

Dendritikus Ca^{2+} Spike-ok és Interneuronális Ripple Oszcillációk Gyorstüzelő, Parvalbumin Tartalmú Interneuronokon Hippokampális Sharp Wave- Ripple Aktivitás alatt

Doktori tézis

Chiovini Balázs

Semmelweis Egyetem

Szentágotthai János Doktori Iskola



Témavezető:	Rózsa J. Balázs PhD
Hivatalos bírálók:	Puskár Zita PhD Mike Árpád PhD
A szigorlati bizottság elnöke:	Tretter László DSc
A szigorlati bizottság tagjai:	Ulbert István PhD Dobolyi Árpád PhD

Budapest
2015

1. Bevezetés

A hippokampális gyorstüzelő, parvalbumint expresszáló interneuronok (FS-PV IN) fontos szerepet játszanak a sharp wave-ripple aktivitás (SPW-R) alatti szinkronizált oszcillációban és az információ feldolgozásában. Számos tény igazolja, hogy SPW-R aktivitás alatt működő sejtcsoportok dendritikus hot-spotokat képesek aktiválni, azonban a ripple aktivitás és a dendritikus hot-spotok közötti kapcsolatot ez idáig nem tanulmányozták. Eddig nem volt lehetséges a SPW-R alatti dendritikus jelfeldolgozás vizsgálata hosszú, vékony nyúlványú FS-PV IN-ban. A kérdés, hogy hogyan képes a FS-PV IN összeszervezni a kiterjedt nyúlványrendszerére érkező nagyszámú bemenetet és hogyan formálódnak a kimeneti jelei SPW-R aktivitás alatt, ez idáig ismeretlen maradt. Hogy megválaszoljam a kérdéseket háromdimenziós (3D), valós időbeli felbontással mérő 2-foton mikroszkópot használtam, ahol a FS-PV IN-nak egy időben tudtam hozzávetőlegesen az egész nyúlványhálózatát vizsgálni, SPW-R oszcilláció alatt.

1.1. Neuronális kapcsolatok a hippokampuszban

A hippokampusznak két fő serkentő pályája van. A hosszú, más néven triszinaptikus hurok a következő tengely mentén formálódik: entorhiális kéreg (EC) 2-es rétege, gyrus dentatus szemcsesejtek, CA3 (cornu ammonis), CA1 és szubikulum. A rövid, serkentő hurok az EC 3-as rétege és a CA1 között közvetlenül tart kapcsolatot, amely az EC 5-ös rétegébe vetít vissza. E mentén a pályák mentén formálódnak a hippokampális oszcillációk, nevezetesen a théta (4-12 Hz), a gamma (30-80 Hz) és a SPW (0.5-1.5Hz) a ráépülő ripple (140-200 Hz) aktivitással. Az állat viselkedésétől függően ezeknek az oszcillációknak valamelyike formálódik megfelelő irányultsággal a kortiko-hippokampális tengely mentén. A SPW-R aktivitás az állat nyugalmi állapotában és az alvás alatti lassú hullámok alatt jelenik meg, amelyek a memória kialakulásáért, tárolásáért és előhívásáért felelősek.

1.2. SPW-R komplex jellemzői

A SPW aktivitás egy egyedi, nagy amplitúdójú, lassú hullám (0.5-1.5Hz), amely önszerveződő, saját ritmusa a hippokampusznak. A SPW esemény a CA3-as régiótól terjed a CA1 felé, ahol lokálisan különböző piramis-sejt-interneuron sejtcsoportokat aktiválnak. E két régióban a SPW oszcilláció össze van kapcsolva a gyors gamma (90-140Hz) vagy ripple (140-200) aktivitással, amely a lokálisan elhelyezkedő interneuronális al-hálózatok SPW hajtotta szinkronizációjával alakul ki. A SPW-R komplex a piramis-sejteknek és az interneuronoknak (különösen a periszomtikusan gátló interneuronoknak) a kölcsönhatásai révén alakulnak ki. A legújabb ismereteink szerint, a ripple időzítésének a kialakulásáért legfőképpen a PV IN-ok a felelősek. Az erős serkentő bemenetek magas frekvenciás tüzelésmintázatot váltanak ki ezeken a sejteken, amelynek reciprok gátló hatása alakítja ki a koherenciát a ritmusban. A CA1 régió ripple aktivitása felelős a hippokampális kimeneti jelek megerősítéséért. Szinkronizálják és koordinálják a helyi piramis-sejtek aktivációját, ennek köszönhetően erősítik a domináns és gátolják az egyéb idegsejt csoportok aktivációját, meghajtva a kortikális és sub-kortikális agyterületek működését.

1.3. FS-PV IN-ok jellemzői

Az FS-PV IN-ok egy alcsoport az interneuronokon belül, amelyeket jól el lehet különíteni különböző elektrofiziológiai és molekuláris paramétereik révén. Három PV tartalmú interneuron típus található a hippokampusz CA1 piramis rétegében: PV kosár-, axo-axonikus- és bisztrifikált sejtek. A Petilla-terminológia szerint ezek mindegyike gyorstüzelő tulajdonságú. Az ilyen típusú interneuronok szelektíven választanak ki Ca^{2+} kötő proteint, a parvalbumint (PV), amely a sejtek minden kompartmentjében jelen van. A kiterjedt, vékony és tüskementes dendrit hálózata, a szinapszisai és axon végződése, az ionsatorna típusai és eloszlása mind a gyors, serkentő posztszinaptikus potenciál (EPSP) kialakulását eredményezi a PV

interneuronokon. Ezek a tulajdonságok a sejteknek elősegítik a pontosabb és gyorsabb információ átadását a bemeneti oldaltól a kimeneti jelekig.

1.4. Dendritikus jelösszegződés és szerepe SPW-R oszcilláció alatt FS-PV interneuronokban

Számos tény támasztja alá, hogy a SPW-R oszcillációval összekapcsolt sejt csoportok aktivitása dendritikus hot-spot-okat váltanak ki, azonban a mezőpotenciálban elvezetett SPW és ripple aktivitást illetve a dendritikus hot-spotok közötti kapcsolatot nem tanulmányozták. Minthogy azt sem, hogy hogyan és miért ezek a sejt csoportok váltják ki az említett hot-spotokat, illetve hogy az ilyen aktiváció megváltoztajai-e az egyedi sejteken a dendritikus jelösszegződés vagy az akciós potenciál kimeneti jeleinek mechanizmusát. Általánosságban elfogadott, hogy a FS-PV IN-ok a kortikális hálózatokban gyors működésűek, illetve a szinaptikus bemeneteknek alapvetően passzív integrátorai. A passzív tulajdonságait a FS-PV IN-nak számos irodalmi adat igazolja: gyors EPSP kinetika, a dendritikus jelösszegződés szűk, szubmilliszekundumos időablaka illetve precíz, gyors EPSP és AP (akciós potenciál) közötti kapcsoltsága jellemző. A tüskementes, vékony nyúlványokban a Ca^{2+} dinamika gyors, amely 1 μm hosszú, úgynevezett dendritikus mikrodoménekben valósul meg. Az irodalom szerint ezekben a fajta sejtekben regeneratív dendritikus Ca^{2+} hullámok (továbbiakban spike-ok) nem válthatók ki, továbbá a dendritekbe visszaterjedő AP (vAP) jel a nyúlvány mentén rövid távolságon belül lecseng. Hipotézisünk szerint azonban, a SPW-R oszcilláció alatt a neuronok nagyszámú tér-időbeli precizitású dendritikus bementeket kapnak, így a dendritikus jelösszegződés és az EPSP-AP kapcsoltság megváltozhat és kialakulhatnak aktív, regeneratív dendritikus jelek az FS-PV sejteken.

2. Célkitűzések

- I. Legfontosabb feladatomban az volt, hogy SPW-R oszcilláció alatti aktív, regeneratív Ca^{2+} jeleket (spike-okat) figyeljek meg és tanulmányozzak FS-PV IN-ok dendritjein.
- II. Továbbá, annak érdekében, hogy megtudjuk, a nyúlványokra érkező bemenetek hogyan befolyásolják a sejtek kimeneti válaszait, meg kellett határoznom a dendritekben kialakuló spontán Ca^{2+} jelek és a membrán potenciálban elvezetett jelek közötti kapcsolatot.
- III. Fel kívántam térképezni a minimális bemeneti számot, amely regeneratív Ca^{2+} jelek kiváltásához szükségesek a FS-PV IN-ok távoli dendritjeiben. Így tanulmányozni tudtam a nemlineáris jelösszegződési mechanizmust a dendritikus Ca^{2+} jelben illetve a membrán potenciálban elvezetett elektromos jelben.
- IV. Végül, farmakológiai úton szerettem volna igazolni, milyen típusú ion csatornák vesznek részt a dendritikus Ca^{2+} jelek és a membrán potenciál jeleinek kialakításában.

3. Módszerek

3.1. Egér típus és elektrofiziológia

Akut, horizontális agyszeleteket preparáltunk olyan transzgen egerekből, amelyek zöld fluoreszcens fehérjét fejeznek ki (eGFP). Ennek szabályozását a parvalbumin (PV) promóter irányítja. FS-PV IN-ban alakítottunk ki teljes sejt elvezetést a hippocampus CA1 régiójából. A 450 μm vastag agyszeleteket kettős folyadékátfolyású mérőkamrába helyeztük, ahol a szelet mindkét oldalán történt a perfúzió, több mint 10 ml/min sebességgel. A mezőpotenciálhoz (LFP-CA1 régió piramisrétegében) és a juxtacelluláris elvezetéshez használt pipettát (6-9 M Ω) mesterséges agyfolyadékkal töltöttük fel.

3.2. Farmakológia

Az összes farmakon - kivéve a helyi TTX injekció (10 μM) - a perfúziós oldatba volt adagolva. A kísérletekhez a következő anyagokat használtuk (Tocris Bioscience): Tetrodotoxin (TTX) (1 μM), nimodipine (20 μM), mibefradil (10 μM), ω -connotoxin MVIIC (0.5 μM), 6-cyano-2,3-dihydroxy-7-nitro-quinoline (CNQX) (10 μM), és D,L-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (DL-AP5) (60 μM). A feszültség-függő kalcium csatorna (VGCC) blokkoló koktél a következő anyagokat tartalmazta: ω -connotoxin MVIIC, nimodipine, és mibefradil.

3.3. Két-foton képalkotás

MATLAB-alapú programmal elemeztük ki a mérési eredményeinket (MES, Femtonics). A kísérletekhez saját fejlesztésű 3D-AO képalkotó és véletlen bejárásra képes (trajektória) lézerpásztázó módszereket használtunk. A rendszer optimalizálva lett az új XLUMPlanFI20 \times /1.0 objektív lencsére (Olympus, 20 \times , NA 1.0), így a térbeli felbontást 20%-al, a szkennelési térfogatot 10%-al tudtuk

megnövelni. A gyors 3D kísérletekhez kikompenzáltuk a mintából származó mozgásokat. A nyúlvány mentén lemért nyers fluoreszcencia adatokat (F), a munkám során 2D-ban jelenítettük meg. A számításokhoz a következő egyenleteket használtuk: $\Delta F/F = (F(d,t) - F_0(d))/F_0(d)$ vagy $\Delta G/R = (F(d,t) - R(d))/R(d)$.

3.4. 2-foton uncaging kísérletek

Dendritikus Ca^{2+} spike-ok szimulálásához dinitro-indolin-glutamate trifluor acetate (DNI-Glu•TFA) (2.5 mM) molekulát használtunk, amelyet a perfúziós oldatba adagoltunk. A fotoaktiváció (uncaging) 740 nm hullámhosszra lett beállítva, hogy ne zavarja mérés közben a 2-foton képalkotást. Az egyidejű 2-foton képalkotáshoz és 2-foton uncaging-hez a Roller Coaster letapogatási módszert használtuk.

3.5. Adatok analízise és statisztika

Kezdeti konkáv vagy lineáris görbével tudtuk azonosítani a sejtek bemeneti és kimeneti görbéit ($y_1 = A_1(1 - e^{(-A_2 \cdot (x - A_3))})$), amelyen egy szigmoid szerű supralineáris növekedés volt mérhető megfelelő küszöb bementi értéknél ($y_2 = \frac{A_4}{1 + e^{\frac{(x - A_5)}{A_6}}} + A_7$). A küszöb bemeneti számot úgy határoztuk meg, mint a legkisebb aktív bemenet szám a szigmoid növekedés fölött. A relatív fluoreszcens változást átszámítottuk a Ca^{2+} koncentráció változásának értékére a következő egyenlet felhasználásával:

$$\frac{\Delta Ca}{K_D} = \frac{f_{\max}}{f} (1 - R^{-1}_f) \frac{\mathcal{F}}{(\mathcal{F}_{\max} - \mathcal{F})\mathcal{F}_{\max}}. \text{ A statisztikai}$$

különbségek meghatározására T-próbát használtuk (*, **, vagy *** ahol a p érték kisebb, mint 0.05, 0.01, vagy 0.001). Az adatok means \pm s.e.m. (átlag szórása) értékben lettek kiszámítva, ha az nem követelt meg más számolást.

3.6. Alapvonal levonás módszerének használata interneuronális ripple oszcilláció észleléséhez

Sáváteresztő szűrő használata extra oszcillációs eseményeket generálhat, amely fáziseltolást eredményezhet, amikor a megszűrni kívánt oszcilláció rendszertelen. Ilyen oszcillációt a SPW-R alatt gyakran lehet tapasztalni. Az ilyen hibák kiküszöböléséhez az első lépésben Gauss szűrést alkalmaztunk (100 Hz) a nyers görbéken, így létrehozva egy „alapvonalat”, amelyet azután kivontunk a nyers görbékből. Az egyedi ripple oszcillációs ciklusoknak így megőriztük az amplitúdó értékeit és a fázisát.

4. Eredmények

4.1. *In vitro* spontán SPW-R aktivitás elvezetése módosított kettős folyadék átfolyású mérőkamrában gyors perfúziós áramlás mellett

A jobb oxigén ellátás érdekében módosított kettős átfolyású mérőkamra típust használtam, ahol a perfúzió (11.2ml/min volt) az agyszelet mindkét oldalán áramlott. A minta egy nejlon hálóra lett helyezve. Ilyen környezetben, a szeletben az idegsejtek képesek voltak hálózati aktivitás létrehozására. Másrésztől, módosítottuk a mérőkamrát a jobb képalkotási eljáráshoz is. A szeletet tartó fémháló nejlon hálóra lett kicserélve, továbbá le lett süllyesztve a jobb munkatávolság eléréséhez, amelyet a magas numerikus apertúrájú (NA) kondenzor kívánt meg. A mérőkamra optikai apertúráját megnöveltük, hogy optimális legyen a sokcsatornás elvezetéshez és a magas NA-val rendelkező, rövid munkatávolságú objektívhez. A jobb oxigén ellátás miatt képesek voltunk SPW-R oszcilláció elvezetésére kettős folyadék átfolyású mérőkamrában. A mérési körülményeinkben 450 μm vastag szeletekben a spontán SPW események (1.44 ± 0.09 Hz) és az ahhoz kapcsolt ripple aktivitás ($f_{\text{max}} 249.2 \pm 12.7$ Hz) regisztrálhatóak voltak ($n=32$). Így tehát a kettős folyadék átfolyású mérőkamrában megnövelt perfúziós sebesség biztosítja a jobb feltételeket ahhoz, hogy spontán SPW-R aktivitás mérhető legyen.

4.2. SPW-R aktivitással összekapcsolt dendritikus bementi mintázatok

SPW-R elvezetés mellett 3D trajektória szekennelést végeztem többszörös dendritikus szegmensek mentén (több mint 700 μm hosszú). A korábbi irodalmi adatokkal összhangban, kísérleteimben a FS-PV IN szómájában kiváltott vAP-Ca²⁺ válaszok a FS-PV IN dendritjeiben passzívan terjedtek, a szómától rövid távolságon belül (113.88 \pm 14.50 μm , $n=13$) értékük a detekciós küszöb alá esett. Ezzel szemben a spontán SPW-R-el összefüggő AP (SPW-AP) és EPSP (SPW-EPSP)

Ca^{2+} jelei megnövekedett értékeket mutattak a szómától mért távolság függvényében. A szomatikusan mért küszöb alatti SPW-EPSP jelek hasonló tulajdonságokat mutattak, mint a SPW-AP értékek. *In vitro* preparátumunkban, a SPW-EPSP-vel kapcsolt hálózati aktivitás a nyúlvány mentén helyi, csoportosult Ca^{2+} jeleket váltanak ki, amelyeket hot-spotoknak azonosítottunk (FWHM: $3.73 \pm 0.13 \mu\text{m}$). Ezek az apikális nyúlványrendszerben a szomszédos dendrit szegmensekbe képesek voltak beterjedni, ugyanakkor a bazális dendritfában nem voltak kimutathatóak. Ezek az adatok alátámasztják azt a gondolatot, hogy a passzív FS-PV IN képes egy alapállapotból egy aktív állapotba átváltani, mikor a környező idegsejt hálózati aktivitás megváltoztatja a dendritikus jelösszegződés állapotát. Ilyen esetben a regeneratív dendritikus aktivitások regisztrálhatóak úgymint a terjedő dendritikus Ca^{2+} spike-ok.

4.3. Dendritikus spike-kal kapcsolt interneuronális ripple oszcillációk

Nagy átlagban a dendritikus Ca^{2+} jel amplitúdója egyenes arányosságot mutatott a szimultán mért SPW-EPSP amplitúdójával, valamint a SPW-AP számával. Megfigyeltem, hogy egyes esetekben a Ca^{2+} jel amplitúdója nagyobb volt a SPW-EPSP-k alatt, mint ugyanazon dendrit szegmensen SPW-AP mellett. Ezekben az esetekben az SPW-EPSP-k hosszú, oszcilláló plató potenciállal rendelkeztek. Ennek az oszcillációnak a frekvenciája megegyezett a ripple tartománnyal, így ezeket *interneuronális ripple oszcillációknak* neveztük el. Az oszcilláció frekvenciája gyorsan megemelkedett a SPW-EPSP csúcsa előtt, elérte a maximumot a csúcsban ($239.97 \pm 19.25 \text{Hz}$), míg kiterjedése elnyúlva ($17.1 \pm 3.19 \text{ms}$), jóval az LFP jel lecsengése után ért véget (LFP FWHM $12.23 \pm 1.85 \text{ms}$, EPSP FWHM $29.37 \pm 2.49 \text{ms}$, $p=0.0001$). Az LFP-hez képesti elnyúlt membrán potenciál oszcillációja jelzi, hogy ez a FS-PV IN saját belső tulajdonsága lehet. A SPW-EPSP-vel kapcsolt Ca^{2+} jelek amplitúdója jól korrelált az interneuronális ripple oszcilláció erősségével. Az interneuronális ripple oszcilláció hasonló frekvenciát és fázis értékeket

mutatott mindkét esetben, SPW-EPSP-nél és SPW-AP-nál egyaránt (239.97 ± 18.35 Hz és 239.70 ± 11.00 Hz, $p > 0.3$, $n = 10$). A sejtek kimeneti jelei, azaz az AP-k precízen fáziskapcsoltak voltak az interneuronális ripple oszcilláció csúcsával. Ezek az adatok azt mutatják, hogy a szinkronizált hálózati aktivitás által kiváltott dendritikus spike-ok meg tudják változtatni a sejt bemeneti-kimeneti jeleinek átalakítását FS-PV IN-ban. Azaz, a jól definiált milliszekundum alatti precíz EPSP-AP kapcsoltság az FS-PV IN-ban átvált lassabb jelösszegződési értékévé, ahol az interneuron kimeneti jelei az interneuronális oszcilláció szinkronizációjától függenek.

4.4. SPW-R aktivitással kapcsolt dendritikus Ca^{2+} jel tulajdonságai

Erős 3D dendritikus Ca^{2+} válaszokat SPW-EPSP és SPW-AP alatt is tudtam regisztrálni. Ez a Ca^{2+} jel egyenlőtlenül tört be az egész apikális dendritfa területére. Számos helyi Ca^{2+} jel maximumot tudtam megfigyelni az apikális nyúlványok mentén, ahol a jelek amplitúdója szignifikánsan nagyobbak voltak, mint a nyúlvány többi részén. Ezeket hot-spotoknak azonosítottuk. Ezekben a pontokban a Ca^{2+} jel nemcsak nagyobb volt ($333\% \pm 51\%$, $n = 17$ régió, $n = 9$ sejt), de 12.8 ± 2.4 ms-al hamarabb is jelent meg, mint a szomszédos területeken (a hot spottól mért 41.5 ± 12.7 μm távolságban). Ezek az adatok jelzik, hogy a dendritikus Ca^{2+} spike-ok kiinduló pontjai a hot-spotok. A spike-ok a szóma és a nyúlvány végek irányában egyaránt terjedést mutatott. A 34.22 ± 4.32 $\mu\text{m}/\text{ms}$ spike terjedési sebességet a nyúlványok 68.8 ± 8.2 %-ban mérni lehetett, amely gyorsabb volt, mint a diffúzióból származó sebesség. Ezek a spike-ok regeneratív természetét bizonyítják. A SPW-EPSP-vel kapcsolt dendritikus Ca^{2+} spike-ok sohasem terjedtek a szóma felől, bizonyítva dendritikus eredetüket. Összeségében ezek a hot-spotokból kiinduló jelek aktívak voltak és regeneratív módon terjedtek a nyúlványok mentén.

4.5. Időben és térben csoportosított bemenetek aktiválják a dendritikus spike-okat

A Ca^{2+} jeleket pontszerű ($<1 \mu\text{m}^3$) glutamát felszabadítással (uncaging) váltottuk ki meghatározott dendritszegmensek mentén. Ezzel a technikával egyértelműen szimulálni tudtuk a SPW-vel kapcsolt dendritikus hot-spotokat. Azt találtuk, hogy az uncaging által kiváltott Ca^{2+} jelek a hot-spot jellegű régióban lépcsős, nemlineáris növekedést mutatott egy jól definiált aktív bemenetszámmal, amelyet első küszöbnek azonosítottunk (11.04 ± 1.4 aktív bemenet, $n=9$ sejt). Az első küszöböt egy második követte, amely esetenél a hot-spot régióból a szomszédos nyúlvány szegmensekbe betörő Ca^{2+} válasz jelent meg (laterális dendritikus régió). Itt a kiváltott Ca^{2+} jel szigmoid szerű jelnövekedést mutatott. Az aktív bemenetszám a második küszöbnél 30.3 ± 4.0 ($10-47$ $n=9$ sejt) volt. Ha az átlag transzmitter felszabadulási értéket vesszük serkentő szinapszisznál FS-PV IN-on (0.75 ± 0.19), akkor az első és második küszöb értéknél a kísérleteinkben ez az érték 15 illetve 40 szinapszis szám volt.

4.6. Uncage-el kiváltott dendritikus spike-ok tulajdonságai

A kiváltott Ca^{2+} spike-ok szétválaszthatóak voltak hot-spot jellegű részre, ahol a szinapszisok aktivációja megtörtént, illetve a szomszédos, laterális dendritekbe betörő Ca^{2+} jelekre. A második küszöb fölötti értékeknél a spike-ok térbeli eloszlása a laterális részekben plató-szerű karakterisztikát mutatott. Ez a Ca^{2+} érték lassan csökkent a hot-spottól való távolság függvényében. Az ezen a területen mért terjedési sebesség $17.4 \pm 3.6 \mu\text{m}/\text{ms}$ volt, $85.1 \pm 16.4 \mu\text{m}$ hosszú dendritszegmensen lemérve ($n=5$ sejt), amely sebesség hasonló, mint amit a spontán SPW-EPSP-vel kapcsolt dendritikus Ca^{2+} jeleknél mértünk.

4.7. Interneuronális ripple oszcilláció kiváltása egy rövid dendrit szegmensen glutamát uncaging módszerrel

A Ca^{2+} jelhez hasonlóan a második küszöbértékig az uncage kiváltotta EPSP amplitúdója lépcsőzetes növekedést mutatott. A kezdeti lineáris vagy szublineáris jelnövekedés erőteljesen megugrott a második küszöbnél (40-ik bemeneti értéknél) szupralineáris karakterisztikát mutatva a növekedő bemenetszám függvényében (szigmoid jellegű növekedés). A második küszöb érték fölött az interneuronális ripple oszcilláció megjelent az EPSP tetején. A spontán SPW-EPSP-vel kapcsolt interneuronális ripple oszcilláció frekvenciája 239.97 ± 18.35 Hz volt, ugyanakkor az uncage kiváltotta 219.3 ± 14.5 Hz frekvenciát mutatott. A dendritikus Ca^{2+} jelek 41.8 ± 9.6 %-al nagyobbak voltak, mikor az EPSP-k tetején a magas frekvenciás oszcilláció megjelent ($p=0.008$; $n=6$ sejt). A kiváltott interneuronális ripple oszcillációk frekvenciája azonos volt ($p=0.23$, t -test, $n=7$), de a szétszórtabb (nagyobb területen elterülő) bemeneti mintázat több nyúlványban idézett elő interneuronális ripple aktivitást (73.68%, 14/19 szegmens, 14/19 sejt), ugyanakkor több oszcillációs ciklust alakított ki. Az AP ebben az esetben is szorosan kapcsolt volt az interneuronális ripple oszcillációval. Ezek az adatok szintén alátámasztják azt a gondolatot, hogy a gyors, kiszámítható EPSP-AP kapcsoltság felcserélődik egy új jelösszegződő mechanizmusra FS-PV IN dendritjeiben erős, serkentő bemeneti mintázat alatt, ahol az AP időzítést elsősorban az interneuronális ripple oszcillációk határozzák meg.

4.8. A Ca^{2+} spike-ok L-típusú VGCC függést mutatnak

A dendritikus Ca^{2+} spike-okat főképp az AMPA (2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il)propánsav) és NMDA (N-metil-D-aszparaginsav) receptorok aktivitása váltja ki, így ahogy azt vártuk, a kombinált AMPA és NMDA receptor blokkolók (CNQX és AP5) szinte teljes mértékben lecsökkentik a Ca^{2+} jeleket mindkét, a hot-spot és az oldalsó, laterális régióban egyaránt. Az oldalsó, laterális régió Ca^{2+} jeleit a VGCC kóktél nagymértékben csökkenti. Eredményeink

szerint az L-típusú VGCC a legjelentősebb, mivel ennek specifikus blokkolója fejtette ki a legnagyobb hatást ezen területek Ca^{2+} jeleire. A központi, hot spot régió Ca^{2+} jeleinek VGCC függése sokkal összetettebb, mivel ezeket, NMDA, Ca^{2+} -permeábilis AMPA receptorok, VGCC és Na^+ csatornák aktivitásának együttműködése váltja ki. Egyéb kísérletes eredményekkel egybevetve, a Ca^{2+} -permeábilis AMPA receptorok hatása kifejezettebb a posztszinaptikus Ca^{2+} beáramlás kialakításában, mint az NMDA receptorok aktivitása.

4.9. Az interneuronális ripple oszcillációk Na^+ csatorna függők

A Na^+ csatorna blokkoló TTX teljesen megszüntette az interneuronális ripple oszcillációt, amely egyértelműen jelzi ennek a csatornának a jelentős szerepét. Nem csökkentette azonban az oszcilláció frekvenciáját az AP5, Nimodipine, IEM-1460 vagy a VGCC koktél adagolása. Annak érdekében, hogy igazoljuk a dendritikus eredetét az interneuronális ripple aktivitásnak, lokális TTX ($10 \mu\text{M}$) injekciót végeztem az FS-PV IN axoszomatikus területére, mialatt a távoli dendriteken glutamát uncaging módszerrel interneuronális ripple oszcillációt váltottam ki, a korábbi kísérletekhez hasonlóan. Az oszcilláció frekvenciája nem változott szignifikánsan (kontroll 212.83 ± 24.18 Hz; TTX puff 182.72 ± 18.72 Hz, páros t-teszt, $p=0.156$). Ezek az adatok alátámasztják az interneuronális ripple aktivitás dendritikus eredetét. A dendritikus interneuronális ripple aktivitás közvetlen mérése érdekében a teljes sejt elvezetés mellett juxtacelluláris elvezetést is végeztünk távol a szómától az uncaging régióban ($266.37 \pm 67.05 \mu\text{m}$, mean \pm s.d.). Az LFP-ben mért interneuronális ripple oszcilláció az uncage régiótól mért $40 \mu\text{m}$ (térbeli lecsengési állandó $15.6 \pm 4.9 \mu\text{m}$, $n=4$) távolságban teljes mértékben lecsökkent. Ezek az adatok erősen alátámasztják az interneuronális ripple oszcilláció lokalizáltságát és dendritikus eredetét. Egybevetve a mért adatokat kijelenthetjük a dendritikus Ca^{2+} spike-ok létezését FS-PV IN-ban.

5. Összefoglalás és következtetés

A hippokampális FS-PV IN-kat és szerepüket a SPW-R kialakításában intenzíven kutatják, főképp elektrofiziológiai vizsgálati módszerekkel. Ugyanakkor az idegtudományokban szintén igen elterjedt a FS-PV IN dendritjein végbemenő jelösszegződési mechanizmusok konfokális és 2-foton képalkotási módszerekkel történő vizsgálata. A kapcsolatot a két érdeklődési terület között azonban még nem vizsgálták. Ennek megvalósításához, 3D és 2D 2-foton képalkotási eljárásokat és új glutamát uncaging molekulát használtunk. Doktori értekezésemben az FS-PV IN dendritjeiben végbemenő jelösszegződés mechanizmusáról és funkciójáról alkotott általánosságban elfogadott képet egészítem ki azokkal a funkcionális változásokkal, amelyeket spontán SPW-R oszcilláció jelenlétében figyeltünk meg.

Az AP-al kapcsolt Ca^{2+} válaszok nem korlátozódnak a proximális dendritikus régiókra, hanem azok a disztális dendritekben is megjelennek SPW-R oszcilláció alatt. Dendritikus Ca^{2+} spike-ok megfigyelhetők, ellentétben a sejtek alacsony aktivitású alap állapotához képest.

A lineáris vagy szublineáris jelösszegződés helyett szupralineáris dendritikus jelösszegződést figyeltünk meg. A lokalizált dendritikus Ca^{2+} jelek helyett erős, terjedő Ca^{2+} hullámok voltak jellemzőek, melyek hot-spotokból indultak ki a nyúlvány mentén. Az alacsony aktivitási szintre jellemző funkcionálisan inaktív feszültség függő Na^+ csatornák ebben az esetben interneuronális ripple oszcillációkat váltanak ki, amelyek kapcsoltak a dendritikus Ca^{2+} spike-okkal.

Az integrációs módja az FS-PV IN-nak ebben az esetben megváltozik. Az AP kimeneti jelei erősen kapcsoltak az interneuronális ripple oszcilláció fázisával. Összehasonlítva az alacsony aktivitású állapotra jellemző szubmiliszekundumos EPSP-AP kapcsoltással az AP-ok teljes idő-ablaka ebben az „aktív” esetben kiszélesedik.

Farmakológiai eredményeim azt bizonyítják, hogy a terjedő Ca^{2+} spike kialakításáért legfőképpen az L-típusú VGCC-k, míg az

interneuronális ripple aktivitásért a nem periszomatikusan elhelyezkedő Na^+ csatornák a felelősek.

Doktori értekezésemben bemutattam egy új alkotó elemét a populációs ripple aktivitás kialakulásának. A CA3 és CA1 felől szinkronizált bemenetek érkeznek a CA1 FS-PV IN dendritjeire, ahol azok hot-spotokat váltanak ki. A hot-spotok az FS-PV IN távoli apikális dendrit szegmenseiben interneuronális ripple oszcillációt váltanak ki. A membrán ripple oszcillációk miliszekundum hosszúságú időablakot formálnak a jelösszegződési mechanizmusoknak, majd néhány oszcillációs periódust követően AP alakul ki. Munkahipotézisünk szerint az AP kimeneti jele összeszinkronizálódik az interneuronális ripple aktivitással, amelyek így ciklusokon keresztül felerősödhetnek és közreműködhetnek az AP kialakításában.

Eredményeink alátámasztják azt az elméletünket, hogy SPW-R oszcilláció alatt a FS-PV IN-ok átkapcsolnak egy gerjesztett állapotba, ahol regeneratív, aktív dendritikus tulajdonságok alakulnak ki. Ezek a belső tulajdonságai a sejteknek, akár egy dendritikus szegmens szintjén hatással lehetnek a SPW-R kialakulásában. Ezek az adatok kiegészítik a FS-PV IN dendritikus és sejtszintű tulajdonságairól alkotott képünket.

6. A szerző publikációs listája

6.1. A doktori értekezéssel kapcsolatos publikációk

Chiovini B*, Turi GF*, Katona G, Kaszás A, Pálfi D, Maák P, Szalay G, Szabó MF, Szabó G, Szadai Z, Káli S, Rózsa B. Dendritic spikes induce ripples in PV interneurons during hippocampal sharp waves. *Neuron*. 2014 May 21;82(4):908-24. doi: 10.1016/j.neuron.2014.04.004. PMID: 24853946

** These authors contributed equally to this work.*

Chiovini B, Turi GF, Katona G, Kaszás A, Erdélyi F, Szabó G, Monyer H, Csákányi A, Vizi ES, Rózsa B. Enhanced dendritic AP backpropagation in PV-positive basket cells during sharp wave activity. *Neurochem Res*. 2010 Dec;35(12):2086-95. doi: 10.1007/s11064-010-0290-4. Epub 2010 Nov 3. PMID: 21046239

6.2. A doktori értekezéstől független publikációk

Katona G*, Szalay G*, Maák P*, Kaszás A*, Veress M, Hillier D, Chiovini B, Vizi ES, Roska B, Rózsa B. Fast two-photon in vivo imaging with three-dimensional random-access scanning in large tissue volumes. *Nat Methods*. 2012 Jan 8;9(2):201-8. doi: 10.1038/nmeth.1851. PMID: 22231641

** These authors contributed equally to this work.*

Kerekes PB, Tóth K, Kaszás A, Chiovini B, Szadai Z, Szalay G, Pálfi D, Bagó A, Spitzer K, Rózsa B, Ulbert I, Wittner L. Combined two-photon imaging, electrophysiological, and anatomical investigation of the human neocortex in vitro *Neurophoton*. 1(1), 011013 (Sep 11, 2014). doi:10.1117/1.NPh.1.1.011013

6.3. A doktori értekezéstől független szabadalmak

Csizmadia IGy, Mucsi Z, Szalay G, Kaszás a, Lukácsné Haveland Cs, Majercsik O, Potor A, Katona G, Rózsa B, Gündisch D, Chiovini B, Pálfi D. Use of Photocleavable compounds. WO2012HU00100 20121003

Csizmadia IGy, Rozsa JB, Mucsi Z, Lukácsné Haveland Cs, Katona G, Majercsik O, Potor A, Kaszas A, Guendisch D, Chiovini B, Szalay G, Palfi D. Use of Photochemically cleavable compounds HU20120000574 20121003

Rózsa B, Katona G, Veress M, Maak P, Szalay G, Kaszas A, Chiovini B, Matyas P. Method for scanning along a continuous scanning trajectory with a scanner system WO2012HU00001 20120105