

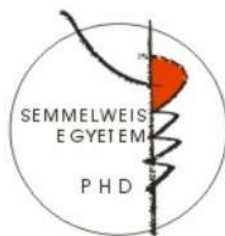
A hippokampális gátló sejtek funkcionális diverzitásának és kapcsolatainak vizsgálata

Ph.D. tézis

Oláh Viktor János

Semmelweis Egyetem

Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Szabadics János, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók:

Dr. Puskár Zita, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Dr. Lőrincz Magor László, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Enyedi Péter, DSc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Köles László, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Barthó Péter, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Budapest

2020

1. BEVEZETÉS

Az összetett viselkedésmintázatok kialakulásához gyors és hatékony információfeldolgozásra van szükség, amit az emlős agy specializált neuronális hálózatok közötti precíz kommunikációval valósít meg. Ezeket a hálózatokat számos eltérő sejtípus építi fel, melyek az egyedi szinaptikus kapcsoltságuknak köszönhetően eltérő funkcionalitással bírhatnak. A hálózatokat alkotó építőelemek száma azonban teoretikus felső határt szab az idegrendszer válaszadási lehetőségeinek, melyet az agyunk sejtípusok közti és sejtípusokon belüli diverzitásokkal hidal át. A neuronális diverzitás jól dokumentált a helyi hálózatok kapcsoltsági és szubcelluláris szintjén is, ami terjedhet a sejtek nyúlványainak számától, hosszától és komplexitásától a passzív és aktív elektromos tulajdonságaikig is. A heterogén anatómiai és funkcionális tulajdonságok változatos információ feldolgozási lehetőségeket biztosítanak az egyes sejtek számára, ami hozzájárul ahhoz, hogy az idegrendszerünk megfelelően válaszoljon a környezetünkből beérkező ingerekre. Ennek fényében ahhoz, hogy megismerhessük a központi idegrendszer működését és az egyes agyi régiók élettani szerepét, fontos hogy pontosan megismerjük a hálózatokban jelenlévő sejtípusok diverzitását és szinaptikus kapcsoltságát.

A doktori tanulmányaim során a hippokampusz sejtjeinek heterogenitásait tanulmányoztuk. Ez az agyi régió alapvető szerepet játszik bizonyos tanulási folyamatokban, a memórianyomok kódolásában és tárolásában, illetve a térbeli tájékozódásban is.

Az első munkám során megvizsgáltuk a hippocampális előre csatoló gátlás kapcsoltságát egyedi sejtek szintjén. Az előre csatoló gátlás kapcsoltsági séma számos kérgi hálózatban nélkülözhetetlen a pontos információtovábbításhoz. A hippocampális CA3 régió beidegzése a gírusz dentátusz (GD) által egy klasszikus előre csatoló gátló hálózat az anatómiai és fiziológiai sajátosságait tekintve, mivel a GD fősejtjeitől érkező axonok, a moharostok eltérő tulajdonságú kapcsolatokat alakítanak ki a CA3 régió gátló és serkentő sejtjeivel. Röviden összefoglalva, a moharost axonok szokatlanul nagy axon terminálisokkal lépnek kapcsolatba a CA3 régió serkentő piramissejtjeivel. Ez a kapcsolat erős és facilitációt mutat. Így piramissejteket hatékonyan tudja kisütni a hosszabb moharost aktivitás. Ezzel szemben, a moharostok depresszázó kapcsolatokat alkotnak a gátló sejtekkel, hagyományos, kis méretű axonterminálisokon keresztül. Az utóbbi kapcsolatok is megbízhatóak és több mint tízszer gyakrabban fordulnak elő, mint az óriás méretű moharost terminálisok. Így habár a CA3 régió erős serkentést kap a GD-ből, a moharost pálya aktivációja hatékonyan hozza működésbe a CA3 régió helyi gátló sejtjeit, ami a továbbított információ precíz szabályozását teheti lehetővé. Kulcsfontosságú megismernünk hogy az előre csatoló gátlás milyen módon szerveződik az egyes sejtek szintjén, figyelembe véve, hogy a különböző kapcsoltsági sémák nagyban eltérő funkciót eredményezhetnek.

A második munkám során az előre csatoló gátlásban részt vevő CA3 gátló sejtek funkcionális sokszínűségét vizsgáltuk. Ismert, hogy a hippocampusban számos különböző sejtípus található, melyek eltérő szerepet töltenek be a hálózatban részt vevő sejtek aktivitásának szabályozásában. Az elmúlt

évtizedek anatómiai és fiziológiai munkái révén ma már jól ismert a gátló sejtípusok sokszínűsége. Azonban az elmúlt években kifejlesztett egy sejt teljes RNS állományát vizsgálni képes technológiák azt sugallják, hogy a gátló sejtípusok száma lényegesen magasabb, mint azt eddig gondoltuk. Tehát a hagyományos és transzkriptomikai kategóriák között még nem teljes az összhang. Az érdeklődésünk középpontjában a CA3 régió egyik legsokszínűbb gátló sejtípusa a kolecisztokinint kifejező interneuronok (CCK+IN) álltak. Ezek a sejtek heterogén anatómiai sajátosságokkal rendelkeznek mind axonális arborizációjuk, mind molekuláris összetételük tekintetében. Azonban az *in vitro* mért tüzelési viselkedésük nagyban megegyezik. Mindemellett, *in vivo* mérések azt mutatták, hogy egyes CCK+IN-k különböző hálózati oszcillációk alatt aktívak. Ezeknek a komplexitásoknak köszönhetően a CCK+IN-k ideálisak a sejtípusok közötti határok feltérképezésére egy tágabb szemszögből, mely figyelembe veszi a sejtek genetikai állományát, molekuláris összetételét, morfológiáját, serkenthetőségét és az egyes hálózati funkciókban betöltött szerepüket is.

A doktori munkám során végzett kutatásaim patch clamp elektrofiziológiai méréseken alapulnak, gyakran kis méretű neuronális nyúlványokból, amely számos technikai limitációtól szenved. A harmadik témám során számítógépes szimulációkkal számszerűsítettük a patch clamp mérések hibáit és kerestünk lehetséges korrekciós eljárásokat. Ennek a kérdésnek a megválaszolásához figyelembe kell vennünk az egyik fő korlátozó tényezőt, a patch pipetta passzív fizikai tulajdonságait, melyek jelenléte kétféle képen képes megváltoztatni a mért jelek alakját: egyrészt a pipetta kapacitás és ellenállás egy alul-áteresztő szűrőt alkot, ami

a gyors jeleket csökkenti (szűrő hatás), másrészt a passzív pipetta komponensek jelenléte közvetlenül befolyásolhatja a struktúra elektromos környezetét, így annak jelgenerálását is (megfigyelő hatás). Elméletileg azonban lehetséges a natív jelek visszanyerése erősen torzított potenciál mérésekből is, ha ismert a biológiai struktúra pontos morfológiája és elektromos tulajdonságai, továbbá feltérképezett a mérési műszerek fenomenologikus viselkedése.

2. CÉLKITŰZÉSEK

I/1. A doktori munkám első célja az volt, hogy feltárjuk a GD fő sejtjeitől érkező előre csatoló gátlás kapcsoltságai sémáját a CA3 piramisneuronokra egy sejt szinten.

A doktori értekezésemben bemutatott második munkámban a hippokampális CA3 régió CCK+ gátló sejtjeinek funkcionális sokszínűségét vizsgáltuk meg. A kutatás során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

II/1. Milyen funkcionális különbségek találhatóak a CA3 régió CCK+ gátló sejtjei között széles fiziológiailag releváns membránpotenciál (MP) tartományokban?

II/2. Milyen ion csatorna konduktanciák felelősek az CCK+IN-k eltérő serkentetőségéért?

II/3. Hogyan viselkednek az eltérő serkentetőségű CCK+IN-k realisztikus idegsejt hálózat aktivitások alatt?

II/4. Milyen molekuláris eltérések szolgálnak a CCK+IN-k eltérő serkentetőségének alapjául?

Végezetül megvizsgáltuk a patch clamp feszültség mérések megbízhatóságát kis méretű struktúrák esetén. Az alábbi kérdések megválaszolását tűztük ki célul:

III/1. Visszanyerhető-e a natív feszültség jel a mérőműszerek viselkedésének és a struktúra morfológiájának ismeretével?

III/2. Mi a szűrő hatás és a megfigyelő hatás független szerepe a feszültségjelek mérési hibájában?

3. MÓDSZEREK

3.1 Szelet készítés és elektrofiziológia

Kérdéseink kísérletes megválaszolásához nemtől függetlenül 21-36 napos Wistar patkányokat használtunk fel. Az állatokat izoflurán altatás alatt dekapitáltuk, majd kiemeltük az agyat a koponyából, és olyan 350 μm vastag szeleteket készítettünk, amely tartalmazta a hippocampus régiót. A szeleteket egy felsőállású mikroszkóphoz kapcsolt szelettartó kamrában rögzítettük, melyben 1-2 ml/perc-es átáramlási sebesség mellett folyamatosan keringett az elvezető oldat. A kísérleteket az állatok élettani testhőmérsékletéhez közeli hőmérsékleten (35 $^{\circ}\text{C}$ -on) végeztük. A célzott elvezetésekhez infravörös differenciál interferencia kontraszt videó-mikroszkópiát használtunk. A patch clamp pipettákat boroszilikát üvegapillárisokból készítettük és K-glükonát alapú intracelluláris oldattal töltöttük fel.

Számos eltérő patch clamp konfigurációt használtunk fel kísérleteink során a vizsgált kérdés és szubcelluláris nyúlvány méretének függvényében. Az első témám során páros elvezetéseket végeztünk a CA3 régió piramissejtjeiből és CA3-beli szemcsesejtek

sejttestjéből, vagy közvetlenül a preszinaptikus moharost axonok nagy méretű terminálisaiból a stratum lucidum régióban. A preszinaptikus akciós potenciálok kiváltása a nagy méretű terminálisok membránjának betörése nélkül („cell-attached” konfiguráció) történtek, majd a teljes-sejt elvezetések során intracellulárisan jelöltük őket későbbi morfológiai vizsgálatokhoz. A sejttestből (első és második téma) és az axonból (harmadik téma) végzett feszültség-mérések során a sejtek emelkedő áramlépcsőkre adott feszültség válaszai minden esetben felvételre kerültek. A második bemutatott kutatási téma során a CCK+IN-k MP-függő aktivitását vizsgáltuk, így ezeknél a méréseknél két különböző MP-on vettük fel a sejtek tüzelési mintázatát.

Szomatikus és dendritikus aktív konduktanciákat teljes-sejt árammérésekkel, izolált szomatikus membránt tartalmazó nukleált patch mérésekkel és outside-out mérésekkel (második téma) vizsgáltuk meg. Ezen mérések során a feszültség protokollok úgy voltak kialakítva, hogy az inaktíváló kálium áramok aktivációs és inaktívációs kinetikáját és MP függését is feltérképezhessük. Röviden, a sejteket vagy membránokat -120 mV-on tartottuk 300 ms-on keresztül, majd pozitívabb áramlépcsőket injektáltunk a sejtbe (-120 és -20 mV közötti tartományokon 300 ms hosszan az áram kinetikájának és az aktiváció MP függésének vizsgálatához). Végezetül a sejtek -30 mV-ra lettek léptetve 100 ms-on keresztül (a inaktíváció MP-függésének vizsgálatához). A kálium áram mérések a passzív áramok levonásával történtek a mérés közben a P/-4 protokoll segítségével.

3.2. Számítógépes modellezés

A modellezést a NEURON 7.5 és 7.6-os szimulációs környezetben végeztük. A második téma során morfológiai rekonstrukciókat készítettünk öt CCK+IN-ból ahhoz, hogy feltérképezhessük az inaktíváló káliumáramok eltérő tulajdonságainak hatását a sejtek viselkedésére. Két kálium konduktancia modellt alkottunk olyan teljes-sejt feszültségmérések alapján, melyek egy specifikus Kv4.2 és Kv4.3 csatorna blokkoló jelenlétében készültek, továbbá dendritikus és szomatikus outside-out patch mérések alapján. Utóbbiakra az inaktíváló káliumáramok szomato-dendritikus eloszlásának feltérképezése végett volt szükség. Első lépésként egy alacsony feszültségen aktiválódó és inaktíváló káliumáram modellt készítettünk a hagyományosan tüzelő CCK+IN-k mérései alapján (lásd eredmények). Ezt a konduktancia modellt felhasználva egy második, kiegészítő konduktancia modellt hoztunk létre, mely az elsővel együttesen képes volt a rektifikáló sejtekből mért áram és feszültség mérések reprodukálására (lásd eredmények). A modelleket további aktív konduktanciákkal egészítettük ki az irodalom alapján a CCK+IN-k feszültségválaszainak modellezéséhez. Az elkészített egy-sejt modellek szomato-dendritikus felszínén serkentő és gátló szinaptikus bemeneteket helyeztünk el, melyek amplitúdója méréseinken alapult és időzítésüket meghatározott hálózati oszcillációs frekvenciák szimulálására állítottuk be. Ahhoz, hogy megvizsgálhassuk a két kálium konduktancia modell hozzájárulását a CCK+IN-k viselkedéséhez, minden szimulációt két alkalommal futtattunk le. A két futtatás csak abban különbözött, hogy kálium konduktancia modelleket kicseréltük, majd a sejtek tüzelési tulajdonságait összehasonlítottuk.

A harmadik téma során az elvezetett moharost axon natív elektromos viselkedését négy egymást követő lépésben nyertük vissza. Először a feszültség méréseink alapján meghatároztuk a mérő pipetta passzív tulajdonságait. Következő lépésként a mérő műszerek fenomenológikus reprezentációját hozzákapszolva az axon részletes morfológiai modelljéhez visszanyertük a biológiai struktúra passzív elektromos tulajdonságait és a pipetta és a sejt között fellépő soros ellenállást (R_{access}) a feszültség méréseink alapján. Az axont a aktív nátrium és káliumcsatorna modellekkel láttuk el, melyek tulajdonságai szabadon állíthatók a mérési feszültségjelek alakjának reprodukálásához.

3.3 Az erősítő modell

A patch clamp erősítő viselkedésének feltérképezéséhez három különböző tesztelő konfigurációban végeztük méréseket, melyek a NEURON szimulációs környezetben lineáris áramköri elemekből épített modell finomhangolására lettek felhasználva. Az első teszt során a valós feszültség mérő áramkör válaszait mértük nyílt áramkörként, elektróda tartó, pipetta és földelés nélkül. Ez a konfiguráció lehetővé tette a frekvencia gyorsító áramköri elem és a feszültség mérő rendszer kapacitás kompenzáló áramkörének a leírását. Hasonló nyílt áramkör nem használható áram mérések esetén, így a kört egy ismert ellenállással zártuk a második teszt áramkörben. A harmadik konfigurációban egy módosított 1U modell sejtet (Molecular Devices) használtunk fel, ami a sejt és a pipetta passzív elektromos áramkörét reprezentálta egy adott ellenállással és kapacitással, így alkalmas volt teljes-sejt elvezetések szimulálására.

4. EREDMÉNYEK

4.1 Véletlenszerűen rendeződő előre csatoló gátlás egyedi szemcsesejtekről CA3 piramissejtekre (I/1. kérdés)

A DG-ból a CA3 régióba érkező előrecsatoló gátlás lehetséges kapcsolati sémáinak elkülönítéséhez diszinaptikus gátló eseményeket (diIPSC) vezettünk el piramissejtekből egyetlen moharost bemenet aktiválásnak hatására. Ezek a diIPSC-k a moharost bemenetnek stimulálásából fakadó megbízható aktiválódását jelzik egy általunk nem elvezetett lokális gátló sejtnek. A kisült interneuron következő lépésként karakterisztikus gátlást biztosít a piramissejt számára egy olyan időablakban, ami konzisztens két szinaptikus lépéssel (2-7 ms). A monoszínaptikus serkentés és diszinaptikus gátlás jelenléte egy piramissejten tehát egy olyan kapcsolati rendszer jelenlétét mutatja, melyben a stimulált moharost bemenetet ad mind a piramissejtre, mind egy olyan gátló sejtire, amely gátolja a közvetlenül serkentett piramissejtet.

Miután az elvezetett piramissejteket két csoportra osztottuk az alapján, hogy kaptak-e közvetlen serkentést az általunk stimulált moharostról azt találtuk, hogy a diIPSC-k valószínűsége hasonló volt a két piramissejt csoportban (5 diIPSC kapcsolat a 42 tesztelt, közvetlenül serkentett párból, 11.9%; 34 diIPSC kapcsolat 321 tesztelt, közvetlen serkentést nem kapó párból, 10.6%). A hasonló kapcsolati arányok azt jelentik, hogy a közvetlenül serkentett piramissejtek nincsenek

megkívélve, sem preferálva az egyetlen moharost bemenet által kiváltott előre csatoló gátlás által. Ez konzisztens az előre csatoló gátlás véletlenszerű rendeződésével egyedi moharost bemeneteket tekintve, ami lehetővé teszi a CA3 régió általános aktivitásának modulálását a GD állapota alapján.

4.2 A CA3 régióban található CCK+IN-k fele állapotfüggő tüzelési aktivitást mutat (II/1. kérdés)

A CA3 régióban található CCK+IN-k funkcionális sokszínűségét tanulmányozásához különböző állapotokban vizsgáltuk meg a tüzelési karakterisztikájukat. Az elvezetett sejtek két kiindulási MP-ről lettek stimulálva növekvő áramlépcsőkkel a tüzelési mintázatuk állapotfüggésének feltérképezéséhez; egy enyhén depolarizált MP-ről (-60 - -65 mV-os tartományban, a nyugalmi MP: -64.7 ± 0.4 mV) és egy hiperpolarizált mMP-ről (-75 és -80 mV között). Amikor a tüzelési karakterisztika depolarizált MP-on volt vizsgálva, az elvezetett sejtek a CCK+IN-ra jellemző akkomodáló tüzelést mutattak. Ezzel szemben, amikor a sejtek hiperpolarizált MP-ről voltak stimulálva, az elvezetett sejtek felében az akciós potenciálok (AP-k) gátolva voltak a tüzelési mintázat elején (átlagosan 252 ± 15 ms hosszan). Ezekre a sejtekre TOR sejt-ként hivatkozunk (a tranzienst kimenő rektifikáció angol rövidítéseként). A sejtek másik fele az RS nevet viseli (regular spiking), tekintettel hagyományos tüzelési mintázatukra, ami nem mutatott MP-függést.

Következő lépésként azt vizsgáltuk meg, hogy a két tüzelési karakterisztika összefüggésbe hozható-e a CCK+IN-k korábban ismert diverzitásaival. Az eredményeink azt mutatták, hogy a CA3 régió kosársejtjei, moharost asszociált sejtjei és Schaffer

kollaterális asszociált sejtjei között megtalálhatók mind a TOR, mind az RS tüzelési fenotípussal rendelkező sejtek. Tekintettel arra, hogy a CCK+IN-k egyes csoportjai eltérően fejeznek ki bizonyos molekulákat, megvizsgáltuk a sejtek molekuláris összetételét egy-sejt RNS szekvenálás módszerével. Mind az mRNS adat, mind az validálásra használt immunhisztokémia azt mutatta, hogy a két tüzelési fenotípus nem kapcsolható össze a CCK+IN-k korábban ismert alcsoportjaival.

4.3 Alacsony feszültségen aktiválódó káliumcsatornák (I_{SA}) eltérő tulajdonságai állnak a CCK+IN-k heterogenitásának hátterében (II/3. kérdés)

A két eltérő tüzelési aktivitás hátterében álló konduktanciák feltérképezését tűztük ki következő lépésként. A figyelmünk középpontjában az AP küszöb közelében aktiválódó káliumáramok álltak a tüzelési mintázat kimenő rektifikációja miatt. A méréseink azt mutatták, hogy a TOR sejtekben nagy mennyiségű inaktiválódó káliumáram található a küszöb-potenciál alatt, szemben az RS sejtekkel, melyekben lényegesen kevesebb, pozitívabb MP-on aktiválódó tranzienst káliumáramot mértünk. Fontos kiemelni, hogy az I_{SA} inaktivációs göbéjéből kiderült, hogy a TOR sejtkeben ezek az áramok nagyrészt elérhetőek hiperpolarizált MP-on ($91.3 \pm 1.6\%$ -80 mV-on), ahol a tüzelési mintázat gátlását kimutattuk. Azonban -60 mV-on, ahol a tüzelés rektifikációja nem volt számottevő, a kimenő áramok jelentős része inaktiválódott ($35.7 \pm 3.4\%$ volt elérhető). Ezen tulajdonságainak köszönhetően az I_{SA} áramok jelenléte megmagyarázza a TOR tüzelési fenotípust.

4.4 A TOR sejtek szelektív csendesítése az I_{SA} által egy szűk oszcillációs tartományban (II/3. kérdés)

A teljes-sejt elvezetéseink és az I_{SA} feltérképezett szomato-dendritikus eloszlása alapján realiztikus több-kompartmenses egy-sejt CCK+IN modelleket készítettünk, melyek képesek voltak a TOR és RS tüzelési aktivitás *in silico* reprezentálására. Ezen modelleket felhasználva szimuláltuk a két tüzelési fenotípus aktivitását *in vivo*-hoz hasonló hálüzati oszcillációs körülmények között. Amikor összehasonlítottuk a TOR vagy RS I_{SA} modelleket tartalmazó sejtek átlagos tüzelési frekvenciáját azt találtuk, hogy a két modell tüzelési aktivitása nagyrészt megegyezik. Azonban egy szűk oszcillációs tartományban (8-15 Hz) a CCK+IN-k aktivitása lecsökkent amikor a modelleket a TOR sejtekre jellemző I_{SA} konduktanciával láttuk el. Ez a csendesítés átlagosan 39.1 ± 0.6 %-al kevesebb AP-t jelent a TOR sejtek esetén. Összegezve tehát azt találtuk, hogy az I_{SA} áramok eltérő tulajdonságai elegendőek az egyes, máskülöben azonos neuronális csoportokhoz tartozó sejtek eltérő funkcionális kialakításához.

4.5 A CCK+IN-k funkcionális specifikációját eltérő Kv4.3 káliumcsatorna járulékos alegység tartalom határozza meg (II/4. kérdés)

A CCK+IN-k eltérő tüzelési fenotípusainak hátterében álló molekuláris különbségek vizsgálatát a káliumáramok farmakológiai elkülönítésével kezdtük. Ezen méréseink azt mutatták, hogy a Kv4-es csatornák blokkolása szelektíven képes a TOR jelenség gátlására. Azonban amikor eredményeinket immunhisztokémiai és mRNS adatokkal is alá akartuk támasztani azt találtuk, hogy a TOR és RS sejtek hasonló mennyiségű Kv4.3-as csatornát tartalmaznak. Fontos megjegyezni, hogy a csatorna tulajdonságait nem csak a központi csatorna

alegységek, hanem járulékos alegységek is befolyásolják. Miután újraanalizáltuk az mRNS adathalmazunkat egyedi exonok szintjén, azt találtuk, hogy a TOR és RS sejtek eltérő járulékos alegység izoformákat tartalmaznak; a TOR sejtekben a KChIP4e, míg az RS sejtekben a KChIP1 volt jelen nagy mennyiségben. A különböző KChIP tartalom megmagyarázza a két tüzelési fenotípus káliumáramainak eltérő tulajdonságait, tekintettel arra, hogy a többi KChIP-el ellentétben, beleértve az RS sejtekben jelenlévő KChIP1-et és a többi KChIP4-et is, a KChIP4e nem segíti elő a Kv4.3 sejtfelszíni kifejeződését, lelassítja az inaktivációs kinetikát és segít a kálium csatornák feszültség-függésének balra tolásában egy másik járulékos alegység családdal, a DDP-vel együtt (melyekből a TOR és RS sejtek szintén eltérő izoformákat tartalmaznak). Összegezve, az eredményeink bemutatták, hogy a CCK+ gátló sejtek eltérő funkcionalitását apró különbségek hozzák létre; néhány járulékos csatorna alegység különböző izoforma készletének elérhetősége.

4.6 Natív membrán dinamika visszanyerése axonális elvezetésekből (III/1. kérdés)

Kis méretű struktúrák natív elektromos viselkedésének feltérképezése érdekében elkészítettük a patch clamp erősítő méréseken alapuló fenomenologisztikus modelljét és a méréshez használt pipetta nonlinearis passzív reprezentációját. Ahhoz, hogy bemutassuk a modellünk adta lehetőségeket gyors natív jelek prediktálásra, AP mérések modellezését tűztük ki célul kis méretű azonosított moharost terminálisokból. A modellünk eredményei azt mutatták, hogy habár az elvezetett AP-k lassabbak és kisebb amplitúdóval rendelkeznek (AP csúcs: 7.26 ± 0.24 mV, AP

félszélesség: 0.5 ± 0.002 ms) mint azt korábban az irodalomban leírták, a natív AP predikciók – melyeket a modellünkben jelenlévő erősítő és pipetta eltávolításával, idealizált körülmények között nyerhetünk vissza – lényegesen gyorsabbak és nagyobbak a méréseinknél (AP csúcs: 48.5 ± 0.24 mV, AP félszélesség: 0.297 ± 0.004 ms).

A modellünk prediktív erejének demonstrálásához natív AP alakokat nyertünk vissza ugyanabból az axonból olyan mérésekből, melyek eltérő mennyiségű kompenzáción estek át a mérés során, így a regisztrált jelek alakja nagyban eltért. Viszont a visszanyert natív AP alakok hasonlóak voltak függetlenül a mérési kompenzációtól. Ez azt mutatja, hogy a modellben hasonlóan képes visszaadni a mért AP-k natív alakját függetlenül az eltérő mérési hibáktól (az AP-k félszélessége 0.29 ± 0.006 ms, 0.297 ± 0.004 ms és 0.33 ± 0.005 ms volt alacsony, közepes és magas kapacitás neutralizáció esetén).

4.7 A mérő rendszer és a struktúra közösen határozzák meg a mért jelek torzulását kis méretű struktúrák esetén (III/2. kérdés)

A szűrő- és megfigyelő hatás független hozzájárulását a mérési hibához a mért, lokális és natív feszültségjelek szimulálásával térképeztük fel. Összehasonlítván a mért AP-k alakát a lokálisával (feszültségjel az axonban a pipetta jelenlétében), számszerűsíthettük a szűrőhatást, míg a lokális jeleket összehasonlítva a natív jelekkel, meghatározhattuk hogyan változott meg a membrán passzív elektromos környezete a mérő rendszerek hatására, más szóval a megfigyelő hatást. A szimulációkat megismételtük különböző struktúrális méretekkel és R_{access} értékekkel.

Az eredményeink azt mutatták, hogy a szűrő hatás jelentősen erősödik magas R_{access} értékek esetén mind kis, mind nagy méretű struktúrák esetén. Ezzel szemben a megfigyelő hatás alacsony R_{access} tartományokban okoz jelentős mérési hibát kis méretű struktúrák esetén, míg a nagyobb struktúrák méréseit ez a hatás nem befolyásolja. Tehát a modellünk szimulációi rávilágítottak egy struktúra méret függő mérő rendszer okozta mérési hibára.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

Az értekezés fő eredményei a következő pontokban foglalhatóak össze:

- Az egyes GD szemcsesejtekről érkező előre csatoló gátlás véletlenszerű a CA3 piramissejtjeire
- A CA3 régióban található CCK+IN-k fele állapotfüggő tüzelést mutatnak (TOR sejtek) és ez az újfajta heterogenitás nem hozható összefüggésbe a CCK+IN-k korábban ismert csoportjaival
- Az alacsony feszültségen aktiválódó káliumcsatornák eltérő tulajdonságai állnak a CCK+IN-k heterogenitásának hátterében
- A realiztikus modellezés kimutatta, hogy az alacsony feszültségen aktiválódó káliumkonduktancia cseréje képes reprodukálni a két eltérő serkenthetőségű CCK+IN típust
- A TOR sejtek szelektív csendesítés alatt állnak az alacsony feszültségen aktiválódó káliumcsatornáik által egy szűk oszcillációs (8 -15 Hz) tartományban

- A Kv4-es csatornák állnak mindkét sejtcsoport inaktiválódó káliumcsatornáinak háttérében, azonban a járulékos alegységekben való eltérés úgy változtatja meg a csatorna tulajdonságait, hogy az végül nagyban eltérő serkenthetőségi állapotokat eredményez
- Lehetséges a torzításmentes axonális membrándinamika visszanyerése a patch clamp erősítő *in silico* reprezentációjával és a célstruktúra pontos rekonstrukciójával.

6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

I. Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények:

Neubrandt M¹, **Oláh VJ**¹, Brunner J, Szabadics J. (2017) Feedforward inhibition is randomly wired from individual granule cells onto CA3 pyramidal cells. *Hippocampus*, 27: 1034-1039.

¹ egyenlő hozzájárulás

Oláh VJ, Lukacsovich D, Winterer J, Arszovszki A, Lőrincz A, Nusser Z, Földy C, Szabadics J. (2020) Functional specification of CCK+ interneurons by alternative isoforms of Kv4.3 auxiliary subunits. *eLife*, 2020;9:e58515.

Oláh VJ, Tarcsay G, Brunner J. Modelling the patch clamp experimental setup enables the recovery of native electrophysiological responses (*beküldés alatt*)

II. Egyéb eredeti közlemények:

Neubrandt M, **Oláh VJ**, Brunner J, Marosi EL, Soltesz I, Szabadics J. (2018) Single bursts of individual granule cells functionally rearrange feedforward inhibition. *Journal of Neuroscience*. 37: 1711-1724.