

**DENDRITIKUS JELÖSSZEGZŐDÉS
A HIPPOCAMPALIS INTERNEURONOKON**

Doktori tézis

Kaszás Attila

Semmelweis Egyetem
Szentágotthai János Doktori Iskola



Témavezető: Prof. Vizi E. Szilveszter, D.Sc
Dr. Rózsa J. Balázs, PhD

Hivatalos bírálók:
Dr. Kisvárdai Zoltán, professzor, D.Sc
Dr. Kamondi Anita, CsC

A szigorlati bizottság tagjai:
Prof. Kiss József, D.Sc (Elnök)
Dr. Ulbert István, PhD
Dr. Dobolyi Árpád, PhD

Budapest
2012

1. Bevezetés

Az idegsejtek morfológiája már régóta foglalkoztatja a kutatókat. Ramon Y Cajal volt az, aki először mutatott rá arra, hogy az axonok és a dendritek bár látszólag teljes egészében egymásba fonódnak, valójában különálló sejtnyúlványok, amelyek nem folytonos struktúrákat képeznek, és ő alkotta meg a dinamikus polarizáció elvét, amely szerint az információáramlás iránya az axonoktól a dendritek felé zajlik, a szinapszisokon át. Az eltelt évtizedekben a neuronok közti kommunikációról kialakult képünk sokat változott, mivel nem csak axo-dendritikus, de axo-axonikus és dendro-dendritikus kapcsolatokat is feltártak. Ezen túlmenően az akciós potenciál kialakulását befolyásoló komputációs jellegzetességeket is alaposan tanulmányozták az elmúlt évtizedekben.

A dolgozatomban célom az volt, hogy rámutassak: a dendriteken található, legkisebb számításra képes egység is szerepet játszhat a neuronok kimenetében. A továbbiakban rövid leírását adom a dendritek jelenleg is ismert passzív és aktív tulajdonságainak. Mivel munkám igen sok új fejlesztésű metodikát vonultat fel és alkalmaz, bemutatom az új két-foton pásztázó mikroszkópiás eljárásokat, amelyeket a celluláris vagy hálózati idegtudományi kutatások hasznosíthatnak.

1.1. Hippocampalis interneuronok

A hippocampus a medialis temporalis lebeny egy sor anatómiai struktúráját foglalja egybe, és egyike a leginkább kutatott agyterületeknek, a memóriakonszolidációban és a térbeli memória felépítésében betöltött szerepének köszönhetően. Bár sejteinek mindössze 10 százalékát adják, az interneuronokat tartják a funkcionálisan fontos struktúra alapvető szabályozó egységeinek az előrecsatoló és visszacsatoló gátlás révén. A GABAerg interneuronok osztályozása az elektrofiziológiai paramétereik, immunhisztokémiai jelölésük és beidegzésük

célpontjai alapján történt. Munkámban a hippocampalis CA1 radiatum rétegének szabályosan tüzelő sejtjeit vizsgáltam.

1.2 Dendritikus tulajdonságok

A dendritek általánosan a sejtek szinaptikus bemeneteket fogadó és azokat feldolgozó sejtnyúlványai. Elektromos tulajdonságaik szerint egy egyszerű elektromos vezetékre emlékeztetnek – ebből eredeztethető a Winfried Raal által kidolgozott kábel-elmélet, amely a dendriteken futó elektromos jelek passzív terjedését írja le. Az elmélet szerint amennyiben több bemenet érkezik, azok válaszai összeadódnak és passzív terjedéssel haladnak végig a dendriteken. A lokális gátlás és serkentés összeadódása révén juthat el az idegsejt a depolarizált állapotba, amennyiben a serkentés mértéke felülmúlja a gátlás hatását. A passzív vezetékekhez hasonlóan az áram megszökhet, valamint a membrán kapacitás aluláteresztő szűrő hatást produkál, és a jelek csökkenését a dendritátmérő szoma felé való növekedése is súlyosbítja.

Bár a szinaptikus felskálázódás részben kompenzálhatja a jelcsökkenést, már régóta ismert, hogy a dendritikus feszültségfüggő ioncsatornák sokkal inkább elősegíthetik a vezetett jel aktív erősítését. Ilyen csatornák lehetnek a feszültségfüggő kalcium (VGCC) és nátrium (Na_v) csatornák, az N-metil-D-aszpartát receptorok (NMDAR) és a nikotinos acetilkolin receptorok (nAChR). A visszaterjedő akciós potenciálok (vAP) erősítését e csatornák sűrűsége befolyásolhatja.

1.3 Dendritikus jelösszegződés

A kábel-elméletnek megfelelően, a szinaptikus bemenetek lineáris összegződése elvágna a távoli szinapszisokat attól, hogy hatással legyenek a sejt kimeneti jelére. Vajon felülírható-e ez a hatás? A piramissejtek esetén ehhez a kompartmentalizáció jelenti a kulcsot, ahol a dendritikus tüskékben a vAP-kel azonos időben érkező serkentő bemenetek szupralineáris jelösszegződést mutatnak. Bár az interneuronokon általában nincsenek vagy kis

számban fordulnak elő dendrittüskék, a válaszok funkcionális kompartmentalizációja miatt felmerült, hogy a piramissejtekhez hasonló jelösszegződés várható.

1.4 Dendritikus akciós potenciálok

Elméletileg az azonos dendritszegmensre érkező többszörös bemenetek a lokális membránpotenciált a helyben megtalálható, feszültségfüggő ioncsatornák aktivációs küszöbértéke fölé tolhatják. Az így keletkező lokális regeneratív aktivitást hívjuk dendritikus akciós potenciálnak (dAP), és típusait a benne legfőbb szerepet játszó ioncsatornák szerint különítjük el: nátrium dAP, kalcium dAP és NMDA-receptor dAP.

1.4.1 A dendritikus nátrium akciós potenciálok

A feszültségfüggő nátrium csatornák (Na_V) hatását először mint gyors prepotenciálokat figyelték meg, amelyek a szomatikus akciós potenciálok előtt jelentkeztek, gyors felfutással, az AMPA-receptor mediálta serkentő válaszok tetején ülve. Az nátrium dAP-k megjelenéséhez vezető, azonos időben aktivált szinaptikus bemenetek számát körülbelül hatra becsülték, és a jelet a Na_V -csatorna blokkoló tetrodotoxin (TTX) eltüntette.

A nátrium dAP funkcionális jelentőséggel bírhat a szinaptikus bemenetek hosszú távú potenciációjában (LTP), mivel a korábban lineáris jelösszegződést mutató hippocampalis CA1 piramissejtek dendrittüskéin nátrium dAP-k jelentkeztek, LTP-protokoll kiváltása után. Továbbá, a nátrium dAP bizonyítottan csökkentheti az akciós potenciál küszöbét.

1.4.2 Dendritikus kalcium akciós potenciálok

A kalcium dAP-k lehetnek:

1) gyorsan felfutó és lecsengő, ismétlődő események, amelyek olyan rövid szinaptikus jeleket követően alakulnak ki, amelyek elég magas amplitúdójúak a dendritikus feszültségfüggő kalcium csatornák (VGCC) aktivációs küszöbértékének eléréséhez;

2) telítődést mutató kalcium potenciálok, amelyek az aluláteresztő szűrő hatósugara alatt terjedhetnek.

A kalcium dAP-k a szómától való távolság függvényében növelik a tüzelési frekvenciát, valamint gyorsan ismétlődő szomatikus akciós potenciálokat válthatnak ki és LTP-t válthatnak ki piramis sejteken. Az ideghálózatban betöltött szerepükre a hippocampalis éles hullám-aktivitás közben, a piramis sejteken megjelenő kalcium dAP-kból következhetünk *in vivo* elvezetés során.

1.4.3 Dendritikus NMDA-receptor akciós potenciálok

Az NMDA-receptorok olyan ligandum-kapuzott ioncsatornák, amelyek nátrium és kalcium beáramlás mellett kálium kiáramlást is elősegítenek. Feszültségfüggő ioncsatornák, hiszen az aktivációjukat gátló magnézium-blokk oldása membránfeszültséghez kapcsolt. Az NMDA-receptor dAP-k olyan lokális események, amelyek körülbelül 15 bemenet szinkron aktivációjakor léphetnek fel, és passzívan terjedhetnek, amennyiben a NaV és a VGCC-k nem elérhetőek. Komplex válaszokat adhatnak, mivel aktivációjuk csatolódhat az AMPA receptorok, a NaV vagy a VGCC-k aktivációjához, de tisztán NMDA-receptorok dAP-ként is megjelenhetnek. Továbbá, a kiváltásukhoz körülbelül ~8–10 nS NMDA-konduktancia szükséges egy 25 μm -es dendritikus régió belül.

Az NMDA-receptor dAP-k befolyásolják a dendritikus jelösszegződést, mivel az általuk kiváltott kalcium beáramlás elősegítheti a helyi szinaptikus plaszticitási folyamatokat, akár a rövid vagy hosszú távú szinaptikus plaszticitást kiváltva, vagy befolyásolva az intracelluláris jelátviteli folyamatokat. Az, hogy az NMDA-receptor dAP-k kiterjedése ~20–50 μm egy akár 100 μm -t is elérő dendritszakaszon arra utal, hogy több funkcionális alegységet találhatunk egy dendritágon belül, például interneuronok esetén. Sejtspecifikusságra utal, hogy a piramis sejteken ugyanazon ágon ugyanannyit bemenetet aktiválva csoportban, vagy elszórtan a dendriten, mindkét esetben dAP-t

kapunk, amely az „egy ág – egy számítási egység” elméletet támasztja alá.

1.5 Két-foton mikroszkópia az idegtudományokban

Két-foton gerjesztés akkor történik, ha két alacsony energiájú foton együtt, egy időben gerjeszt egy fluoreszcens molekulát, amely a két elnyelt fotonnál valamivel alacsonyabb energiájú fotont emittálva tér vissza alapállapotába. A folyamat végeredményben több előnyhöz vezet:

1. Az infravörös gerjesztőfény mélyebbre lehatol a szövetben.
2. A gerjesztési pont inherens konfokalitást biztosít, ahol $z = \sim 1.5 \mu\text{m}$.
3. Kisebb a fluoreszcencia túlgerjesztési sérülés és fakulási arány.
4. Jobb jel/zaj viszony ad (csak a szükséges hely gerjesztett).

A közelmúlt két-foton mikroszkópiát érintő fejlesztései kiterjesztették a megfigyelési módokat: az egyszerű raszter és vonal menti pásztázást szabadon rajzolt vonal, többszörös vonal vagy szabadon meghatározott régió pásztázása egészíti ki. Mivel az élő szövetben a megfigyelési pontok jellemzően térben helyezkednek el, a különböző három-dimenziós (3D) pásztázási módszerek fejlesztése elkerülhetetlen volt. Két főbb 3D pásztázási vonal indult el:

1. Piezomotorral mozgatott objektívek: az objektív gyorsan rezeg a z-tengely mentén, és közben zajlik a minta pásztázása. Kevesebb műszeres változtatást, ellenben komoly szoftveres támogatást igényel, és szűk mélységi pásztázást ad, relatíve alacsony sebességgel.

2. Akusztó-optikus (AO) pásztázás: lehetővé teszi a pontok véletlenszerű megcímzését. Több AO deflektorral a pásztázás 3D-ben zajlik. A pontokat $\sim \leq 50\text{kHz}$ sebességgel érhetjük el, akár nagyobb mélységeket is megcélózva. Komoly műszeres átállást igényel és erős szoftvertámogatást.

2. Célkitűzés

I. Korábbi eredményeinkben láthattuk, hogy a szinaptikus válaszok funkcionális kompartmentekben jelennek meg az interneuronokon. Ebből kifolyólag első céljaim között ezek interakciójának karakterizálása szerepelt:

1. Vajon lokálisan és szomatikusan milyen jelösszegződés – lineáris vagy szupralineáris – jellemzi a kompartmentek egyidejű aktivációját?

2. Létezik-e kritikus időablak a koincidencia-detekcióra?

3. Vajon távolságfüggők-e az interakciók?

II: Ezt követően elektrofiziológia és 3D két-foton képalkotás és fotoaktiváció együttes alkalmazásával kívántam karakterizálni a különféle mintázatban aktivált serkentő bemeneteket hippocampalis CA1 interneuronok dendritjein:

1. Vajon az interneuronok a piramissejtekhez hasonlóan azonos szupralineáris válaszokat adnak az eltérő aktivációs mintázatra is?

2. Milyen bemeneti-kimeneti függvénnyel írható le egy adott bemeneti csoport, ha a szinkron aktivált bemenetek számát változtatjuk?

3. Egyedi szeletfenntartó kamra segítségével lehetséges-e olyan spontán válaszok megfigyelése, mint a kiváltottaké?

III. Mivel a kísérletsorozatban eddig eljutva dAP megjelenésére gyanakodhattunk, a következő cél ezek jellemzőinek leírása lett:

1. Milyen ioncsatornák vehetnek részt a dAP kialakulásában?

2. A feszültséggörbe alakja NMDA-receptor dAP-kat sejtetett. Igazolható-e ez farmakonok segítségével?

3. Vajon a VGCC és Na_v részt vesz-e a generálásában?

4. Hogyan terjednek az NMDA-receptor dAP-k?

5. Milyen viszonyban állnak a vAP-kal?

IV. Végül egy különálló tanulmányban megvizsgáltuk, milyen szerepet játszhatnak a nAChR-ok a vAP-k és az LTP kialakulásában interneuronok dendritjein.

3. Módszerek

3.1 Szelettechnika és elektrofiziológia

A 16-20 napos Wistar patkányokból nyert akut hippocampalis szeleteket szobahőmérsékleten tartottuk a mesterséges liquorban (ACSF; mM-ban: 126 NaCl, 2.5 KCl, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂, 1.25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃ és 10 glukóz). A hippocampalis CA1 radiatum réteg interneuronjait 900 nm-es infravörös oldalsó megvilágítással lokalizáltuk. Az áramzár alatti elvezetéseket 25 °C és 32 °C végeztük MultiClamp 700B erősítő és Digidata 1440 digitalizáló segítségével. A teljes-sejt elvezetésekor üvegelektrodákat használtunk (6–9 MΩ; a betöltött oldat mM-ban: 125 K-glukonát, 20 KCl, 10 HEPES, 10 Di-Tris-só foszfokreatin, 0,3 Na-GTP, 4 Mg-ATP, 10 NaCl, és 0,1 Oregon Green VAPTA-1). A terjedési sebesség mérésekor 0,2 mM Fluo-5F pentakálium só (Fluo-5F) és 0,2 mM Alexa 594 festékeket használtuk. A fokális szinaptikus stimulációhoz a 6-9 MΩ-os, ACSF-fel töltött üvegelektrodát 10-15 μm távolságra helyeztük a dendrit mellé (stimuláció: 0,1 ms, 10-50 V, 10 ms pulzusinterval; 1-3 stimulus). A vAP-kat szomatikus áraminjekcióval váltottuk ki (200–400 pA, 5 ms; 1-5 vAP-t váltottunk ki 50 Hz-cel). Az EPSP-k szinaptikus késését ellenőriztük.

3.2 Kalcium indikátor követése

A két-foton képalkotást 15-20 perccel a teljes-sejt konfiguráció elérése után kezdtük egy femtoszekundumos lézerrendszert (800-840 nm) alkalmazó, három-dimenziós (3D) két-foton pásztázó mikroszkópon. A térben normalizált és levetített Ca²⁺ válaszokat (továbbiakban 3D Ca²⁺ válasz) a nyers 3D vonalmenti görbékből számoltuk, $F(d,t)$, e képlettel: $\Delta F/F = (F(d,t) - F_0(d)) / F_0(d)$, ahol d és t a távolság- és időeltérést jelentik, és $F_0(d)$ az átlagos háttér-korrigált prestimulus fluoreszcencia a görbe menti távolság függvényében. Minden 3D Ca²⁺ válasz színekódolt (a sárgából pirosba tartó színek a növekvő Ca²⁺ válaszokat mutatják, 0–63 % $\Delta F/F$), és d és t függvényében levetített.

A kísérletek végén a regisztrált idegsejtet tartalmazó térfogatról képsorozatot készítettünk. A mérést, a valós idejű adatfelvételt és analízist Matlab-alapú és kollégám által írt szoftverrel végeztük. A statisztikai analízishez a Student-féle páros t-tesztet végeztünk. Amennyiben máshogyan nem jelezzük, az adatokat átlag $\pm$ SEM formában mutatjuk.

3.3 A szupralinearitás kiszámolása

A szomatikus elvezetésekhez a szummációs arány százalékát számoltuk (%SR) e képlettel: $\%SR = (2S - S1) / S2 * 100$, ahol 2S a meghatározott interstimulus intervallal (ISI) adott dupla stimulust jelenti, míg S1 és S2 az első és második stimulus utáni válaszokat. A dendritikus kalcium jelek követésekor a két stimulusra adott válasz számtani összegét adott L1 helyen az első stimulusra ($S1_{L1}$) és a második stimulusra ($S2_{L1}$) adott válasz utáni kalcium jelek összegének vettük ($SUM_{L1} = S1_{L1} + S2_{L1}$). Ez a számtani összeg jelenti az L1 dendritikus helyen vett lineáris szummációt. A jelintegrációs értékeket (Int) a számtani összeg és a két bemeneti hely együttes aktiválására (2S) adott válasz összevetéséből nyertük: $Int = 2S_{L1} / SUM_{L1}$ vagy $\%Int = 2S_{L1} / SUM_{L1} * 100$. A számítást elvégeztük mindkét bemeneti helyre és a köztes régióra is.

3.3 Két-fotonos glutamát fotoaktiváció

Az inaktivált glutamátot (2,5 mM; 4-Methoxy-7-Nitroindoliny (MNI)-inaktivált L-glutamát vagy (MNI)-inaktivált L-glutamát trifluoroacetát 2.5 mM) a perfúzióba adtuk. A glutamát felszabadítását 720 nm-es pulzuslézerrel végeztük. A fotolízist vagy „csoportos” (pontok közötti távolság: $0,8 \pm 0,1 \mu m$) vagy „elszórt” (pontok közötti távolság: $2,3 \pm 0,16 \mu m$) pontmintázattal végeztük, a dendrit mentén. A posztzinaptikus válaszok feltérképezését Matsuzaki et al., 2001 alapján végeztük, és az EPSC-k csúcsértékeiből színekódolt térképet készítettünk.

A farmakológiai kísérletekhez a következőket használtuk: szelektív NMDA-receptor antagonist D,L-AP5 (60 μM), Na_v

blokkoló TTX (1 μ M), VGCC blokkoló koktél (Mibefradil, 50 μ M, Nimodipine, 20 μ M, omega-Conotoxin GVIA 5 μ M).

4. Eredmények

4.1 A dendritikus kompartmentek szinaptikus jelösszegződése

Laboratóriumunk korábbi eredményei funkcionális kompartmenteket mutattak az interneuronok dendritjein. Céлом e kompartmentek interakciójának vizsgálata volt. A stimulációhoz vagy fokális elektromos stimulációt, vagy két-foton glutamát fotoaktivációt használtam, miközben két-foton képalkotást és szomatikus patch clamp elvezetést alkalmaztam. A fokális elektromos stimuláció vezikulaürülést indukál, ezért fiziológiásabbnak tekinthető, ellenben aspecifikus választ is adhat. A glutamát fotoaktivációnál a preszinaptikus oldal nem játszik szerepet, viszont biztosan lokális stimulációt ad, aspecifikus axonok serkentése nélkül. Két szomszédos régióban váltottam ki serkentő posztzinaptikus potenciálokat (EPSP) interneuronok dendritjein. A válaszokat a szomatikus elektrofiziológiai jelek és a lokális kalcium-válaszok alapján értékeltem.

A két stimulációs technika hasonló eredményeket adott:

- Mindkét technika esetén igazoltuk, hogy a lokális kalcium válaszok elkülönülő kompartmentekben jelentkeznek az egyedileg kiváltott EPSP-k esetén az interneuronok dendritjein, alátámasztva a funkcionális kompartmentalizáció elméletét akár olyan, anatómiailag elkülönülő elemek hiánya esetén is, mint a piramissejtek dendrittüskéi.
- Mindkét stimulációs módszernél a szomatikus válaszok a két kompartment azonos idejű aktiválásakor szupralineáris jelösszegződést adtak, 10-41%-ban meghaladva a számtani összeget
- A dendritikus kalcium jelek mindkét stimulációnál 20-58%-ban szupralineárisak voltak a szomszédos kompartmentek egyidejű aktivációjára

Az adataim azt mutatják, hogy a különálló dendritikus kompartmentek kihatnak egymásra és felerősíthetik egymás válaszait, mind lokális, mind szomatikus szinten.

4.2 Koincidencia-detekció az interneuronok dendritjein

A fenti kísérletekben a két különálló kompartmentet meghatározott, ám elhanyagolható késleltetéssel stimuláltuk (0,5 ms ISI), mind a fokális elektromos stimuláció, mind a glutamát fotoaktiváció esetén. Az ilyen kis késleltetést a dendrit még egyidejű serkentésként értelmezi a jelösszegződést tekintve. Felmerülhet azonban a kérdés: milyen időablakon belül érvényesül a fent leírt interakció? A kérdés megválaszolásához a késleltetést 1 és 100 ms közötti skálán változtattam (ISI [ms] = 1; 2-7; 10; 20; 30; 40; 50; 100). A fotoaktivációval kiváltott szomatikus EPSP-k területét figyelve a szupralineáris válasz 1 és 10 ms közötti késleltetés esetén maradt fenn. Továbbá, mindeközben a megfigyelt dendritek kalcium jele mind az amplitúdót, mind a görbe alatti területet nézve szupralineárisnak mutatkozott.

4.3 A szupralinearitás távolságfüggésének vizsgálata

Korábbi tanulmányok szerint az aktivált bemeneti helyek más-más szerepet játszhatnak a jelfeldolgozásban, jelösszegződésben és terjedésben a szómától való távolság függvényében. A fokális stimuláció lehetővé tette nem csak a szómától való távolság, de a kompartmentek közötti távolság hatásának vizsgálatát is. Mégis, e paraméterek szerint nem találtunk szignifikáns különbséget a jelösszegződésben.

4.4 A dendritikus jelösszegződés térbeli jellemzői

Megvizsgáltuk, hogy a bemenetek térbeli eloszlása befolyásolja-e a jelösszegződést egy adott helyen, amihez glutamát fotoaktivációval feltérképeztük az interneuronok szinapszisainak helyét a piramis sejtek esetében korábban leírt módon.

A csoportos bemeneti mintázat ($0,8 \pm 0,1 \mu\text{m/bemenet}$) minden esetben nemlineárisan növekvő 3D Ca^{2+} válaszokat eredményezett

a bemeneti szám növekedésével, éles ugrással egy adott bemeneti számnál (küszöb= $9,8 \pm 1,4$ bemenet; $n=12$ sejt), amely után a további bemenetek kevéssel emelték a választ. A szimultán mért szomatikus feszültségértékek követték ezt a tendenciát.

A nemlineáris válaszgörbe jól követhető volt több sejt esetében is. A normalizált Ca^{2+} -válaszokat küszöbhez igazítva ábrázoltuk, amely szigmoid bemeneti-kimeneti görbét rajzolt ki az átlagos válaszokat tekintve. Ugyanilyen görbét kaptunk, ha a szomatikusan felvett EPSP-k-t az aktivált bemenetek számának függvényében ábrázoltuk. Az EPSP-ket a kalcium jelek küszöbértékeihez igazítva hasonló szigmoid jellegű bemeneti-kimeneti görbét kaptunk. A feszültségválaszok „depolarizációs vállat” mutattak, vagyis a gröbe csúcsát követően megnőtt a lecsengési idejük, amely igen hasonló volt a dendritikus regeneratív aktivitás – dendritikus akciós potenciálok (dAP) – piramissejteken észlelt jelalakjához.

A kísérleteket elszórt bemeneti mintázattal megismételve sokkal lassabban emelkedő, lineáris bemeneti-kimeneti görbét kaptunk mind a lokális kalcium, mind a szomatikus válaszok esetén.

4.5 Az interneuronok dendritjei aktívak

A fenti eredmények alapján fel kívántuk térképezni, hogy a CA1 radiátum interneuronok nemlineáris dendritikus válaszai valóban dAP-ba futnak-e. Először pályastimulációval EPSP-ket váltottunk ki az interneuron dendriteken, az inpuhelyeket a kalcium jelek révén lokalizáltuk, és közben regisztráltuk a szomatikus EPSP-ket. A kiváltott és spontán válaszok összehasonlításához egy új fejlesztésű, dupla perfúziós szeletkamrát használtunk a minta megfelelő oxigenizáltságaért, és 450-600 μm vastag szövetszeleteken dolgoztunk.

Kétféle választ különítettünk el:

1. Kis amplitúdójú ($22 \pm 2\% \Delta F/F$; $n=9$ sejt), térben keskeny válaszok ($5,2 \pm 0,9 \mu\text{m}$), amelyekhez egyedi EPSP-k társultak.
2. Nagyobb amplitúdójú ($51 \pm 8\% \Delta F/F$; $P=0,005$; $n=9$ sejt), térben kiszélesedő válaszok ($13,6 \pm 2,4 \mu\text{m}$; $P=0,003$), a dAP-k jellemzőit jól követve. A posztszinaptikus potenciálok lecsengése dAP-k

esetén jelentősen nagyobb volt az EPSP-khez mérten (EPSP, $22,8 \pm 5,8$ ms; dSpike, $79,7 \pm 23,8$ ms; $P=0,02$), területük pedig $314 \pm 57\%$ ($P=0,007$; $n=9$).

A további analízishez dAP-k kiváltására volt szükség. Az alacsony stimulációs intenzitásnál kis amplitúdójú 3D Ca^{2+} válaszok és EPSP-k jelentkeztek. Megemelt stimulációkor időnként dAP-szerű válaszokat is kiváltottunk. Mind a kiváltott, mind a spontán válaszokat klaszteranalízis segítségével csoportosítottuk, amely újra két csoportot mutatott mind a kalcium, mind a feszültséggörbék esetén: EPSP-keket és dAP-keket.

4.6 A szinaptikus jelfeldolgozásban részt vevő ioncsatornák

Mind a szomatikus feszültséggörbék, mind a dendritikus Ca^{2+} -tranziensek jelalakja alapján a „depolarizáló vállal” bíró, hosszabb lecsengésű válaszokat dAP-eknek sejtettük. Ezek részletesebb jellemzésére farmakonokat használtunk.

4.6.1 NMDA receptorok

Korábbi adatok alapján úgy véltük, mindkét jellegért az NMDA-receptorok felelősek. Ennek igazolására fokális szinaptikus stimuláció mellett NMDAR antagonistát ($60\mu\text{M}$ AP5) használtuk, ami eltüntette a depolarizáló vállat a szomatikus feszültséggörbékről, és teljesen megszüntette a dendritikus Ca^{2+} -jeleket. A kimosáskor visszatértek a kontroll értékek. A következőkben glutamát fotoaktivációt alkalmaztunk csoportos pontmintázatot aktiválva az interneuron dendritek mentén, majd a perfúzióhoz NMDAR antagonistát (AP5) adtunk. Az AP5 hatása kifejezettebb volt, mint a pontok térbeli szétszórása. A fotoaktivációkor felvett szomatikus feszültséggörbék ugyanilyen eredményt mutattak.

Csoportos pontmintázat esetén a bemeneti-kimeneti görbe az aktivált bemenetek számának növekedésével NMDA-receptor blokkolása esetén jelentős csökkenést mutatott a 3D Ca^{2+} -tranziensekre nézve, ahol a jelösszegződés szupralineárisról lineárisra váltott. A megfelelő EPSP-k amplitúdója és lecsengése

kisebb mértékben, de jelentősen lecsökkent, és a bemeneti-kimeneti függvényük szintén szigmoidról lineárisra váltott.

A következőkben fokális elektromos stimuláció használtunk, magnéziummentes oldat mellett, ahol az NMDA-receptorok Mg^{2+} -blokkja természetszerűleg felold, és a teljes NMDA-receptor hatás tanulmányozható. Így a szomatikus feszültséggörbéknél kifejezetten elnyújtott depolarizációs vállat láthattunk ($p < 0,05$), míg a megfelelő Ca^{2+} -válaszok görbe alatti területe jelentősen megnőtt ($p < 0,05$). Farmakológiai kísérleteink szerint a megfigyelt dendritikus regeneratív aktivitás NMDA-receptor dAP.

4.6.2 Feszültségfüggő kalcium csatornák (VGCC)

Különféle blokkolókból álló koktélt alkalmaztunk, hogy a minden VGCC-t kizárjunk, amely a jelintegrációra hatással lehet a hippocampalis CA1 interneuronokon. A Ca_v2 alcsalád (N-, P/Q-type) blokkolását Mibefradillal ($50 \mu M$), a Ca_v1 alcsaládét (L-type) Nimodipine-nel ($20 \mu M$), míg a $Ca_v2.2$ (N-type) VGCC-ket ω -Conotoxin GVIA ($5 \mu M$) révén blokkoltuk. Eredményeink szerint – az NMDA-receptor blokkolásával ellentétben –, a VGCC-blokkoló koktél mind a dendritikus Ca^{2+} -válaszok, mind a szomatikus feszültségjelek küszöbértékét csak kis mértékben toltá el és küszöb feletti amplitúdójukat kevésbé csökkentette.

4.6.3 Feszültségfüggő nátrium csatornák (NaV)

Itt célunk annak feltárása volt, hogy a megfigyelt dAP-k tisztán NMDA-receptor dAP-k vagy kevert jelek, és vajon a dendritikus NaV aktiválódik-e és elősegíti-e a jelek aktív terjedését. Glutamát fotoaktiváció mellett nátrium csatorna blokkolót ($1 \mu M$ TTX) alkalmaztunk. Az NMDA-receptor blokkal ellentétben a TTX csak kis mértékben módosította a sejtek bemeneti-kimeneti görbáját.

4.7 A dendritikus akciós potenciálok terjedése

A korábbi kísérletek igazolták az NMDA-receptor dAP jelenlétét az interneuronokon. Következő célunk a jelek terjedésének karakterizálása volt. Itt fokális elektromos stimulációval váltottunk

ki EPSP-ket és dAP-kat, majd meghatároztuk a hozzájuk társuló kalcium jelek félérték-szélességét, amelyek kifejezett eltérést mutattak a jelek terjedését tekintve. A terjedési sebességhez az események latenciáját ábrázoltuk a távolság függvényében. Az EPSP- Ca^{2+} terjedését jól jellemezte egy parabolaillesztés, amely a diffúzió meghatározó szerepére utalt, míg a dAP-k exponenciális növekményt követtek, amely átlagosan mintegy tízszer nagyobb terjedési sebességet adott a dAP-k esetében, mint az EPSP-k esetén. Habár a hőmérséklet megemelésével jelentősen nőtt az EPSP- Ca^{2+} terjedési sebessége, a dAP-k és EPSP-k közötti szignifikáns különbség megmaradt ($p < 0,05$).

4.8 Szomatikus és dendritikus regeneratív aktivitás az interneuronokban

Van-e összefüggés a lokális dAP-k és a szomatikus akciós potenciál között? E kísérletekben az NMDA-receptor dAP-k és a visszaterjedő akciós potenciál kapcsolatát vizsgáltuk.

A korábbi adatok szerint a dendriteken erősen vagy gyengén válaszoló területeket találhatunk, amelyeket forró vagy hideg pontoknak neveztek el. Mi a lokális dAP-k és a visszaterjedő akciós potenciál (vAP) kalcium válaszait kívántuk összevetni. Fokális elektromos stimulációval EPSP-ket, dAP-kat vagy szomatikus akciós potenciálokat váltottunk ki, miközben azok dendritikus kalcium válaszait monitoroztuk. A dAP-k önállóan jól körülhatárolt 3D Ca^{2+} válaszokat adtak, míg ha szomatikus AP-kel együtt jelentkeztek, kalcium jeleik az egész dendritszegmensre kiterjedtek.

Annak megállapítására, hogy a vAP-csatolt dAP-k kalcium jelének növekménye lineáris görbét követ-e, a jelek térbeli kiterjedését elemeztük. A dAP- Ca^{2+} önmagában is kiterjedtebb volt, mint a vAP- Ca^{2+} (vAP- Ca^{2+} : 252 ± 30 nM, dAP: 620 ± 134 nM, $N=6$ sejt). Sőt, az önállóan jelentkező vAP kisebb Ca^{2+} -válaszokat adott, mint a dAP, amit egy vAP követett. Adataink szerint a dAP-k és a vAP-k szupralineáris jelösszegződést mutatnak.

4.9 A nAChRs hatása a vAP-re és LTP-re interneuronokban

Mivel az $\alpha 7$ nikotinos acetilkolin receptorok (nAChR) nagy számban találhatóak meg a hippocampalis interneuronok dendritjein, funkcionális szerepüket kerestük. Eredményeink szerint a nAChR aktivációjával egy időben jelentkező vAP-k serkentődnek, míg a később érkező vAP-k gátlódnak. A bemeneti oldalt megvizsgálva azt találtuk, hogy a nAChR agonisták LTP-t indukálhatnak a Schaffer kollaterálisok bemenetein.

5. Következtetések

A dendritikus akciós potenciálok intenzíven tanulmányozott jelenségek, mivel megnövelhetik az idegsejtek jelfeldolgozási kapacitását. Bár a principális sejtekben részletesen leírták őket, interneuronokban ilyen jelenségeket eddig nem tapasztaltak. A dolgozatomban az interneuron dendritek jelfeldolgozási jellegzetességeit tárgyaltam és tártam fel.

Kezdeként alátámasztottam, hogy a tüskementes dendritek anatómiai helyett funkcionális kompartmentalizációt mutatnak. Továbbá ezek a kompartmentek valószínűleg dinamikusan változó bemenetcsoportok, és nem a teljes dendritszegmens a legkisebb számítási egység.

Eredményeim szerint a kompartmentek egymással interakcióba léphetnek, ahol a szomszédos kompartmentek nemlineáris módon felerősíthetik egymást. Mindemellett a kompartmentek közötti interakció egy 10 ms időablakon belül szupralineáris marad elég időt hagyva a koincidenca detekcióra.

A következőkben az egyedi kompartmentek jellegzetességeit vizsgáltuk egy új, általunk kifejlesztett 3D képkalkotó eljárással. Az új módszerek elengedhetetlennek bizonyultak a tér minden irányába futó dendritnyúlványok követésekor, valamint spontán jelenségek feltérképezésekor a hosszú dendritszakaszokon. A fellelt kompartmentek a piramissejteken korábban leírt bemenet-kimeneti görbékhez hasonlóval rendelkeztek, ahol a szoros bemenetcsoportok szinkron aktiválása szinaptikus jelerősödést okozott, amely dendritikus akciós potenciálokhoz vezetett. Az

eltérő stimulációs technikák biztosították, hogy eredményeink biztos kísérletes alapokon nyugodjanak, míg szimultán alkalmazott két-foton képalkotó módszerek és elektrofiziológia bizonyította, hogy a szupralinearitás mind a lokális kalcium, mind a globálisabb, szomatikus feszültségjeleken érvényesül.

A dendritikus akciós potenciálok (dAP) kialakulásáért és jellegeiért felelős mechanizmusok leírására farmakológiai módszereket alkalmaztunk. A kalcium- (VGCC) és nátrium- (Na_v) csatornák blokkolása nem változtatta meg jelentősen a dAP-k jellegét, azonban az NMDA-receptor blokkoló AP5 mind a lokális kalcium, mind a szomatikus feszültségjelek bemeneti-kimeneti görbéjét a szupralineáris szigmoid alakról lineárisra módosította. A magnéziummentes oldattal végzett kísérletekkel együtt ez nyilvánvaló bizonyítékát adta annak, hogy az interneuron dendriteken megfigyelt regeneratív aktivitás NMDA-receptor hajtotta dendritikus akciós potenciál.

Kimutattuk továbbá, hogy az NMDA-receptor dAP kialakulási zónái forró pontokként szolgálhatnak az interneuron dendriteken, hiszen e zónákban a szinaptikus stimuláció kiváltotta válaszok szupralineáris jelet mutattak, amennyiben visszaterjedő akciós potenciállal együtt jelentkeztek.

Egy külön tanulmányunkban pedig az interneuron dendritek további paramétereit vizsgálva kimutattuk, hogy a nemszinaptikus $\alpha 7$ -nACh-receptorok módosíthatják mind a visszaterjedő akciós potenciál, mind a hosszú távú potenciáció kialakulását.

Konklúzióként elmondhatjuk, hogy eredményeink lehetővé teszik a jelfeldolgozás jobb megértését. hippocampalis interneuronok tüske nélküli dendritjein. Adataink azt sugallják, hogy a CA1 str. rad. interneuron dendritek hasonló szupralineáris jelösszegző képességgel bírnak, mint a piramissejtek dendritjei, és hogy a komplex dendritikus jelösszegzés általános jelenség az idegrendszerben. A megfigyelt dendritikus regeneratív aktivitás megnöveli az idegsejtek jelfeldolgozási kapacitását. Sőt, mivel adataink szerint a dendritikus szegmensnél kisebb számítási alegységek is léteznek, ez arra utalhat, hogy az interneuronok

sokkal bonyolultabb jelfeldolgozásra képesek, mint azt korábban gondoltuk.

A spontán jelentkező dAP-k jelenléte? abba az irányba mutat, hogy ezek a regeneratív folyamatok sokkal fontosabb szerepet játszhatnak az ideghálózat jelfeldolgozó folyamataiban, mint azt korábban gondoltuk. Az, hogy ezek a dAP-k jelentősen hozzájárulhatnak-e az olyan hálózati folyamatokhoz, mint például a hippocampalis oszcillációk, további kutatás tárgya kell, hogy legyen. Az újabb *in vivo* adatok olyan hasonló jelenségeket mutatnak, amelyek állandóan formálják és újrahangolják az idegsejtek kimenetét az agy érintetlen ideghálózatában.

6. Publikációk

6.1 A tézishoz kapcsolódó publikációk

Katona, G.*, A. Kaszas*, G. F. Turi, N. Hajos, G. Tamas, E. S. Vizi and B. Rozsa (2011) Roller Coaster Scanning reveals spontaneous triggering of dendritic spikes in CA1 interneurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(5): 2148-2153.

*Ezek a szerzők egyenlő arányban járultak hozzá a kutatáshoz.

Chiovini, B., G. F. Turi, G. Katona, A. Kaszas, F. Erdelyi, G. Szabo, H. Monyer, A. Csakanyi, E. S. Vizi and B. Rozsa (2010) Enhanced dendritic action potential backpropagation in parvalbumin-positive basket cells during sharp wave activity. *Neurochem Res* 35(12): 2086-2095.

Rozsa, B., G. Katona, A. Kaszas, R. Szipocs and E. S. Vizi (2008) Dendritic nicotinic receptors modulate backpropagating action potentials and long-term plasticity of interneurons. *Eur J Neurosci* 27(2): 364-377.

6.2 A tézishoz kapcsolódó szabadalmak

Rózsa B, Katona G, Vizi ES, Kaszás A, Turi GF

Method and measuring system for scanning multiple regions of interest (multiple free line scan). E08462011

Rózsa B, Katona G, Vizi ES, Kaszás A, Turi GF

Method and measuring system for scanning multiple regions of interest (multiple free line scan). Hivatali szám: 12/998,668

6.3 A tézishoz nem kapcsolódó publikációk

G. Katona*, G. Szalay*, P. Maák*, A. Kaszás*, Máté Veress, D.

Hillier, B. Chiovini, E. S. Vizi, B. Roska, B. Rózsa (2012) Fast two-photon in vivo imaging with three-dimensional random access scanning in large tissue volumes. *Nat Methods* 9(2): 201-208.

*Ezek a szerzők egyenlő arányban járultak hozzá a kutatáshoz.

Bhattarai, J. P.*, A. Kaszas*, S. A. Park, H. Yin, S. J. Park, A. E. Herbison, S. K. Han and I. M. Abraham (2010). Somatostatin inhibition of gonadotropin-releasing hormone neurons in female and male mice. *Endocrinology* 151(7): 3258-3266.

*Ezek a szerzők egyenlő arányban járultak hozzá a kutatáshoz.

Barabas, K., E. M. Szego, A. Kaszas, G. M. Nagy, G. D. Juhasz and I. M. Abraham (2006) Sex differences in oestrogen-induced p44/42 MAPK phosphorylation in the mouse brain in vivo. *J Neuroendocrinol* 18(8): 621-628.