A parvalbumin-pozitív periszomatikus gátlósejtek serkentő szinaptikus kapcsolatainak vizsgálata a hippokampuszban

Doktori tézisek

Papp Orsolya

Semmelweis Egyetem
Szenthágotai János Idegtudományi Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Hájos Norbert, D.Sc.
Magyar Tudományos Akadémia
Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet
Hálózat-Idegélettan Kutatócsoport

A doktori értekezés hivatalos bírálói:
Dr. Zelles Tibor, Ph.D.
Dr. Molnár Gábor, Ph.D.

A szigorlati bizottság tagjai:
Dr. Halász Béla, D.Sc.(elnök)
Dr. Wenger Tibor, D.Sc.
Dr. Tarnawa István, Ph.D.

Budapest
2013

BEVEZETÉS

A hippokampusz magasabb rendű kognitív funkciókért felelős agyterület, szerepe van a térbeli tájékozódásban; a memória rögzítés, előhívás és konszolidáció folyamata is szorosan köthető ehhez az agyrégióhoz. A kognitív folyamatokban jelentős szerepet tulajdonítanak a hippokampusz jellegzetes viselkedésfüggő aktivitásmintázatainak. A 4-8 Hz-es frekvenciatartománnyal jellemezhető theta oszcilláció előfordul éber, figyelmi állapotokban, míg egy másik jellegzetes hippokampális populációs aktivitás, az éleshullám-aktivitás nyugalmi állapotokban, evés, ivás, alvás alatt. A 30-100 Hz-es frekvenciatartományba eső gamma oszcillációk leggyakrabban theta-ba ágyazva vagy éleshullámokat követően figyelhetőek meg.

A parvalbumin-pozitív periszomatikus gátlósejtek (PV+ sejtek) központi szerepet töltenek be a különböző hálózati aktivitásmintázatok generálásában és fenntartásában. Megbízható és precízen időzített, gyors szinaptikus gátlást biztosítanak a piramissejtek periszomatikus régióján, ami képes hatékonyan szabályozni a principális sejtek kimenetét. A PV+ sejtek serkentő bemenetének genetikai módszerekkel történő befolyásolása nagymértékben megváltoztatja a hippokampális oszcillációk tulajdonságait, és ezzel párhuzamosan rontja a hippokampusz-függő tanulást, sőt, előidézhet skizofréniára jellemző viselkedési tüneteket.

A PV+ periszomatikus gátlósejtek két típusa, az axo-axonikus sejt (*axo-axonic cell*, AAC) és a gyorstüzelő kosársejt (*fast-spiking basket cell*, FS BC) a piramissejtek különböző régióit idegzik be: az AAC-k az axon iniciális szegmentumokon szinaptizálnak, míg a FS BC-k a szómát és proximális dendriteket innerválják. A két sejttípus különböző tüzelési mintázatot mutat a hippokampális oszcillációk

alatt, és eltérően aktiválódik szenzoros ingerlésre más kéregterületeken. Az eltérő kisülési aktivitás kialakításában szerepet játszhatnak a két sejttípusra érkező serkentő szinaptikus bemenetek különbségei, melyek szinapszisok tulajdonságairól eddig csak keveset tudunk.

CÉLKITŰZÉS

Kísérleteink a hippokampális PV+ sejtek serkentő szinaptikus bemeneteinek tanulmányozására irányultak. Három fő célt határoztunk meg.

Az első célunk két PV+ sejttípus, az AAC-k és a FS BC-k serkentő bemeneteiben lévő különbségek meghatározása, melyek hozzájárulhatnak a két sejttípus eltérő aktiválódásához oszcillációk alatt a hippokampusz CA3 régiójában. Az alábbi kérdésekre kerestünk válaszokat:

- Mennyire hasonlóan generálható akciós potenciál (AP) a két sejttípusban extracelluláris stimuláció segítségével?
- Van-e különbség serkentő szinaptikus bemeneteik kinetikájában?
- Egyforma sűrűségű glutamáterg beidegzést kapnak-e az AAC-k és a FS BC-k dendritjei?
- Van-e olyan különbség a dendritfa szerkezetükben, ami hozzájárul a serkentő szinaptikus bemenetbeli eltéréseikben?

Második kérdésfeltevésünk az volt, hogy képesek-e a PV+ sejtek glutamáterg bemenetei hosszútávú plasztikus változásokra? Dr. Katona István munkacsoportjának anatómiai eredményei azt mutatták,

hogy a fő agyi endokannabinoid (eCB), a 2-arachidonil-glicerol (2-AG) szintetizáló enzime, a DAG lipáz-α (DGL-α) termelődik a PV+ sejtek dendritjeiben, tehát ezek a sejtek képesek lehetnek 2-AG felszabadítására. Ezért azt vizsgáltuk, hogy kiváltható-e endokannabinoid-függő hosszútávú szinaptikus depresszió (*long-term depression*, LTD; eCB-LTD) a PV+ sejtek glutamáterg bemeneteinél. A következő kérdéseket tettük fel:

- Kiváltható-e a PV+ sejtek serkentő szinaptikus bemeneteinél LTD időzítés-függő indukciós protokollal, melyben a sejt tüzelése megelőzi a rá érkező glutamáterg serkentést?
- Indukálható-e LTD az I-típusú metabotróp glutamát receptorok ($mGluR_{1,5}$) farmakológiai aktiválásával?
- Kiváltható-e LTD hasonló körülmények között a piramissejtekben is?
- Van-e különbség a piramissejteken és a PV+ sejteken végbemenő LTD indukciós küszöbében?
- Milyen jelátviteli mechanizmus áll ezen LTD hátterében? CB_1 receptor (CB_1R) függő-e a folyamat?

Harmadik fő kérdésünk az volt, hogy hozzájárul-e a FS BC-k serkentő szinaptikus bemenetének a gyengülése a gamma oszcillációk CB_1R agonisták által kiváltott csökkenéséhez. Az alábbi kérdésekre próbáltunk választ kapni:

- Hasonlóan gyengül-e a karbakollal indukált gamma oszcilláció CB_1R agonisták hatására, mint azt leírták kainát-mediált in vitro oszcilláció-modellben?
- Hogyan befolyásolják a CB_1R agonisták a piramissejtek és a FS BC-k gamma oszcilláció alatti tüzelését?

- Mely sejt(ek) mely bemenetein fejtik ki hatásukat a CB_1R agonisták gamma oszcilláció alatt?
- Mely sejt(ek) mely bemenetei felelősek a gamma oszcilláció csökkenéséért?

MÓDSZEREK

Kísérleteinket az Állatkísérleti Etikai Bizottság irányelvei alapján és a hatályos törvény (1998. XXVIII. 243/1998.) betartása mellett végeztük. A kísérletekhez egy olyan genetikailag módosított egértörzset használtunk, amelyben a parvalbumint kifejező sejtek zöld fluoreszcens fehérjét expresszáltak, így az akut szeletekben PV+ sejtek könnyen kiválaszthatóak voltak kék fénnyel történő megvilágítással. A CB_1R-függő folyamatok vizsgálatára CB_1R génkiütött egereket, az oszcillációk tanulmányozásához pedig a CD1-es törzsből származó egereket használtuk.

Az egereket mélyaltatásban dekapitáltuk, majd az agyukból 150-200 µm vastag horizontális vagy koronális hippokampális szeleteket preparáltunk posztszinaptikus áramok és potenciálok tanulmányozására. A gamma oszcillációk vizsgálatához 350-400 µm vastag horizontális hippokampusz szeleteket készítettünk. A szeleteket oxigenáltatott mesterséges gerincvelői folyadékban (*artificial cerebrospinal fluid*, aCSF) szobahőmérsékleten inkubáltuk felhasználás előtt legalább egy órán keresztül. Mezőpotenciál, egysejt-aktivitás és *whole-cell patch-clamp* (*voltage-clamp* és *current-clamp*) méréseket végeztünk 30-32 °C-on. A serkentő posztszinaptikus áramok (*excitatory postsynaptic current*, EPSC) elkülönítésére gabazinnal (5 µM) vagy picrotoxinnal (70-100 µM) blokkoltuk a $GABA_A$ receptor-mediált gátló posztszinaptikus áramokat (*inhibitory*

postsynaptic current, IPSC). Az IPSC-k tanulmányozásakor kinurénsav (2-3 mM) segítségével blokkoltuk a serkentő bemeneteket.

Az AAC-k és FS BC-k serkentő szinaptikus bemeneteinek összehasonlításához spontán EPSC-ket (sEPSC) vezettünk el a sejtekből -60 mV-os tartópotenciál mellett. A kiváltott EPSC-ket (*evoked*, azaz eEPSC) és EPSP-ket nyugalmi membránpotenciálon mértük. A sejtek nyugalmi potenciálját a whole-cell konfiguráció elérésekor állapítottuk meg. A kisülési küszöb megállapításához a sejtek bemenetét AP kiváltásához közeli, fokozatosan növekvő intenzitású stimulussal ingereltük 10 s-onként a stratum oriensbe helyezett bipoláris stimuláló elektród segítségével. Az AMPA/KA áramok áram-feszültség (I-V) válaszgörbéjének meghatározására a sejtekből állandó intenzitású stimulussal kiváltott EPSC-ket vezettünk el különböző tartópotenciálokon (-60, -40, -20, +20 és +40 mV-on) először kontrol körülmények között, majd az AMPA/KA receptor antagonista NBQX (10 μM) jelenlétében. Az AMPA/KA receptorok közvetítette áramok nagyságát kivonással határoztuk meg. A rektifikációs indexet a -60 mV-on és +40 mV-on kapott AMPA/KA áramok arányaként definiáltuk. Az NMDA receptor-mediált áramok arányát NBQX jelenlétében -40 mV-on mért szinaptikus áramok () és a -40 mV-on kontrolban mért szinaptikus áramok hányadosából számoltuk.

A PV+ sejtek LTD-jét vizsgálni célzó kísérletekben időzítés-függő LTD-t (*spike timing-dependent* LTD, tLTD) indukáltunk: current-clamp konfigurációban a sejtben tüzelést váltottunk ki, majd 10 ms-os késéssel stimuláltuk a sejt serkentő szinaptikus bemenetét. Ezt a párosítást 600-szor ismételtük, a membránpotenciált -50 mV és -58 mV közé beállítva. Az ismétlés frekvenciája 5 vagy 10 Hz volt. A farmakológiailag indukált LTD kiváltásához a szeleteket 10 percen át $mGluR_{1/5}$ agonistával, DHPG-vel (10 vagy 50 μM koncentrációban) kezeltük. LTD-nek tekintettük a szinaptikus válaszok amplitúdójában

bekövetkező csökkenést, amely 20 perccel az indukciót követően is fennmaradt.

A CB_1R agonisták gamma oszcillációra kifejtett hatásának tanulmányozásához a 350-400 µm vastag agyszeletekben 10 µm karbakol segítségével 25-40 Hz-es mezőpotenciál-fluktuációt (*in vitro* gamma oszcillációt) indukáltunk.

A kísérletek alatt az elvezetett sejtekbe biocytint juttattunk (0.1-0.3%), ami *post hoc* előhívva lehetővé tette a sejtek morfológiai azonosítását. Az AAC-k és FS BC-k megkülönböztetésére láthatóvá tettük az axon iniciális szegmentumokat Ankyrin-G festéssel. Ez a Na^+-csatorna horgonyzó fehérje az axon iniciális szegmentumokban bedúsulást mutat, ezért alkalmas azok jelölésére.

A serkentő szinapszisok denzitásának becslésére a biocytin-jelölt sejteket tartalmazó szeleteken a vezikuláris glutamát transzporter 1 (VGluT1) és a Bassoon fehérjéket vizualizáltuk immunfestéssel. A VGluT1 a kortikális serkentő terminálisok jellemző glutamát transzportere, míg a Basson preszinaptikus aktív zóna fehérje. A hármasfestésekről 60x-os nagyítású konfokális felvételeket készítettünk és dekonvolúció után kvantifikáltuk a dendritekre érkező VGluT1 és Bassoon kettős immunpozitív kontaktusokat.

A dendritfa szerkezet-analízishez a sejtekről 20x-os nagyítású 3D konfokális képeket készítettünk. Ezek alapján rekonstruáltuk az AAC-k és a FS BC-k dendritfáját Neurolucida 8.0 szoftverrel. Branched Structure és Sholl Analízist használtunk a dendritfa szerkezet karakterizálására. A Sholl Analízist 50 µm-es rádiusszal végeztük.

EREDMÉNYEK

A PV+ sejtek serkentő szinaptikus tulajdonságainak vizsgálatára egy transzgenikus egértörzset használtunk, amelyben a zöld fluoreszcens fehérje expresszióját a PV promotere szabályozta. Ez a módszer hatékonyabbá tette a PV+ sejtek találati arányát. A *whole-cell* mérések után a szeleteket fixáltuk és a sejtekbe juttatott biocytin előhívása után a sejteket *post hoc* azonosítottuk az axonjuk elhelyezkedése alapján. Az AAC-k és FS BC-k egyértelmű elkülönítése érdekében minden esetben kettős immunjelölést végeztünk a szeleteken Ankyrin-G és biocytin ellen. AAC-nek tekintettük azokat a sejteket, amelyeknek a boutonjai az axon iniciális szegmentumokat megközelítették és azokkal párhuzamos lefutást mutattak. A FS BC-k axonjai az Ankyrin G-immunreaktív profilokat elkerülték.

I. Az axo-axonikus sejtek és kosársejtek serkentő bemeneti tulajdonságainak összehasonlítása a hippokampusz CA3 régiójában

Az AAC-k és FS BC-k serkentő szinaptikus bemeneteinek elektrofiziológiai és strukturális tulajdonságait, továbbá a két sejttípus dendritfa szerkezetét hasonlítottuk össze a hippokampusz CA3 régiójában. A CA3 régió stratum oriensben stimuláltuk a CA3 piramissejtek axonjait fokozatosan növekvő intenzitású stimulussal. Meghatároztuk a gátlósejtekben az AP kiváltásához szükséges EPSC-k nagyságát. Azt figyeltük meg, hogy az AP kiváltásához egyforma nagyságú EPSC volt szükséges a két sejttípusban. Ellenben, a FS BC-k jóval kisebb stimulus intenzitás hatására kezdtek tüzelni. Az AAC-kben és FS BC-kben -60 mV-os tartóáram mellett kiváltott EPSC-k

felfutási (a felszálló ág 20-80%-a között mérve) és lecsengési ideje nem különbözött. Mindkét sejttípusban az AMPA/KA receptorok áram-feszütség válaszgörbéje pozitív membránpotenciálokon erős inward rektifikációt mutatott. Továbbá, az NMDA receptor-mediált áramok arányában sem volt különbség a két sejttípus között. A sEPSC-k gyakorisága viszont nagyobb volt a FS BC-ken az AAC-khez képest, míg a sEPSC-k egyéb tulajdonságai (amplitúdó, felfutási idő, lecsengési idő) nem tértek el.

A sEPSC-k nagyobb frekvenciája és az AP kiváltásához szükséges kisebb stimulus intenzitás a FS BC-k esetében arra utal, hogy a FS BC-k proximális dendritszakaszaira nagyobb mennyiségű serkentő bemenet érkezik, mint az AAC-kra. Ez kétféleképpen valósulhat meg. Egyik lehetőség, hogy a két sejtnek hasonló a dendritfa szerkezete, és a kosársejteken nagyobb a serkentő szinapszisok sűrűsége; a másik lehetőség, hogy azonos sűrűségű serkentő szinapszisok mellett, a FS BC-k dendritfa szerkezete kiterjedtebb, és ezért érkezik rájuk összességében több szinapszis. A serkentő szinapszisok sűrűségének meghatározásához VGluT1-biocytin-Bassoon hármas immunjelölést készítettünk a biocytinnel töltött sejteket tartalmazó szeleteken. A VGluT1 a kortikális glutamáterg terminálisok jellegzetes markere, a Bassoon pedig a preszinaptikus aktív zóna fehérjéje. Serkentő szinapszisnak tekintettük azokat a kontaktusokat, ahol a VGlut1 és Bassoon kettős-jelölt terminálisok a dendriteket a Bassoon-jelölt profiljukkal közelítették meg. Kvantifikáltuk a biocitin jelölt dendritekre érkező serkentő szinapszisokat a stratum oriens, stratum pyramidale és stratum lucidum, illetve a stratum radiatum területén. A serkentő bemenetek sűrűsége nem különbözött az AAC-kben és az FS BC-kben. A dendritfa szerkezet különbségeinek vizsgálatához a sejtekről 3D felvételt készítettünk konfokális mikroszkóppal, és a dendriteket Neurolucida szoftverrel rekonstruáltuk. A szerkezeti analízis

eredményei azt mutatták, hogy a FS BC-k dendrithosszúsága lényegesen nagyobb a stratum oriens és stratum radiatum területén az AAC-khez képest. A részletes Sholl analízis arra utalt, hogy a FS BC-k a szóma közeli régiókban mind apikális, mind bazális irányban gyakrabban elágaznak, míg az AAC-kre apikálisan jellemzőbb a tuft-szerű dendritfa szerkezet, amelynek a szómától jóval disztálisabban gyakoriak az elágazásai. Tehát a FS BC-k a kiterjedtebb proximális dendritfa szerkezetükből adódóan nagyobb mennyiségű serkentő szinaptikus bemenetet kapnak, mint az AAC-k.

II. A parvalbumin-pozitív interneuronok serkentő szinapszisainak hosszútávú depressziója a hippokampusz CA1 régiójában

A PV+ sejtek serkentő szinapszisainak LTD-jét a stratum radiatumba helyezett stimuláló elektróddal kiváltott EPSC-ken vizsgáltuk a hippokampusz CA1 régiójában. Időzítés-függő protokollunkban az elvezetett sejtben kiváltott AP-t 10 ms-al követte a preszinaptikus bemenetek stimulálása. 5 Hz-es ismétlési frekvenciával a piramissejteken megfigyelhető volt a kiváltott EPSC-k amplitúdójának tartós csökkenése. Ugyanez a protokoll a PV+ sejtekben nem indukált tLTD-t. Ha viszont 10 Hz-el ismételtük az időzítés-függő protokollt, markáns tLTD volt kiváltható a piramissejteken és a PV+ sejteken egyaránt. Az NMDA receptor antagonista DL-AP5 (100 μM) jelenlétében is indukálható volt 10 Hz-es protokollal a tLTD mindkét sejttípuson, ami arra utal, hogy az NMDA receptorok aktivációja nem szükséges a tLTD kialakulásához. További kísérletekkel próbáltuk meg feltárni a tLTD hátterében rejlő szignalizációs útvonalat. Az $mGluR_5$ antagonista MPEP (10 μM) jelenlétében a tLTD nem volt indukálható sem a piramissejtekben, sem az interneuronokban. Ha Ca^{2+} kelátort tartalmazó pipetta oldattal

vezettünk el a sejtekből (BAPTA, 20 mM), szintén nem volt megfigyelhető tLTD, ami arra enged következtetni, hogy intracellulális Ca^{2+}-szint emelkedés is szükséges a tLTD kialakulásához. Az I-típusú mGluR stimulációja egyidejű Ca^{2+}-beáramlással a DAG bioszintéziséhez vezet, amiből a DGL-α szintetizál 2-AG-t. Ennek megfelelően, lipáz gátló THL (10 μM) jelenlétében a tLTD nem alakult ki. A 2-AG receptora a preszinaptikus membránokon található CB_1 kannabinoid receptor, amelynek az érintettségét CB_1R génkiütött (knockout, KO) állatokból és vadtípusú fajtársaikból készített szeletpreparátumokon vizsgáltuk. Míg a vad-típusú egerek szeletein kiváltható volt a tLTD, ugyanaz az indukciós protokol a CB_1R KO szeleteken nem okozott hosszútávú csökkenést az eEPSC-k amplitúdójában sem a piramissejteken, sem a PV+ interneuronokon. Ezután azt teszteltük, hogy a $mGluR_{1/5}$ farmakológiai eszközökkel történő aktiválása önmagában elég-e az LTD kiváltásához. A $mGluR_{1/5}$ agonista DHPG-ben inkubáltuk a szeleteket 10 percen keresztül és mértük az inkubálás előtti és utáni eEPSC amplitúdókat. 10 μM DHPG csak a piramissejteken váltott ki LTD-t, ellenben 50 μM DHPG mind a piramissejteken mind a PV+ sejteken robosztus LTD-t okozott. Az $mGluR_5$ antagonista MPEP (10 μM) jelenlétében nem volt indukálható LTD 50 μM DHPG-vel egyik sejttípuson sem. Az $mGluR_1$ antagonista LY367385 (100 μM) csak parciálisan védte ki az LTD-t. A sejtbe juttatott BAPTA (20 mM) ezt a típusát is okkludálta az LTD-nek a piramissejteken és PV+ sejteken egyaránt. A 10 μM THL-ben inkubált szeleteken szintén nem volt megfigyelhető LTD. A CB_1R antagonista AM 251 (2 μM) hatása ellentmondásos volt, a piramissejteken 50 μM DHPG-vel indukált LTD-t nem befolyásolta, a PV+ interneuronokon viszont kivédte. Ugyanezzel az indukciós protokollal CB_1R KO állatok szeletein nem volt kiváltható LTD. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a PV+ sejtek serkentő szinaptikus bemenetein kiváltható hosszútávú

depresszió, időzítés-függő protokollal és az $mGluR_{1/5}$ farmakológiai aktivációjával egyaránt. Azonban mindkét esetben magasabb az LTD indukciós küszöbe a PV+ sejteken a piramissejtekhez képest. Ezen LTD kialakulásának hátterében a $mGluR_5$-DGL-α-CB_1R-függő szignalizációs útvonal játszik szerepet.

III. Hogyan csökkentik a CB_1R agonisták az *in vitro* gamma oszcillációkat?

A gamma oszcillációk CB_1R agonisták-okozta csökkenésének vizsgálatához acetikolin receptor agonista karbakol (10 μM) perfúziós oldatban történő alkalmazásával indukáltunk a hippokampális szeletekben *in vitro* gamma oszcillációt. 30-32 °C-on szinkron hálózati aktivitás jött létre, amely lokális mezőpotenciál-oszcilláció formájában volt mérhető a CA3 régió piramissejtek rétegében. A CB_1R agonista WIN55,121-2 és CP55,490 (1 μM) szignifikánsan csökkentette a gamma oszcillációk teljesítménysűrűségét. CB_1R KO egerekből készült szeleteken a CB_1R agonisták hatása nem volt megfigyelhető. A CB_1R agonisták által indukált oszcilláció-gyengülés hátterében álló mechanizmusok megismerése érdekében a lokális mezőpotenciállal párhuzamosan egysejt-aktivitást mértünk. A CP55,940 csökkentette a piramissejtek és a FS BC-k tüzelési frekvenciáját egyaránt. Mindkét sejttípusban csökkent a fáziskapcsoltság erőssége a CP55,940 hatására, az átlagos fázisuk viszont nem változott. Ezután azt vizsgáltuk, hogy mely szinapszis(ok)ban bekövetkező változások járulnak hozzá a gamma oszcillációk gyengüléséhez. A CA3 stratum radiatum stimulálásával kiváltott EPSC-ket regisztráltuk CA3 piramissejtekből és FS BC-kből 10 μM karbakol jelenlétében. A piramissejteken a CP55,940 és a WIN55,212-2 (1 μM) csökkentette az eEPSC-k amplitúdóját. Mindkét

CB_1R agonista nagymértékben csökkentette a FS BC-ken kiváltott EPSC-ket is. A stratum pyramidale stimulálásával kiváltott, farmakológiailag izolált, piramissejteken mért IPSC-k amplitúdóját nem befolyásolták a CB_1R agonisták karbakol jelenlétében. Ezután azt próbáltuk feltérképezni, hogy milyen mértékben játszik szerepet a piramissejtek és az FS BC-k serkentő szinaptikus bemenete a CB_1R agonisták oszcillációra gyakorolt hatásában. Részletesebben megvizsgálva a CB_1R agonisták eEPSC-kre gyakorolt hatását, megfigyeltük, hogy a FS BC-k eEPSC amplitúdójának csökkenése időben hamarabb következik be a piramissejteken tapasztalható csökkenéshez képest. A FS BC-ken kiváltott EPSC-k amplitúdója már 5 perccel a drog bemosás után szignifikánsan csökken, míg a piramissejtek serkentő bemeneteinek gyengülése 15 perccel a CB_1R agonista adagolása után kezdődik. Ezzel párhuzamosan a FS BC-k tüzelési frekvenciája is csökken 5 perccel a drog adagolás után, amikor a piramissejtek aktivitása még változatlan. A FS BC-k aktivitásának csökkenésével egy időben a gamma oszcilláció teljesítménysűrűsége is csökkenni kezd. A bemutatott kísérletek arra engednek következtetni, hogy a FS BC-k serkentő szinaptikus bemeneteinek CB_1R-függő gyengülése fő szerepet játszik gamma oszcillációk CB_1R-okozta csökkenésében.

KÖVETKEZTETÉSEK

A bemutatott kísérletek fő célja a PV+ sejtek serkentő szinaptikus bemeneteinek részletesebb megismerése volt a hippokampusz CA3 és CA1 régiójában.

Az AAC-k és az FS BC-k serkentő szinaptikus bemeneteinek összehasonlításából megállapítottuk, hogy (1) a FS BC-k kisütéséhez

kisebb fokális stimulus szükséges, mint az AAC-k esetében, (2) a FS BC-ken nagyobb a sEPSC-k gyakorisága, (3) a serkentő bemenetek sűrűsége a két sejttípuson megegyezik, és (4) a FS BC-k dendritjei hosszabbak és dúsabban elágazóak a stratum oriensben és stratum radiatumban egyaránt. A két PV+ sejt oszcillációk alatt tapasztalható tüzelésbeli különbségeiben tehát szerepet játszhat az, hogy a két sejttípus az eltérő dendritfa szerkezetéből adódóan különböző nagyságú piramissejt populációtól kap serkentést. A kosársejtek feltételezhetően több CA3 piramissejttől kapnak bemenetet, ezért könnyebben serkentődnek az oszcillációk alatt és hatékonyabban monitorozzák a lokális sejtaktivitást.

A PV+ sejtek serkentő szinapszisainál leírtunk egy eCB-függő LTD-t, amely (1) időzítés-függő módon és $mGluR_{1/5}$ agonistával egyaránt indukálható, (2) küszöbe jelentősen magasabb, mint a piramissejteken található glutamáterg szinapszisok LTD-je, és (3) mindkét indukciós protokollal kiváltott LTD hátterében a $mGluR_5$-DGL-α-CB_1R szignalizációs útvonal áll. Tehát elmondhatjuk, hogy a PV+ sejtekben a DGL-α képes 2-AG-t szintetizálni, és ez a retrográd szignalizációs molekula felszabadulva kiválthat LTD-t a serkentő szinapszisoknál. A PV+ sejtekben a DGL-α expressziós szintje alacsonyabb, mint a piramissejtekben, ez hozzájárulhat ahhoz, hogy a PV+ sejtekben erősebb stimulusra van szükség ezen szignalizációs útvonal működtetéséhez.

A CB_1R agonisták *in vitro* gamma oszcillációkra gyakorolt hatásának mechanizmusait vizsgálva felfedtük, hogy (1) a CB_1R agonisták hatására gyengülnek a karbakol-indukált gamma oszcillációk. (2) Ezzel párhuzamosan csökkent a mind a FS BC-k, mind a piramissejtek tüzelési gyakorisága és fáziskapcsoltsága. (3) A FS BC-k és a piramissejtek serkentő szinaptikus bemeneteit egyaránt csökkentik CB_1R agonisták, a gátló bemenetüket viszont nem befolyásolják karbakol jelenlétében. (4) A FS BC-k serkentő

szinaptikus bemenetein időben hamarabb következik be a CB_1R agonisták-okozta csökkenés, és ezzel egy időben az oszcilláció teljesítménysűrűsége is kisebb lesz. Tehát a FS BC-k serkentő szinapszisainak csökkenő hatékonysága okozza elsősorban a lokális mezőpotenciál gyengülését gamma oszcillációk alatt CB_1R agonista hatására.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A disszertáció témájában megjelent közlemények:

Papp OI, Karlócai MR, Tóth EI, Freund TF and Hájos N. 2013. Different input and output properties characterize parvalbumin-positive basket and axo-axonic cells in the hippocampal CA3 subfield. Hippocampus *Közlésre elfogadva*

Holderith N, Németh B, **Papp OI**, Veres JM, Nagy GA, Hájos N. 2011. Cannabinoids attenuate hippocampal gamma oscillations by suppressing excitatory synaptic input onto CA3 pyramidal neurons and fast spiking basket cells. Journal of Physiology 589:4921-34.

Péterfi Z, Urbán GM, **Papp OI**, Németh B, Monyer H, Szabó G, Erdélyi F, Mackie K, Freund TF, Hájos N and Katona I. 2012. Endocannabinoid-mediated long-term depression of afferent excitatory synapses in hippocampal pyramidal cells and GABAergic interneurons. The Journal of Neuroscience 32:14448-63.

Egyéb közlemények:

Hájos N, Holderith N, Németh B, **Papp OI**, Szabó GG, Zemankovics R, Freund TF, Haller J. The effects of an Echinacea preparation on synaptic transmission and the firing properties of CA1 pyramidal cells in the hippocampus. Phytotherapy Research 2012 Mar; 26 (3):354-62.