A glutamáterg szinaptikus transzmisszió vizsgálata a hippokampális piramissejtekben

Doktori tézisek

Éltes Tímea M.D.

Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola,
Semmelweis Egyetem

Témavezető: Nusser Zoltán, D.Sc.

Hivatalos bírálók: Zelles Tibor, PhD, egyetemi docens
Mátyás Ferenc, PhD, tudományos főmunkatárs,

Szigorlati Bizottsági Elnök: Ligeti Erzsébet, D.Sc.
Szigorlati Bizottsági Tagok: Wittner Lucia, tudományos Főmunkatárs
Köles László, Dr. Med. Habil.

Budapest,
2019

1. BEVEZETÉS

A szinapszisok neurotranszmitter felszabadulási valószínűsége (F_v) és az általuk kiváltott válaszok hatékonysága különböző lehet. A különbségek mögött rejlő okok feltárása alapvető fontosságú az összetett viselkedési mintázatok és a memória alapját is adó neuronhálózatok működésének megértéséhez. A szinaptikus tulajdonságok heterogenitása lehetővé teszi több különálló, párhuzamosan működő hálózati modul egyidejű létezését. A célsejt-specifikus neurotranszmitter felszabadulási valószínűség lehetőségetad arra, hogy egy piramissejt (PS) akár egyetlen axonja is szétválogassa és a megfelelő posztszinaptikus sejt felé továbbítsa a komplex tüzelési mintázatként kódolt, összetett üzenetek releváns aspektusait. Ezen információ feldolgozási folyamatok mechanizmusai jelenleg csak részben ismertek. Rozov és mtsai. 2001-ben páros és hármas elvezetésekkel kimutatták, hogy a kortikális PS-ek és bipoláris, szomatosztatin (SOM^+) és metabotropikus glutamát receptor 1α pozitív ($mGluR1a^+$) interneuronok (IN) közötti, illetve a PS-ek és multipoláris, parvalbumin (PV^+) pozitív IN-k közötti szinapszisok a PS axonok különböző felszabadulási valószínűsége és a különböző rövid-távú plaszticitásának köszönthetően különböző hatékonysággal serkentik a posztszinaptikus IN-t. A PS-ket egy gyors és egy lassú intracelluláris Ca^{2+} pufferrel, BAPTA-val, illetve EGTA-vel töltötték fel. A serkentő posztszinaptikus válaszok amplitudójának csökkenését, a bipoláris IN-kal lértrehozott szinapszisok esetén, egy ~10x kissebb EGTA koncentráció hozzáadásával érték el, a multipoláris IN-kal létrehozott szinapszisokhoz képest. Hipotézisük alapján a megfigyelt alacsonyabb puffer hatást egy nagyobb diffuziós távolság okozza a neurotranszmitter felszabadulás helye és a Ca^{2+} csatornák között. Feltételezve, hogy a Ca^{2+} szenzorok és a felszabadulásra kész, dokkolt vezikulák eloszlása hasonló, ez egy a Ca^{2+} csatornák denzitásában lévő különbségre utal. PhD munkám első felében ezen hipotézist teszteltem.

A F_v célsejt-specifikus szabályozás hatásának pontos megfigyelése az információfeldolgozásra, tárolásra és felidézésre, illetve a viselkedésmintázatok és memória kialakulására, az idejsejtek nagy csoportjainak egyidejű és hosszútávú elvezetését igényli. Ezen kísérleteket élő és viselkedő állatokban szükséges végezni, illetve olyan módon, mely lehetővé teszi az elvezetett sejtek anatómiai és molekuláris azonosítását. A kétfoton pásztázó mikroszkópia bevezetése és a fluoreszcens indikátorok jel-zaj arányának javítása forradalmasította az optikai képalkotás területét és lehetővé tette, hogy egyidejűleg számos egyedi idegsejtben és krónikus módon figyelhessük meg az akciós potenciálok (AP) által kiváltott fluoreszcencia változásokat. Mindezek mellett a genetikailag kódolt Ca^{2+} indikátorok (GKKI)

lehetővé teszik genetikailag meghatározott sejttípusok, vagy idegpályák szelektív vizsgálatát. Jelenleg, a GCaMP6f, a szintetikus Ca^{2+} indikátorokhoz hasonló érzékenységének és gyors kinetikájának köszönhetően a legszélesebb körben használt GKKI-vá vált *in vivo* kísérletek esetében. Sajnos, ezen kiemelkedő tulajdonságok ellenére sem lehet az agyi aktivitást miliszekundumos precizitással visszafejteni a fluroeszcens görbékből. A tüzelési mintázat visszafejtésének pontossága függ az egyetlen AP által kiváltott (egységnyi) [Ca^{2+}] tranziensek amplitudójától, ennek lecsengési időállandójától, a jel-zaj aránytól, az alapvonal változásától és a GKKI nemlineáris jellegétől. Ezen paraméterek nem csak a különböző sejttípusok, preparátumok és optikai felvételi körülmények között változnak, hanem sejttípuson belül is. A precizebb visszafejtés elérése szempontjából kulcsfontosságú a GKKI expressziós szintjének és az egységnyi [Ca^{2+}] tranziensek amplitudójának, a jel-zaj arány és a nonlinearitás pontos összefüggésének vizsgálata. Tézisem második felében ezen összefüggéseket vizsgáltam, illetve két olyan visszafejtési eljárást szolgáltatok mely precizebb a jelenlegi módszereknél. Eredményeim lehetővé teszik a fluoreszcencia változásokat kiváltó neuronális aktivitás pontosabb megbecslését.

2. CÉLOK

Doktori értekezésem első részében, a transzmitter felszabadulási valószínűség célsejt-specifikus különbségének mechanizmusát vizsgáltam (Éltes et al., 2017). Ehhez a következő kérdésekre kerestem választ: 1) Milyen a CA3 PS-PV^{+} vagy -mGluR1α^{+} IN-k közötti szinapszisok rövid-távú plaszticitása? 2) Meghatározza-e az Elfn1/2 posztszinaptikus jelenléte a PS és mGluR1α^{+} IN közötti szinapszisok rövid távú plaszticitását? 3) Van-e célsejt-specifikus különbség a [Ca^{2+}] tranziensek amplitudójában? 4) Van-e célsejt-specifikus különbség a P/Q- és N- típusú Ca^{2+} csatornák hozzájárulásában a [Ca^{2+}] tranziensekhez? 5) Van-e célsejt-specifikus különbség a [Ca^{2+}] puffer kapacitásban?

A célsejt-specifikus információ feldolgozási folyamatok hatásának az információ tárolásra és felidézésre, illetve a viselkedésmintázatok és memória kialakulására való hatásának megfigyelésére, az idejsejtek nagy csoportjainak egyidejű és hosszútávú mérésere van szükség, viselkedő állatokban. Jelenleg az ilyen jellegű kísérleti eredmények értelmezését a rendelkezésre álló tüzelési mintázat visszafejtő algoritmusok korlátozzák. Ezért PhD munkám második részében a leggyakrabban használt GKKI, a GCaMP6f esetében a GKKI expressziós szint és a [Ca^{2+}] tranziensek változékonysága, jel-zaj aránya és nonlinearitása közötti összefüggések megértése érdekében végeztem kísérleteket. Vizsgáltam, hogy ezen

paraméterek, hogyan befolyásolják a tüzelési aktivitás visszafejtésének pontosságát, továbbá kidolgoztam két módszert mellyekkel javítható a precizitás (Éltes et al., 2019).
Hozzájárulások: A CA3 PS és a PV^+/mGluR1α^+ IN-ek rövid távú plaszticitás méréseit és a CA3 PS-k axonvégződéseiben történő Ca^{2+} képalkotás kísérletek egy részét közösen végeztük Holderith Noémivel. Dolgozatom második részéből pedig a szimulációkat Szoboszlay Miklóssal együtt végeztük. Az antiGFP immunreakciókat Szigeti Katalin végezte, illetve ugyancsak ő rekonstruálta 3-dimenzióban (3D) a szelektált sejtek szomáját és mérte meg ezek felszín-térfogat arányát.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.2. I. RÉSZ: A célsejt-specifikus neurotranszmitter felszabadulási valószínűségében lévő különbségek mechanizmusának vizsgálata

3.2.1. *In vitro* akut túlélő szelet preparátum előkészítése CA3 PS-k és IN-k elektrofiziológiai méréshez

Hím Wistar-patkányok agyából (n = 97, 14-17 napos), standard módszerek szerint, *akut* hippokampális szeleteket készítettem. A CA3 PS-kből vagy IN-kból *whole-cell voltage*- vagy *current-clamp* elvezetéseket végeztem, MultiClamp 700A és B erősítőkkel (Molecular Devices). A Patch pipetták standard intracelluláris oldatot és biocitint tartalmaztak. Az IN-ok tüzelési mintázatát 500-ms hosszú hiperpolarizáló és depolarizáló áramimpulzusok (125-500 pA amplitúdóval) sorozatával határoztam meg. Az extracelluláris stimulációhoz egy unipoláris stimuláló elektródot helyeztem el a sejttesttől legalább 100 µm-re az oriens rétegben. Az IN-kat -70 mV-on tartottam és 5 stimulust (0,2-0,3 ms-os időtartamú, 20-200 pA) alkalmaztam 40-50Hz-en. A piramissejteket is -70 mV-on tartottam (legfeljebb -100 pA egyenáram injektálásval), és egyedi akciós potenciálokat (AP) váltottam ki 2-4 ms hosszú depolarizáló áramimpulzusokkal (1 - 1,2 nA).

3.2.2. CA3 PS terminálisok neuronális aktivitás-függő [Ca^{2+}] alapú képalkotása

A kísérleteket Femto2D (Femtonics) kétfoton pásztázó mikroszkóppal és MaiTai femtoszekundum pulzáló lézerrel (810nm-hullámhosszon) végeztem. A sejteket 2 órán keresztül egy Ca^{2+} -koncentrációra nem érzékeny (20 µM Alexa Fluor 594) és egy Ca^{2+} -koncentrációra fluoreszcencia intenzitás változással reagáló fluorofórral (100 vagy 300 µM Fluo5F) töltöttem. A terminálisokat egy egyenes vonal mentén szkeneltem (500 vagy 1200 ms-ig, 1 kHz sebességgel, 2-6 mW lézer erősséggel). Az 1 µM ω-CTX MVIIC (1 mg/ml BSA, Tocris Bioscience és Alomone Laboratories) hatását a preszinaptikus [Ca^{2+}] tranziensek csúcs amplitúdóira, a

kontroll körülmény és 30 perc (a ω-CTX MVIIC esetén) bemosás utáni állapotok összehasonlításával mértem.

3.2.3. Az axonvégződések posztszinaptikus céljainak azonosítása

Az elvezetések végén nagyfelbontású képsorozatot készítettem a vizsgált terminálisokról. A szeleteket kémiailag fixáltam, majd PV és mGluR1α vagy mGluR1α és Elfn1/2 immunjelölést végeztem. A biocitint Alexa Fluor 488- vagy CY5-konjugált sztreptavidinnel tettem láthatóvá.

3.3. II. RÉSZ. A GCaMP6f fluoreszcens tranziensekből való tüzelési mintázat visszafejtési pontosságának javítása

3.3.1. GCaMP6f vírusinjektálás a hippokampusz CA1 régiójába

Hím FvB/Ant egereken (n = 57, 30-52 napos), altatást követően kétoldali kraniotomiát (0,5-1 mm átmérő) végeztem és a dorzális hippocampus CA1 régiójának megfelelően 1: 100 hígításban (szórványos kifejeződés elérése érdekében) AAV9.Syn.Flex.GCaMP6f.WPRE.SV40 (Penn Vector Core) és AAV9.CMV.PI.CRE.rBG (Penn Vector Core) vírus vektorokat injektáltam.

3.3.2. Képalkotó ablak beültetése az *in vivo* [Ca^{2+}] képalkotáshoz

A műtétet Dombeck és mtsai. (2010) módszerét követve végeztem. 21 nappal a vírus injekció után bal oldali kraniotómiát végeztem (3mm), a kéreg óvatos leszívását követően pedig egy 3mm-es képalkotó ablakot ültettem be a dorsalis hippocampusnak megfelelően.

3.3.3. *In vivo* két foton neuronális aktivitás-függő [Ca^{2+}] alapú képalkotás és adatelemzés

A [Ca^{2+}] méréseket 9 nappal az implantációs műtét után, Chameleon Vision (Coherent) lézerrel (925 nm-re hangolt) felszerelt Femto2D rezonáns kétfoton mikroszkóppal végeztem. 300 µm x 300 µm-os látómezőben elhelyezkedő sejtek aktivitását 10 percen keresztül mértem, 32 Hz-es képkockasebességgel és 0,65 µm/pixel felbontással. A mérések alatt az egeret izoflurránnal érzéstelenítettem. A képek merev elmozduláskorrekcióját (NonRigid4Reso Toolbox, Femtonics Kft.) követően a fluoreszcencia változásokat ΔF/F-ben számszerűsítettem.

3.3.4. *In vitro* túlélő agyszelet preparátum készítése és CA1 piramissejtek elektrofiziológiai mérése

Felnőtt hím egereket (n = 53, 42-81 napos kor), érzéstelenítést követően, jéghideg, standard vágási oldattal transzkardiálisan perfundáltam. Továbbiakban a szeleteket az előző bekezdésben leírtakkal azonos módon preparáltam. A GCaMP6f-t

expresszáló CA1 PS-kből cell-attached, illetve a nem vírus infektált állatok esetén whole-cell voltage-clamp méréseket végeztem. A cell-attached elvezetésekhez használt pipetták ACSF-t tartalmaztak; a whole-cell kísérletekhez pedig standard intracelluláris oldatot, biocitint és 300 μM Fluo5F-et használtam. Az AP-kat antidromikusan váltottam ki extracelluláris stimulálással (0,2-0,3 ms időtartam, ~ 500 μA), egy, az oriens/alveus rétegbe elhelyezett monopoláris stimuláló elektróddal. A whole-cell mérések esetén a PS-t -70mV-en tartottam, az AP-kat 2-4 ms hosszú depolarizáló áramimpulzusokkal (1 - 1,2 nA áramerősségű) váltottam ki.

3.3.5. *In vitro* két foton neuronális aktivitás-függő [Ca^{2+}] alapú képalkotás és adatelemzés

A kísérleteket egy Femto 2D (Femtonics) kétfoton pásztázó mikroszkóppal és Chameleon femtoszekundum pulzáló lézerrel (Coherent, 925 nm-re hangolva) végeztem. A GCaMP6f-t kifejező CA1 PS-k sejttestét egyenes vonal mentén szkeneltem (~ 1 kHz mintavételi sebesség, 10-15 mW lézer intenzitás). Az AP által kiváltott fluoreszcencia változásokat ΔF/F-ben számszerűsítettem. Az elvezetett sejteket a mérések után kémiailaig fixáltam és a mérés végén készített kétfoton sorozatfelvétel alapján beazonosítottam és GCaMP6f intenzitásukat kvantifikáltam.

3.3.7. Immunhisztokémia

Az immunjelölést egér anti-GFP (1: 5000, katalógus szám: 75-132, NeuroMab) primer antitest és Cy3 konjugált kecske anti-egér IgG2a (1: 500, Jackson Laboratories) másodlagos antitest alkalmazásával végezte Szigeti Katalin.

3.3.8. Szimulációk

A szimulációkat Szoboszlay Miklós kollegámmal közösen végeztük. A fluoreszcens Ca^{2+} görbékből való aktivitásmintázat visszafejtéséhez az MLspike szoftvert használtuk. Az algoritmus beépített nonlinearitási (p_{nonlin}) és alapvonal változási paramétereinek meghatározása után szintetikus fluoreszcens görbéket generáltunk három különböző frekvencián (0,1 Hz, 1 Hz, 10 Hz) Poisson eloszlással, a sejtek (n = 37) kísérletileg meghatározott egységnyi [Ca^{2+}] tranziens amplitúdójával, lecsengési időállandójával, jel-zaj arányával és az említett nonlinearitás és alapvonali elcsúszási értékekkel. Az aktivitásmintázat visszafejtési hatékonyságának realisztikusabb körülmények közötti vizsgálatára CA1 PS-k *in vivo* elvezetéseiből származó (Grosmark, Long és Buzsaki, CRCNS.org, http://dx.doi.org/10.6080/K0862DC5) AP időzítések alapján is generáltunk szintetikus adatot. Az egységnyi [Ca^{2+}] tranziensek csúcs amplitúdóját két módszerrel becsültem meg. (1) Először meghatároztam az időben elszigetelt (nincs AP> 4s-al előtte és > 1s-al utánna),

egyetlen AP által kiváltott [Ca^{2+}] tranziensek százalékát. Az in vivo elvezetések alapján a temporálisan elszigetelt események kétharmada egyetlen AP, a többi izolált magasfrekvenciájú (AP-k közötti időintervallum <20 ms) aktivitás (burst). Megmértem a temporálisan elszigetelt fluoreszcens [Ca^{2+}] tranziensek amplitudóját, ezeket rangsoroltam és meghatároztam a "*feltételezett egységnyi*" csúcs amplitúdót, az események legkisebb 66,6% -ának átlagaként. (2) Egy második eljárásban a gyengén GCaMP6f expresszáló sejtek (n = 20) átlag paramétereit használva visszafejtettem a szintetikus fluoreszcens görbét kiváltó tüzelési mintázatot. Ezután kiválogattam a temporálisan elkülönített, potenciálisan egyetlen AP által kiváltott [Ca^{2+}] tranzienseket, és megmértem az úgynevezett "*egységnyinek detektált*" csúcs amplitúdót.

4. EREDMÉNYEK

4.1. I. RÉSZ A Ca^{2+} csatornák célsejt-specifikus funkcionális különbségei állnak a célsejt-specifikus felszabadulási valószínűségben lévő különbségek hátterében

4.1.1. A hippokampális CA3 régió különböző IN-típusaira érkező serkentő áramok különféle rövid-távú plaszticitást mutatnak

A CA3 PS-k lokális axonvégződései szinaptikus kapcsolatokat hoznak létre mind a gyorstüzelő/PV^+ IN-kal, mind az mGluR1α^+ IN-kal. *Whole-cell voltage-clamp* elvezetéseket végeztem a *stratum oriens*, illetve a *stratum pyramidale* rétegben elhelyezkedő IN-kból. Az elvezetett sejteket a tüzelési mintázatuk, a dendritikus és axonális elágazásuk, valamint PV vagy mGluR1α immunreaktivitásuk alapján azonosítottam. A PV^+ IN-kra érkező, 40 vagy 50 Hz-es stimuláció által kiváltott válaszok amplitúdója csökkent (rövid-távú depresszió; $EPSC_{ötödik}$ / $EPSC_{első}$: 0,52 ± 0,19, n = 16). Ezzel ellentétben az mGluRlα$^+$ IN-kban megnőtt a kiváltott EPSC-k ($EPSC_{ötödik}$ / $EPSC_{első}$ = 3,02 ± 1,9, n = 31) amplitúdója (facilitáció). Átlagosan az mGluR1α^+ sejtek bemenete szignifikánsan eltérő rövid távú plaszticitási mintázatot mutatott a PV^+ sejtekéhez képest. (Eddig bemutatott kísérleteket kolléganőmmel, Holderith Noémivel együtt végeztem.) További kísérleteim kimutatták, hogy az Elfn1/2 és az mGluR1α kettős jelölt IN-okra érkező serkentő válaszok rövid-távú facilitációja szignifikánsan nagyobb volt, mint az mGluR1a$^+$, de Elfn1/2$^-$ sejtekben.

Ismert, hogy a szinapszisok rövid távú plaszticitása és felszabaduási valószínűsége inverz korrelációt mutatnak. Ezen eredmények alapján a PV és mGluR1α immunjelölés alkalmas e két funkcionálisan elkülönülő, alacsony, illetve

magas felszabadulási valószínüségű axon terminálisok posztszinaptikus oldalainak megjelölésére.

4.1.2. Célsejt-specifikus különbségek a terminálisokba beáramló [Ca^{2+}]-ban

A CA3 PS-k *whole-cell current-clamp* elvezetése során depolarizáló áramimpulzusokkal egyedi AP-kat váltottam ki. A szeleteket az *in vitro* képalkotási kísérleteket követően kémiailag fixáltam, majd az intracelluláris biocitint előhívtam, illetve az mGluR1α^+ és PV^+ sejteket immunjelöltem. A 692 vizsgált terminális közül összesen 26, illetve 61 idegzett be potenciálisan PV^+ illetve mGluR1α^+ IN-t. A [Ca^{2+}] tranziensek csúcs amplitúdója 1,25-ször volt nagyobb a PV^+ dendriten szinaptizáló terminálisokban mint az mGluR1a$^+$ dendriten szinaptizálók esetében (PV: medián: 0,134 G / G_{max}, IQR: 0,105 - 0,168 G / G_{max}, n = 26; mGluR1a: medián: 0,107 G/G_{max}, IQR: 0,081-0,138 G/G_{max}, n = 61, nem azonosított célpont: medián: 0,114 G/G_{max}, IQR: 0,084 - 0,145 G / 605). A különböző PS-k esetén enyhén különböző festékkoncentrációk okozta potenciális hibák minimalizálása érdekében kiszámoltam a csúcs amplitúdó arányokat két másik módszerrel is. Olyan sejteket választottam, amelyek esetén találtam mindkét IN-t beidegző terminalisokat. Ezen módszer 1.28-szor magasabb értéket mutatott a PV^+ dendriten szinaptizáló boutonokban. Másodjára, normalizáltam a [Ca^{2+}] tranziensek csúcs amplitúdóját az adott sejt összes terminálisából mért csúcs amplitúdóinak átlagára és így is 1,21-szer nagyobb értéket találtam a PV^+ dendriten szinaptizáló boutonokban. (Eddig bemutatott kísérleteket kolléganőmmel, Noémi Holderith-el együtt végeztem.)

Ezt követően megvizsgáltam, hogy van-e célsejt-specifikus különbség az N/P/Q típusú Ca^{2+} csatornák hozzájárulásában a [Ca^{2+}] tranziensekhez. Ehhez az ω-CTX MVIIC-t (szelektív N- és P/Q típusú Ca^{2+} csatorna blokkolót) alkalmaztam olyan koncentrációban (1 μM), amely szinte teljesen megszüntette a kiváltott EPSC-ket mindkét típusú IN-ban. A blokk mértéke hasonló volt a PV^+ (45 ± 10%, n = 12és az mGluR1a$^+$ sejteket beidegző végződésekben (46 ± 18%, n = 19, p> 0,05, MW U teszt). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az N/P /Q típusú Ca^{2+} csatornák hasonlóan járulnak hozzá a két bouton populációban mért [Ca^{2+}] tranziensekhez.

A nagyobb [Ca^{2+}] tranzienst a PV^+ IN-t célzó terminálisokban okozhatja még alacsonyabb Ca^{2+} pufferelés, kisebb terminális térfogat vagy nagyobb mennyiségű Ca^{2+} bejutása a terminálisba. A puffer kapacitásban lévő különbségek tesztelésére megismételtem a kísérleteket alacsonyabb festék koncentrációval (100 μM Fluo5F-el), mely már nem dominálja a fluoreszcencia változás időbeli lecsengésének kinetikáját. A [Ca^{2+}] tranziensek amplitudójában lévő különbség azonos volt a 300 μM Fluo5F-el mértekhez. Az átlagolt [Ca^{2+}] tranziensekre monoexponenciális

függvényt illesztve kiszámoltam a lecsengési idő állandókat, melyek nem mutattak szignifikáns különbséget (PV: median: 277 ms, IQR: 212 - 403 ms, n = 18; mGluR1a: median: 259 ms, IQR: 207 - 322 ms, n = 35, p <0,61, MW U teszt). Ezen eredmények hasonló mértékü $[Ca^{2+}]$ pufferelésre utalnak a két szinapszisban.

Továbbá a PV^+ és $mGluR1\alpha^+$ dendriteket beidegző terminálisok 3D rekonstrukciójából (Holderith Noémi kísérletei) származó eredmények nem mutattak térfogatbeli különbséget, de az aktív zóna (AZ) területe szignifikánsan nagyobb volt az $mGluR1\alpha^+$ sejteket beidegző terminálisokban. Kiszámoltuk az egységnyi AZ területen beáramló Ca^{2+} mennyiséget, azaz a funkcionális Ca^{2+} csatorna sűrűséget, mely 1,7 – 1,9x nagyobb a PV^+ IN-kat beidegző, nagy F_v-ű terminálisokban az $mGluR1\alpha^+$ dendriten szinaptizálókhoz képest.

4.2. II. RÉSZ. A GCaMP6f fluoreszcens tranziensekből való aktivitásmintázat visszafejtés precizitásának javítása hippokampális CA1 piramissejtekben

4.2.1. A GCaMP6f $[Ca^{2+}]$ tranziensek amplitúdójának változékonysága

Az *in vivo*, altatott egerekben mért $[Ca^{2+}]$ tranziensek (0,26 ± 0,3ΔF/F, medián = 0,16ΔF/F, IQR: 0,07 - 0, Δ F/F, n = 311 tranziens) csúcs amplitúdói jelentős változékonyságot mutattak (CV = 1,07 ± 0,42, n = 13 sejt). A tranziensek változékonyságát az egységnyi $[Ca^{2+}]$ tranziensek variabilitása, az AP-ok és nagy frekvenciás tüzelések (burstok) különböző arányai, az AP-ok különböző számai a burstok-ben, illetve a GKKI nonlinearitása okozhatja. Ezen paraméterek hozzájárulásának vizsgálatára egyedi AP által előidézett (egységnyi) $[Ca^{2+}]$ tranzienseket mértem akut hippokámpális szeletekben. Ezek csúcsamplitudója (0,2 ± 0,2 ΔF/F, medián = 0,14, IQR: 0,06-0,27, n = 121) hasonló volt a korábban ismertekhez, de jelentős sejtenkénti varianciát mutatott (CV = 0,96).

4.2.2. A virálisan kifejezett GCaMP6f expressziós szintjének variabilitása

A szeletek kémiai rögzítését követően a sejtek nativ GCaMP6f intezitásnak már nem kellene tükröznie az intracelluláris $[Ca^{2+}]$-beli különbségeket, hanem tisztán a GCaMP6f expressziós szinteket. Ennek bizonyítására Szigeti Katalin immunjelölést végzett és szinte tökéletes pozitív korrelációt talált (ρ = 0,97, p <0,01, Spearman korreláció) az anti-GFP immunreaktivitás és a nativ GCaMP6f intenzitás között. Az akut hippokampális szeletek kémiai fixálását követően megmértem a sejtek nativ GCaMP6f intenzitását. A CA1 PS-k igen eltérő GCaMP6f intenzitást mutatnak (482 ± 542 AU, median = 262 AU, IQR: 109 - 654 AU, CV = 1,12, n = 297 sejt).

4.2.3. A hasonló GCaMP6f expressziós szintű sejtekben mért egységnyi [Ca^{2+}] tranziensek jelentősen változékonyak

Az egységnyi [Ca^{2+}] tranziensek amplitudójában lévő sejtenkénti változékonyság és a GCaMP6f expressziós szint összefüggésének vizsgálatára beazonosítottam az elvezetett sejteket. Annak ellenére, hogy a sejtek nem voltak feltöltve jelölő anyagokkal (például a biocitin vagy fluoreszcens festékek), 43 sejtet egyértelműen sikerült beazonosítani. Az egységnyi [Ca^{2+}] tranziensek csúcs amplitúdói és a GCaMP6f expressziós szintjük szignifikáns negatív korrelációt mutat ($n = 43$, $\rho = -0{,}69$, $p < 0{,}01$, Spearman korreláció). Az erősen expresszáló sejtekben nagyon kicsik voltak az AP által kiváltott fluoreszcencia változások. A hasonlóan alacsony natív GCaMP6f intenzitású sejtek esetében (a legalacsonyabb 65% -a) a csúcs amplitúdók még mindig nagyon változóak (CV = 0,56, n = 26), és nem korrelálnak a sejtek GCaMP6f expressziós szintjével ($\rho = -0{,}22$; $p = 0{,}28$, Spearman korreláció). A GCaMP6f mennyisége a jel-zaj aránnyal is negatívan korrelált ($\rho = -0{,}58$; $p < 0{,}01$, Spearman-korreláció), de jelentősen változékony volt (IQR: 10,5 - 19,3; CV = 0,6) az alacsony intenzitású sejtekben.

A GCaMP6f egységnyi [Ca^{2+}] tranziensek amplitúdójának variábilitását okozhatja a beáramló [Ca^{2+}] mennyiségben lévő különbség, a különböző szomatikus felület/ térfogat arány vagy a különböző [Ca^{2+}] pufferek jelenléte. Mivel az AP során a feszültség-függő Ca^{2+} csatornákon keresztül beáramló [Ca^{2+}] mennyisége nagymértékben függ az AP alakjától, megmértem az AP-ok szélességét. Nem találtam szignifikáns öszefüggést az AP szélesség és a csúcsamplitudó között ($\rho = 0{,}20$, $p = 0{,}17$, Spearman-korreláció). Az endogén pufferekben lévő potenciális különbségek (pl. calbindin a felszíni PS-kben) felmérése céljából a PS-t csoportosítottam a rétegbeli elhelyezkedésük alapján. Az egységnyi csúcs amplitúdók nem különböztek szignifikánsan a három csoport között (felszínes: $0{,}19 \pm 0{,}15$ $\Delta F/F$, $n = 20$, közép: $0{,}23 \pm 0{,}14$ $\Delta F/F$, $n = 18$, mély: $0{,}14 \pm 0{,}15$ $\Delta F/F$, $n = 12$, $p = 0{,}13$, Kruskal-Wallis ANOVA teszt). Nem találtam szignifikáns különbséget a lecsengési időállandókat illetően sem (felszínes: 419 ± 154 ms, $n = 19$, közép: 376 ± 127 ms, $n = 18$, mély: 400 ± 210 ms, $n = 11$, $p = 0{,}35$, Kruskal-Wallis ANOVA). Ezen eredmények az endogén Ca^{2+} pufferekben lévő jelentős különbségek ellen szólnak. Továbbá, a sejtek felület-térfogat aránya nem korrelált az egységnyi csúcs amplitúdóval ($\rho = 0{,}07$, $p < 0{,}78$, Spearman korreláció), tehát nem is a téfogatbeni különbségekből adódik az egységnyi amplitudók változékonysága.

A sejtenkénti egységnyi [Ca^{2+}] tranziensek amplitúdójának változékonyságát megviszgáltam egy olyan szintetikus Ca^{2+} indikátor alkalmazásával is, amelyről

ismert, hogy fiziológiailag releváns [Ca^{2+}]-t lineárisan jelzi. Az egységnyi [Ca^{2+}] tranziensek csúcs amplitudói (0,02 ± 0,006 G/G_{max}, n = 23) lényegesen kisebb változékonyságot mutattak, 0,27 CV értékkel. Eloszlásuk (átlagokra normalizált) pedig szignifikánsan keskenyebb volt, mint amit a GCaMP6f esetén (p = 0,013, Two-Sample Kolmogorov Smirnoff teszt). Ezen eredmények arra utalnak, hogy a GCaMP6f egységnyi [Ca^{2+}] tranziensek amplitúdójának változékonysága nem a Ca^{2+} beáramlás biológiai variabilitásának következménye.

4.2.4. A GCaMP6f [Ca^{2+}] tranziensek időbeni összegződése szupralineáris

A GCaMP6f expressziós szint és a [Ca^{2+}] tranziensek időbeli összegződése közötti összefüggések vizsgálata érdekében AP sorozatokat váltottam ki különböző frekvenciákon. A linearitási mutató kiszámolásához az AP sorozatok által kiváltott [Ca^{2+}] tranzienseket, az egységnyi események matematikai összegével osztottam el. A GCaMP6f [Ca^{2+}] tranziensek összegződése minden vizsgált frekvencián szupralineráris volt és frekvenciafüggést mutatott. Ezzel ellentétben a Fluo5F-el mért [Ca^{2+}] tranziensek összegzése kvázi lineáris, ami azt jelenti, hogy a A GCaMP6f esetén a szupralineritást nem az AP sorozat során megnövekedett Ca^{2+} beáramlás idézi elő. Az 5 AP 10Hz által kiváltott GCaMP6f [Ca^{2+}] tranziensek linearitása nem mutatott szignifikáns korrelációt a [Ca^{2+}] tranziens amplitúdókkal (ρ = 0,14, p = 0,4 Spearman korreláció), illetve a GCaMP6f expressziós szinttel sem (ρ = - 0,33, p = 0,09, Spearman korreláció). 50 Hz-en a linearitási mutató és az egységnyi amplitudó nem korrelált szignifikánsan (ρ = 0,3, p = 0,06, Spearman korreláció), de az expressziós szinttel való összefüggés elérte a szignifikancia szintet (ρ = -0,46, p = 0,006, Spearman-korreláció).

Amikor ezen AP sorozatok, vagy más nagyfrekvenciás aktivitás megelőzte az egyedi AP protokollokat, az egyetlen AP által kiváltott fluoreszcencia változás amplitudója jelentősen megnövekedett. A jelenségnek a kvantitatív leírása érdekében egy burst utáni helyreállítás (burst recovery) protokollt használtam, melyben egy 10AP-ból álló 50Hz-es burstot egyedi AP-k követtek különböző időintervallumok után. 2,5s-val a magasfrekvenciájú aktivitás után az egységnyi [Ca^{2+}] tranziens csúcs amplitúdója több mint kétszerese (2,06 ± 0,46; n = 6 sejt, kontroll egységnyi amplitudóval normalizált) volt a kontrollnak (burst előtti), és több mint 10s után tért vissza a kiindulási értékhez. Ezzel szemben, kontroll sejtek esetében (nem injektált állat) Fluo5F-el mért [Ca^{2+}] tranziensek egységnyi amplitúdója nem növekedett a magasfrekvenciájú aktivitást követően. Tehát a fent említett jelenség valószínűleg a GCaMP6f nonlineáris jellegéből adódik.

4.2.5. Az egységnyi [Ca^{2+}] tranziensek csúcs amplitúdójának sejtenkénti változékonysága okozza a tüzelési mintázat visszafejtésének pontatlanságát

A fluoreszcens görbékből történő tüzelési mintázat visszafejtéséhez Deneux et al. módszerét (MLspike) alkalmaztuk Szoboszlay Miklós munkatársammal. A hibarátát (fals detekció és kihagyás) kritikusan befolyásoló paraméterek vizsgálatához 4 különböző visszafejtési forgatókönyvet alkalmaztunk: 1) a saját amplitúdó, lecsengés, alapvonali elcsúszás és p_{nonlin}; 2) a sejtek saját amplitúdója, alapvonali elcsúszása és p_{nonlin} értékei, de átlagos lecsengése; 3) átlagos amplitúdó, de saját lecsengés, alapvonali elcsúszás és p_{nonlin} értékek; 4) az összes paraméter átlagos. Az első forgatókönyv szinte nulla hibát eredményezett az összes tesztelt tüzelési frekvencia esetében. Hasonlóképpen, alacsony hibarátát kaptam, amikor az átlagos lecsengési időállandót alkalmaztam (<10 Hz frekvenciákon). Az átlagos csúcs amplitúdó alkalmazása viszont, lényegesen magasabb hibarátát eredményezett minden frekvencián (0,1 Hz: ER = 25,3 ± 33,7%; 1 Hz: ER = 26,2 ± 30,8%; 10 Hz: ER = 17,4 ± 20,2%), hasonlóan azon forgatókönyvhöz amikor sejtek átlagos értékeivel történt az illesztés (0,1 Hz: ER = 22,9 ± 34,2%; 1 Hz: ER = 27,4 ± 32,9%; 10 Hz: ER = 26,5 ± 24,5; Three-Way ANOVA: $p < 0{,}01$ forgatókönyvek, $p > 0{,}05$ frekvenciák, $p > 0{,}05$ forgatóköny*frekvencia interakció). Ezen eredmények azt mutatják, hogy az egységnyi [Ca^{2+}] tranziensek amplitudójában lévő variancia kritikusan befolyásolja az aktivitásmintázat visszafejtésének precizitását.

Amikor a sejteket natív GCaMP6f intenzitásuk alapján alacsonyan (<180 AU, n = 20) és magasan (> 180 AU, n = 8) expresszáló csoportokba soroltam, a hibaráták szignifikánsan kisebbek voltak a gyengén expresszáló sejtek esetében 0,1 Hz és 1 Hz átlag frekvenciákon (Three-Way ANOVA: $p < 0{,}01$ intenzitás, $p < 0.01$ intenzitás * forgatókönyv interakció, $p > 0.05$ intenzitás * frekvencia interakció, $p > 0.05$ intenzitás * forgatókönyv * frekvencia interakció, páros Bonferroni post hoc teszt : 0,1 Hz: $p < 0{,}01$, 1 Hz: $p < 0{,}01$, 10 Hz: $p > 0{,}05$).

4.2.6. A visszafejtési hiba csökkentése az egységnyi [Ca^{2+}] tranziensek becsült csúcs amplitúdójával végzett illesztéssel

Az egységnyi csúcs amplitudókat egy modell-fuggő és model-független módszerrel határoztam meg. Az élő állatokban elvezetett CA1 PS-k tüzelési mintázata (Grosmark, AD, Long J. és Buzsáki, G; CRCNS.org; http://dx.doi.org/10.6080/K0862DC5) alapján megállapítottam, hogy az időben elszigetelt (nincs AP 4s-al előtte, illetve 1s-al utánna) eseményeknek minimum 63,6%-a egyetlen AP, a fennmaradóak pedig izolált burstok. Ezek alapján, az izolált tranziensek legkisebb kétharmadát valószínűleg egyetlen AP-t váltotta ki, az átlaguk

pedig a "*feltételezett egységnyi*" [Ca^{2+}] tranziens. A gyengén expresszáló PS-k (n = 20) paramétereivel és az *in vivo* elvezetett CA1 PSek tüzelési mintázataival [Ca^{2+}] fluoreszcens görbéket generáltam. A "*feltételezett egységnyi*" és valós amplitúdók nagymértékű egyezése (arányuk 1,01 ± 0,05) a becslési módszer szinte tökéletes precizitására utal. Továbbá, kiválasztottam azon [Ca^{2+}] tranzienseket, amelyeket az MLspike egységnyinek és izoláltnak detektált abban a visszafejtési forgatókönyvben, amelyhez a gyengén expresszáló sejtek átlagos amplitúdó, lecsengés, p_{nonlin} és alapvonali elcsúszás értékeit használtam. Az így kapott "*egységnyinek detektált*" és a valós csúcs amplitúdó aránya 1,08 ± 0,17 volt.

A visszafejtési hibaráta szignifikánsan csökkent (p = 0,01, Friedman ANOVA teszt) 15,0 ± 15,2% -ról 6,3 ± 4,9% -ra, ha a '*feltételezett egységnyi*' amplitúdót (Two-Paired Wilcoxon signed rank *post hoc* teszt: p <0,01), illetve 6,4 ± 4,8%,-ra ha az "*egységnyinek detektált*" amplitúdót (Two-Paired Wilcoxon signed rank *post hoc* teszt: p <0,01) alkalmaztam az illesztéshez a többi átlagos paraméter mellett. Eredményeim alátámasztják a csúcsamplitúdók variabilitásának kulcsfontosságát a tüzelési mintázat visszafejtésének pontosságában, míg a lecsengési időállandó, a p_{nonlin} és az alapvonali elcsúszási a hibaráta nagyon kis részéért felelősek (~ 6%).

5. KÖVETKEZTETÉSEK

Disszertációm első részében a célsejt-specifikus neutortanszmitter felszabadulási valószínűségében lévő különbségek mechanizmusát vizsgáltam. A kérdés megválaszolásához először meghatároztam a CA3 PS-k PV^+, illetve $mGluR1\alpha^+$ IN-okkal létrehozott szinapszisainak rövid-távú plaszticitását. A CA3 PS axonvégződések extracelluláris ingerlésével kiváltott posztszinaptikus serkentő áramok különböző rövid-távú szinaptikus tulajdonságokat mutattak (CA3 PS-PV^+ IN: depresszáló, CA3 PS-$mGlur1\alpha^+$ IN: facilitáló), melyek különböző kezdeti felszabadulási valószínűségre utalnak. Ezen eredményeim lehetővé tették e molekulák (PV és mGluR1α) használatát a nagy, illetve alacsony felszabadulási valószínűségű szinapszisok posztszinaptikus elemeinek megjelölésére.

A CA3 PS lokális axonvégződéseiben végzett neuronális aktivitás-függő [Ca^{2+}] képalkotó kísérleteim azt mutatták, hogy a [Ca^{2+}] beáramlása egyetlen AP-ra jelentősen nagyobb a nagy F_v szinapszisok esetében. A szelektív N- és P/Q- típusú Ca^{2+} csatorna blokkoló, ω-CTX MVIIC alkalmazásával végzett kísérleteim arra utalnak, hogy a különbség nem a P/Q és N típusú Ca^{2+} csatornákon beáramló [Ca^{2+}] sejt-specifikus hozzájárulásából adódik. Végül, alacsonyabb Fluo5F koncentrációival

végzett [Ca^{2+}] méréseim eredményei, arra utalnak, hogy a két szinapszis populációban hasonló a [Ca^{2+}] pufferelés mértéke. Ezen eredmények, a kollégáim párhuzamosan végzett kísérleteivel együtt (terminális térfogat és aktiv zóna terület EM mérése) kétszer nagyobb funkcionális Ca^{2+} csatorna-sűrűségre utalnak a PV^{+} IN-t beidegző, nagy F_v terminálisokban az mGluR1α^{+} IN-okat beidegzőkhöz képest. Ennek ellenére, Kirizs Tekla, nagyfelbontású immunjelölési módszerrel végzett kísérleteiben csak 15% -os különbséget mutatott ki a Ca^{2+} csatorna alegység-sűrűségében. Az eltérés arra utal, hogy a célsejt-specifikus felszabadulási valószínűség hátterében [Ca^{2+}] -csatornák funkcionális modulációja, vagy a különböző alegység-összetétele áll (Éltes et al., 2017).

A szinaptikus sokféleség szerepének vizsgálatát a memória, illetve a viselkedési mintázatok kialakulásában, a jelenleg rendelkezésre álló vizsgálómódszerek korlátozzák. Ezért disszertációm második részében a legelterjedtebb, optikai mérési technika, a neuronális aktivitás-függő [Ca^{2+}] képalkotás esetében vizsgáltam e korlátok lehetséges okait.

Eredményeim arra utalnak, hogy az *in vivo* mért GCaMP6f [Ca^{2+}] tranziensek csúcs amplitúdóinak változékonysága nemcsak a változó aktivitás következménye, hanem az egységnyi [Ca^{2+}] tranziensek csúcs amplitúdójának lényeges sejtenkénti változékonysága. Bizonyítékot szolgáltatok arra, hogy a GCaMP6f kifejezési szintje csak részben alapozza meg az *in vitro* egyetlen AP által kiváltott Ca^{2+} tranziensek amplitúdójának sokszínűségét. Továbbá kimutatom, hogy az egységnyi Ca^{2+} tranziensek amplitúdója függ a sejt korábbi aktivitásától. Azt is bebizonyítom, hogy a GCaMP6f Ca^{2+} tranziensek összegzése szupralineáris, a szupralinaritási index frekvenciafüggő, és jelentős sejtenkénti változékonyságot mutat. Párhuzamosan végzett kontroll kísérleteim eredményei arra utalnak, hogy a megfigyelt variabilitás és a szupralinearitás, nem egy a [Ca^{2+}] beáramlásban történő biológiai variabilitás okozza, hanem a GCaMP6f tulajdonságainak köszönhetőek. A szimulációk eredményei, azt bizonyították, hogy az egységnyi amplitudó változékonysága a legfontosabb hibaforrás a tüzelési mintázat visszafejtésében. Végezetül kidolgoztam egy megbízható (átlagos ER ~ 5%) modell-függő és egy modell-független eljárást, mely a gyengén expresszáló sejtek egységnyi csúcs amplitúdóinak becslésén alapszik. Ezen módszer hozzájárul az *in vivo* mért fluoreszcencia változásokat kiváltó neuronális aktivitás pontos visszafejtéshez (Éltes et al., 2019).

6. PUBLIKÁCIÓS LISTA

6.1. A tézis alapját képező publikációk:

1. **Éltes T***, Kirizs T*, Nusser Z, Holderith N. (2017) Target cell type-dependent differences in Ca2+ channel function underlie distinct release probabilities at hippocampal glutamatergic terminals. Journal of Neuroscience, 37: 1910–19242. IF: 5.971.

2. **Éltes T**, Szoboszlay M, Kerti-Szigeti K, Nusser Z. (2019): Improved spike inference accuracy by estimating the peak amplitude of unitary [Ca2+] transients in weakly GCaMP6f expressing hippocampal CA1 pyramidal cells. The Journal of Physiology, JP277681, publikáció alatt, doi.org/10.1113/JP27768, IF:4.540.

Other publications:

1. Unal G, Crump MG, Viney TJ, **Éltes T**, Katona L, Klausberger T, Somogyi P. (2018) Spatio-temporal specialization of GABAergic septo-hippocampal neurons for rhythmic network activity, Brain Structure and Function, doi: 10.1007/s00429-018-1626-0; IF: 4.231.

2. Orbán-Kis K, **Szabadi T**, Szilágyi T. (2015) The loss of Ivy cells and the hippocampal input modulatory O-LM cells contribute to the emergence of hyperexcitability in the hippocampus, Rom J Morphol Embryol, 56(1):155–161; IF: 0.811.

*-osztott elsőszerzők