTX-et tartalmazott, hogy minden dendritikus Na⁺ spike által kiváltott nonlinearitást megszüntessünk. A Ca²⁺ mérést kézzel rajzolt vonal mentén 200-500 Hz-en, 8 μs -os pixel dwell time mellett végeztük. A kísérlet elején 2-4 dendrittüskét egyedileg stimuláltuk (200-305 ms különbséggel), a lézer erősséget úgy állítottuk be, hogy az egyedi EPSP-k fiziológiás mérettartományba essenek, és ennek megfelelő Ca²⁺ jelet mérjünk. Ezután a kiválasztott tüskéket ugyanazzal a lézer erősséggel szinkron aktiváltuk (0.1 ms különbséggel, illetve az uncaging során 0.2 ms hosszan sütöttünk a lézerrel). Azokban a kísérletekben, ahol a proximális dendritszakaszokon nagyobb számú dendrittüskét (12 d-tüske) aktiváltunk, az első 4 d-tüske Ca²⁺ jelét mértük. A szinkron stimuláció után, újra egyedileg aktiváltuk a d-tüskéket, hogy megbizonyosodjunk az egyedi válaszok megbízhatóságáról.

LTP kísérletek: A szinapszisok LTP által okozott funkcionális változásait 2-foton glutamát felszabadítás segítségével kiváltott, szómáráról elvezetett EPSP-ken mértük teljes sejtes current clamp módban. Olyan kísérleti protokollt dolgoztunk ki (Weber és mtsai. 2016), amely lehetővé tette, hogy a sejtmembrán beszakítása után 10 percen belül

elindíthatjuk az LTP indukciót. A fluoreszcens festékkel előre feltöltött sejt újraszúrása után megmértük a nyugalmi membránpotenciált, és azonnal megkezdjük a tüskék stimulálását glutamát felszabadítás segítségével. Először 4 szinapszist stimuláltunk egyenként (200 ms az egyes stimulusok között) úgy, hogy mindegyik fiziológiás méretű EPSP-t (~0.1-0.9 mV) produkáljon. Ezután a betöréstől számított 10percen belül, a kiválasztott dendrittüskéket LTP protokollal stimuláltuk (általában 50-szer szinkron aktiváltuk őket 3 Hz-en). A homoszinaptikus LTP kísérletekben az LTP indukciós protokoll alatt használt lézer erő mindig megegyezett az egyedi tüskék stimulálásainál használt lézer erővel. Ezzel szemben bizonyos heteroszínaptikus LTP kísérleteinkben a lézer erőt ~15%-kal növeltük az LTP indukciós protokoll alatt (hogy növeljük a dendritikus spike kiváltásának valószínűségét), majd a protokoll után az eredetileg kiválasztott négy „teszt” szinapszis EPSP amplitúdó változásait az eredeti lézer erősséggel monitoroztuk.

Vegyszerek: D-AP5 és NiCl₂ desztillált vízben oldottuk fel, a nimodipint és U0126-ot pedig DMSO-ban. Az alikvótokat -20 °C-on tároltuk, és a kísérlet napján oldottuk be ACSF-be. Az ACSF-be beoldott gátlószereket perfúzió segítségével mostuk rá a szeletre 10-15 perccel a kísérlet megkezdése előtt. A nimodipint és Ni²⁺-t tartalmazó oldatokat fénytől védve használtuk.

Számítógépes modell: Egy biofizikailag részletes CA1-es piramis sejt modellt használtunk, amely képes reprodukálni bizonyos in vitro körülmények között megfigyelt dendritikus tulajdonságokat, mint például az akciós potenciál szomatikus kiváltását és apikális fődendriten való terjedését, továbbá a lokális dendritikus Na²⁺ spike-ok generálását a

vékony dendrit ágakon, a szinaptikus válaszok amplitúdó eloszlását, a bemenetek nemlineáris integrációját NMDA receptorokon keresztül és az A-típusú K^+ csatornák dendritserkenthetőséget csökkentő hatását. A modell in vivo szerű stimulus mintázat hatására hely-szelektív tulajdonságokat mutatott és a szomatikus potenciál aktivitás a fiziológiás tartományba esett. A szimulációk a NEURON szimulációs környezetben készültek.

Eredmények

Kooperatív tüske Ca^{2+} tüske szignalizáció CA1-es piramissejtek dendritjei mentén: Hogy megértsük az egymáshoz közeli dendrittűskék lehetséges kooperatív kölcsönhatásainak nem-lineáris következményeit, először megvizsgáltuk, hogy milyen az EPSP-k integrációja, illetve a dendrittűske Ca^{2+} jel az egyes tűskékben, ha szinkron aktiválunk kis szinapszis klasztereket (4 szinapszis, 3-5 μm dendritszakaszon) (Weber és mtsai., 2016). Megmértük az egyedileg aktivált tűskéken kapott szomatikus feszültségválaszt és tüske Ca^{2+} jel nagyságát, és az egyedi paraméterek aritmetikai összegét összehasonlítottuk a tűskék szinkron aktivitásakor mért értékekkel. A kvázi-szinkron stimuláláskor jelentős nem-lineáris Ca^{2+} jel növekedést mértünk a disztális dendritszakaszokon elhelyezkedő dendrittűskékben, míg meglepő módon az EPSP-k integrációja lineáris maradt. Ugyanezt a kísérletet proximális dendritszakaszon elhelyezkedő tűskecsoportokon elvégezve nem kaptunk jelentős Ca^{2+} jel erősödést, ugyanakkor - hasonlóan a disztális dendritszakaszokon megfigyeltekkel - az EPSP-k integrációja itt is lineáris volt.

Az elvégzett kísérletek arra engednek következtetni, hogy a kis Schaffer kollaterális szinapszis klaszterek Ca^{2+} jeleinek kooperativitása növekszik a vékony dendritágak hossz tengelye mentén, és így a megfigyelt jelenség követi a dendritfa passzív impedancia profilját. Ezzel szemben a kiváltott EPSP-k integrációja lineáris az egész dendritágon.

Különböző farmakológiai kísérletekkel, melyekben a lehetséges Ca^{2+} forrásokat gátoltuk, bizonyítottuk, hogy a disztális dendritszakaszokon mérhető szupralineáris Ca^{2+} jel erősödés NMDA receptorok által szabályozott.

Összefoglalva tehát az elvégzett kísérletek bizonyították, hogy az NMDAR által mediált dendrittüske Ca^{2+} jelek érzékenyek az egymáshoz közel elhelyezkedő kisszámú szinapszisok együttes aktivitására a disztális dendritszakaszokon. A megfigyelt lokális szupralineáris Ca^{2+} kooperativitás lineáris feszültség integráció mellett alakult ki, ezért a szómárról mért integrált EPSP-k nem adnak információt a lokális dendritikus kooperációról, illetve a szinkron aktív szinapszisok térbeli elhelyezkedéséről.

Pozíciófüggő kooperatív szinaptikus LTP: A kooperatív dendrittüske Ca^{2+} jel erősödés felveti annak lehetőségét, hogy lineáris feszültség integráció mellett is kialakulhat klaszterezett szinaptikus plaszticitás. Hogy megvizsgáljuk ezt a hipotézist, 2-foton glutamát felszabadítással stimuláltunk különböző számú tüskéből álló csoportokat egy LTP indukciós protokollal, melyben a szinapszisokat szinkron aktiváltuk 50-szer 3 Hz frekvenciával. Ezután monitoroztuk 4 egyedi tüske EPSP amplitúdóinak a változásait. A legtöbb kísérletben referenciaként

monitoroztunk egy közeli ($<15 \mu\text{m}$) dendrittűskét is, melyet nem aktiváltunk az LTP protokoll alatt.

Az LTP protokoll alatt stimulált 4 szinapszis szómáról mért EPSP-je jelentős potencírozódást mutatott disztális dendritszakaszokon ($139 \pm 10\%$ -os növekedés a kiindulási EPSP-hez képest, $n=17$). A referenciaként használt tuskében EPSP növekedés nem volt megfigyelhető sőt, kis csökkenés volt mérhető a kiindulási EPSP-hez képest, mely bizonyítja, hogy az általunk megfigyelt LTP bemenet specifikus. Hasonlóan a Ca^{2+} jel amplifikációjához, ilyen kísérletes körülmények között proximális dendritszakaszokon nem alakult ki LTP a stimulált dendrittűskékben, még 15 túske aktivációja mellett sem.

Farmakológiai kísérletekkel bizonyítottuk, hogy az általunk bemutatott kooperatív LTP NMDAR függő, hiszen D-AP5-öt bemosva eltűnt a potencírozódás a disztális dendritszakaszokon, a feszültségfüggő Na^+ csatornák blokkolása ($1 \mu\text{M}$ TTX) viszont nem szüntette meg az általunk kimutatott homoszinaptikus kooperatív LTP-t.

Regeneratív dendritikus spike-ok szükségesek a hatékony kooperatív LTP kialakulásához proximális dendritszakaszokon: Mivel proximális dendritszakaszokon küszöb alatti stimulációs mintázat (dendritikus spike kiváltásához szükséges feszültség küszöb alatti aktivitás) mellett nem volt megfigyelhető LTP még nagyobb számú d-túske aktivációja mellett sem, ezért megvizsgáltuk, milyen hatást kapunk, ha az LTP protokoll során dendritikus spike-ot váltunk ki. Az LTP protokoll alatt felvett feszültség görbén dendritikus spike jelenlétére következtettünk, ha hirtelen gyors ütemű feszültség növekedést láttunk (dV/dt ; Na^+ spike), vagy

ha a mért EPSP amplitúdója 2 mV-nál nagyobb volt, mint az egyedi szinapszisokban kiváltott EPSP-k aritmetikai összege (NMDA spike). Dendritikus spike kiváltása mellett erőteljes potencírozódást figyeltünk meg az általunk monitorozott 4 teszt tüskében (1.98 ± 0.43 a kiindulási EPSP amplitúdóhoz képest, $n=7$) és hasonló LTP-t mértünk akciós potenciál kiváltása mellett is (2.15 ± 0.44 , $n=8$). A kísérletek alapján kijelenthetjük, hogy regeneratív feszültségválasz (dendritikus spike vagy visszaterjedő akciós potenciál) szükséges az LTP kialakulásához proximális dendritszakaszokon.

A disztális dendritszakaszokon megfigyelt küszöb-alatti LTP függ a koaktív szinapszisok számától és azok relatív térbeli távolságától: A következő kísérleteinkkel arra kerestük a választ, hogy a disztális dendritszakaszokon a megfigyelt küszöb alatti LTP kialakulásának milyen lokális feltételei vannak. Hogy megvizsgáljuk, hogy minimum hány szinapszis kölcsönhatása szükséges a potencírozódás kialakulásához, csökkentettük az LTP protokoll alatt aktivált szinapszisok számát. Míg három szinapszis mellett hasonló mértékű bemenet specifikus LTP tapasztaltunk (1.32 ± 0.11 , $n=14$), mint korábban négy szinapszis esetén, addig két szinapszis szinkron aktiválása mellett nem láttunk növekedést az EPSP amplitúdókban (0.81 ± 0.11 , $n=8$).

Ezután arra kerestük a választ, hogy a szinkron aktív szinapszisoknak milyen közel kell elhelyezkedniük egymáshoz, hogy LTP alakulhasson ki. Azokban az esetekben, ahol a stimulált szinapszisok egymástól viszonylag távol helyezkedtek el (lefedett dendritszakasz: 17.4 ± 0.5 μm ; szinapszisok között átlagos távolság: 5.8 ± 0.2 μm) az LTP indukciós protokollunk nem váltott ki LTP-t (0.91 ± 0.05 ,

n=21), továbbá negatív korrelációt figyeltünk meg a szinapszisok közti átlagos távolság és az EPSP amplitúdó erősödés között.

A két kísérlettel bemutattuk, hogy minimum három, térben kis klaszterekben elhelyezkedő szinapszis együttes aktivitása szükséges a disztális dendritszakaszokon, hogy homoszinaptikus kooperatív LTP alakuljon ki regeneratív dendritikus feszültség esemény nélkül.

Dendritikus spike-ok kibővítik az LTP kialakulásához szükséges klaszter térbeli kiterjedését a disztális dendritszakaszokon: A következő kísérletekben arra kerestük a választ, hogy hogyan változnak a disztális lokális plaszticitási szabályok, ha az aktív szinapszisok egy erős bemeneti mintázat részei, mely képes dendritikus spike-ot generálni. Ezekben a kísérletekben nyolc szinapszist aktiváltunk az LTP indukciós protokoll alatt, hogy elérjük a dendritikus spike-hoz szükséges feszültség küszöböt. A térben klaszterezett bemenet mintázatok esetén minden kísérletben legalább egy szinapszisban LTP alakult ki, viszont meglepő módon sem a plaszticitás erőssége (1.37 ± 0.11 , n=9), sem az LTP-n átesett szinapszisok aránya nem növekedett (47%).

Ezután azt vizsgáltuk, hogy a dendritikus spike-ok milyen hatással vannak az LTP-hez szükséges térbeli követelményekre. Ehhez elvégeztük a kísérletet térben szétosztott bemeneti mintázattal is, ahol küszöb alatti stimuláció nem vezetett hosszú távú potencírozódáshoz. Ilyen kísérleti elrendezés mellett, a kiváltott dendritikus spike képes volt a kísérletek jelentős többségében (5-ből 4; átlagos EPSP növekedés: 1.52 ± 0.20) LTP-t generálni legalább egy szinapszisban.

Korábbi publikációkban megmutatták, hogy dendritikus spike kiváltása esetén jóval kevesebb elektromos stimuláció is elég az LTP indukcióhoz annál, mint ami párosított pre- és posztszinaptikus stimulusokkal általában használatos. Hogy megvizsgáljuk, vajon esetünkben is érvényes-e a megfigyelés, LTP indukciós protokollunkban 50-ről 5-re csökkentettük a szinkron stimulusok ismétléseinek számát, és alkalmaztuk mind küszöb alatti, mind pedig erős bemenet mintázatokon egyaránt. A kísérletek azt mutatták, hogy 5 stimulus repetíció csak azokban az esetekben vezet a szinapszisok potenciózódásához, ha dendritikus spike is generálódik (1.50 ± 0.15 , $n=4$), küszöb alatti bemenetmintázatok esetén nem volt megfigyelhető erősödés (0.79 ± 0.05 , $n=5$).

A fenti eredményekből arra következtethetünk, hogy a dendritikus spike-ok nem feltétlenül szükségesek az LTP-hez a disztális dendritszakaszokon, ugyanakkor lehetővé teszik egymástól távolabb elhelyezkedő szinapszisok erősödését, és csökkentik a szükséges szinkron aktivitások számát a kooperatív plaszticitás kialakulásához.

Erős bemenetmintázatok lehetővé teszik a lokális szinaptikus párbeszédet: A dendritikus spike-ok lokálisan erőteljes depolarizációt és jelentős mértékű Ca^{2+} jel növekedést képesek kiváltani, mely lehetővé teszi olyan további szignalizációs mechanizmusok beindulását, melyek nem csak az aktív szinapszisokra lehetnek hatással, hanem a közelben elhelyezkedő inaktív szinapszisokra is. Hogy ezt a lehetőséget megvizsgáljuk, nyolc szinapszist aktiváltunk együtt az LTP protokoll alatt, hogy dendritikus spike-okat váltunk ki, és négy olyan szomszédos ($\sim 20 \mu m$ távolságon

belül elhelyezkedő) szinapszis amplitúdó változását monitoroztuk, melyek nem voltak aktívak a protokollunk során. Ezek a szinapszisok csak az LTP előtt (≤ 2 perccel az LTP protokoll előtt) illetve után (≥ 5 perccel az LTP protokoll után) voltak stimulálva. Meglepő eredményt kaptunk, ugyanis kísérleteink jelentős hányadában LTP-t tapasztaltunk a monitorozott teszt szinapszisokban: a 30 kísérletből 20-ban legalább egy szinapszis EPSP amplitúdója legalább 30%-kal megnőtt, továbbá 12 kísérletben az átlagos EPSP amplitúdó változás nagyobb volt, mint a kontroll kísérletekben (ahol nem alkalmaztunk LTP protokollt) megfigyelt szórás kétszerese. Ugyanakkor a homoszinaptikus LTP-hez képest kisebb volt a megfigyelt hosszútávú potencírozódás (1.25 ± 0.12 , $n=30$).

Hogy jobban megértsük a kiváltott heteroszínaptikus LTP-t, megvizsgáltuk, vajon akkor is megfigyelhető-e ilyen hatás, amikor az LTP indukció alatt aktivált tüskecsoport és a teszt tüskék két egymáshoz közel elhelyezkedő, de külön dendriten helyezkednek el. Ebben az esetben azonban nem alakult ki LTP (0.77 ± 0.05 , $n=6$) a teszt tüskékben, hasonlóan az LTP protokoll nélküli kontroll kísérletekben tapasztaltakhoz (0.86 ± 0.05 , $n=11$). Ezekből a kísérletekből arra a következtetésre jutottunk, hogy a heteroszínaptikus LTP-ben intracelluláris szignalizációs útvonal játszik szerepet és csak az aktivált dendritben alakul ki. Az eredmény továbbá kizárja annak lehetőségét, hogy a heteroszínaptikus LTP-n átesett szinapszisokat az LTP protokoll alatt szétdiffundáló glutamát aktiválta volna.

Egy lehetséges alternatív magyarázat, hogy az LTP alatt kiváltott több dendritikus spike megváltoztatja a stimulált dendritág elektromos tulajdonságait, így valójában nem LTP miatt mérünk nagyobb amplitúdókat a szómán, hanem mert a

dendrit serkenthetősége növekedett. Noha ez ellen szólt az a megfigyelésünk, miszerint a dendritikus spike-ok erőssége (dV/dt) a szómán nem változott a kísérleteink alatt, Ujfalussy Balázs munkatársam egy CA1 piramiselt részletes biofizikai modellel (1-30 serkentő szinapszis stimulálás mellett) is megvizsgálta, hogy megfigyelésünk magyarázható-e a dendritikus excitabilitás változásával. Ha a modellben változtattuk a dendrit passzív paramétereit (lokális membrán ellenállást növeltük [R_m] és az axiális ellenállást csökkentettük [R_a]), akkor tapasztaltunk ugyan EPSP növekedést, viszont növekedett a dendritikus spike-ok dV/dt -je is, ami viszont a kísérleteinkben nem volt megfigyelhető. Ha növeltük a dendrit serkenthetőségét az aktív K^+ csatornák csökkentésével, akkor növekedett a dendritikus spike dV/dt -je, de az EPSP amplitúdók nem. Ezekkel szemben az AMPA konduktancia 40%-os növelésével sikerült növelni az EPSP amplitúdót anélkül, hogy változott volna a dendritikus spike-ok erőssége. A modell tehát igazolta, hogy a kísérleteinkben bemutatott EPSP amplitúdó növekedést valószínűleg nem magyarázza a dendritikus serkenthetőség változása, hanem szinaptikus mechanizmusok állnak mögötte.

Korábbi kísérletekben megmutatták, hogy egy LTP-n átesett szinapszis lecsökkenti a plaszticitáshoz szükséges küszöböt pár perc erejéig a szomszédos szinapszisokban, azaz azok gyengébb ingerlés hatására is potencírozódhatnak. Ezért felmerült a lehetősége annak, hogy az általunk megfigyelt heteroszínaptikus plaszticitás kialakulásához hozzájárulnak azok a gyenge ismételt stimulusok, melyeket a teszt szinapszisainkon alkalmazunk az EPSP változás monitorozásához. Mivel az LTP protokoll előtt a teszt szinapszisok különböző számú stimulust kaptak, először

megvizsgáltuk, hogy ezek a stimulációk hatással lehetnek-e a heteroszínaptikus LTP kialakulására. Bár nem találtunk korrelációt az LTP előtti stimulációk és az egyedi dendrittüskékben megfigyelt LTP nagysága között, azonban amikor két csoportra osztottuk a tüskéket aszerint, hogy hány stimulust kaptak (medián alapján, ≤ 15 -öt illetve ≥ 16 -ot), egy olyan trend volt megfigyelhető, ahol a kevesebb stimulációt kapó dendrittüske csoportban kevesebb színapszis erősödött, és a potencirozódás mértéke is kisebb volt (1.02 ± 0.08 ; $n=50$; tüskék 22%-a potencirozódott), mint azon tüskék esetében, ahol a stimulus szám 16-nál több volt (1.43 ± 0.13 , $n=63$; tüskék 40%-a potencirozódott). Valószínű tehát, hogy az LTP előtti színaptikus aktivitás hozzájárul a heteroszínaptikus plaszticitás kialakulásához. Azt is megvizsgáltuk, hogy az LTP indukciós protokoll utáni teszt stimulációk hozzájárulhatnak-e az LTP kialakulásához, ezért felfüggesztettük a stimulációt 30 percre. Ez azonban nem befolyásolta a heteroszínaptikus plaszticitást (1.26 ± 0.11 ; $n=14$, tüskék 42%-a potencirozódott).

A heteroszínaptikus LTP biofizikai mechanizmusa:

Az általunk megfigyelt heteroszínaptikus LTP NMDA receptor függő, mivel D-AP5-tel blokkolva nem alakult ki potencirozódás ($50 \mu\text{M}$; 0.90 ± 0.07 , $n=10$). A feszültségfüggő Ca^{2+} csatornák gátlása ($100 \mu\text{M Ni}^{2+}$ és $10 \mu\text{M nimodipin}$) szintén megszüntette a hosszú távú potencirozódást (1.07 ± 0.05 , $n=8$), azonban érdekes módon láttunk kezdeti EPSP növekedést, ami a kísérlet végére visszatért a kiindulási EPSP amplitúdó érték közelébe. Tehát a feszültségfüggő Ca^{2+} csatornák nem szükségesek a színapszisok közötti „párbeszédhez”, viszont szerepet játszhatnak a stabil LTP kialakításában. Végül, mivel a szakirodalom alapján a

heteroszínaptikus LTP kialakulásában fontos szerepet játszhat a MEK/ERK szignalizációs útvonal a kis GTPázokon keresztül, ezért ezt is gátoltuk az U0126-tal, mely hatékonyan megszüntette az LTP kialakulást ($20 \mu\text{M}$; 0.88 ± 0.05 , $n=9$).

Összefoglalva tehát a dendritikus spike-ot kiváltó lokális bemenet mintázatok képesek kiváltani térben közeli színapszisok heteroszínaptikus potencírozódását, ami kevésbé hatékony, mint a homoszinaptikus LTP, valamint NMDAR és MEK/ERK jelátviteli útvonal által mediált.

Következtetések

In vitro és in silico módszerekkel feltérképeztük a térben egymáshoz közeli színapszisok közti kölcsönhatásokat a CA1-es piramisettek szóma közeli dendritjei mentén.

Megmutattuk, hogy kisszámú klaszterezett bemenetek küszöb-alatti aktivációja kooperatív NMDA receptor függő szupralineáris Ca^{2+} jel növekedéshez vezet a szinkron aktív dendrittűskékben, azonban ez az amplifikáció csak disztális dendritszakaszokon volt megfigyelhető, proximálisan nem.

A megfigyelt jelentős Ca^{2+} jel növekedés alapján megvizsgáltuk a disztális dendriteken elhelyezkedő színapszisok plaszticitását. Ehhez szinkron stimuláltunk 3-4 színapszist 50-szer 3Hz-en 2-foton glutamát-felszabadítás segítségével, mely stimulus mintázat kooperatív, bemenet specifikus LTP-hez vezetett az aktivált színapszisokban. A Ca^{2+} jel amplifikációhoz hasonlóan a küszöb alatti kooperatív LTP is követte a dendritfák impedancia profilját. Az aktív színapszisok közötti távolságnak nagyon kicsinek kell lennie ($\leq 5 \mu\text{m}$), ami arra utal, hogy nagy mennyiségű lokális intracelluláris Ca^{2+} szükséges a színaptikus potencírozódás kialakulásához.

Dendritikus spike kiváltására képes, erős bemenetmintázat használata esetén bizonyos lokális szinaptikus szabályok módosultak. Először is megmutattuk, hogy proximális dendritszakaszokon szükségesek a regeneratív feszültségjelek az LTP kialakulásához. Disztális dendritszakaszokon dendritikus spike kiváltása mellett ugyan nem tapasztaltunk növekedést az LTP nagyságában, azonban lehetővé tették egymástól távolabb elhelyezkedő szinapszisok erősödését is, kibővítve a lokális LTP-t dendritág-specifikus formára. Továbbá a dendritikus spike-ok kiváltásával kevesebb ismétlés szám (50 helyett 5 ismétlés) is elegendő volt az LTP protokoll alatt a potencírozódás kiváltásához.

A dendritikus spike-ok kiváltásával továbbá nem csak homoszinaptikus LTP-t váltottunk ki, hanem bizonyos esetekben a közelben elhelyezkedő nem aktivált szinapszisok erősödését is, ami heteroszínaptikus LTP-re utal. Ez a típusú LTP kevésbé volt hatékony, mint a homoszinaptikus LTP, de előfordulása magasabb volt, mint véletlen valószínűség. Az általunk bemutatott heteroszínaptikus LTP NMDA receptor függő, és a MEK/ERK szignalizációs útvonal által mediált, továbbá adataink arra utalnak, hogy a feszültség-függő Ca^{2+} csatornáknak szerepe lehet a potencírozódás stabilizálásában. Továbbá *in silico* CA1-es piramissejt modell segítségével bebizonyítottuk, hogy a heteroszínaptikus LTP alatt mért EPSP amplitúdók növekedése nem magyarázható az általános dendritikus serkenthetőség növekedésével.

Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények:

- Weber, J. P., Andrásfalvy, B. K., Polito, M., Magó, Á., Ujfalussy, B. B., Makara, J.K.
Location-dependent synaptic plasticity rules by dendritic spine cooperativity.
NATURE COMMUNICATIONS 7 p. 11380, 14 p. (2016)
IF: 12,124
- Magó Á., Weber, J. P., Ujfalussy B. B., Makara, J. K.
Synaptic Plasticity Depends on the Fine-Scale Input Pattern in Thin Dendrites of CA1 Pyramidal Neurons.
JOURNAL OF NEUROSCIENCE 40: 13 pp. 2593-2605. (2020)
IF: 5,674

Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – eredeti közlemények:

- Raus Balind, S., Magó, Á., Ahmadi, M., Kis, N., Varga-Németh, Z., Lőrincz, A., Makara, J. K.
Diverse synaptic and dendritic mechanisms of complex spike burst generation in hippocampal CA3 pyramidal cells
NATURE COMMUNICATIONS 10: 1 Paper: 1859, 15 p. (2019)
IF: 12,124