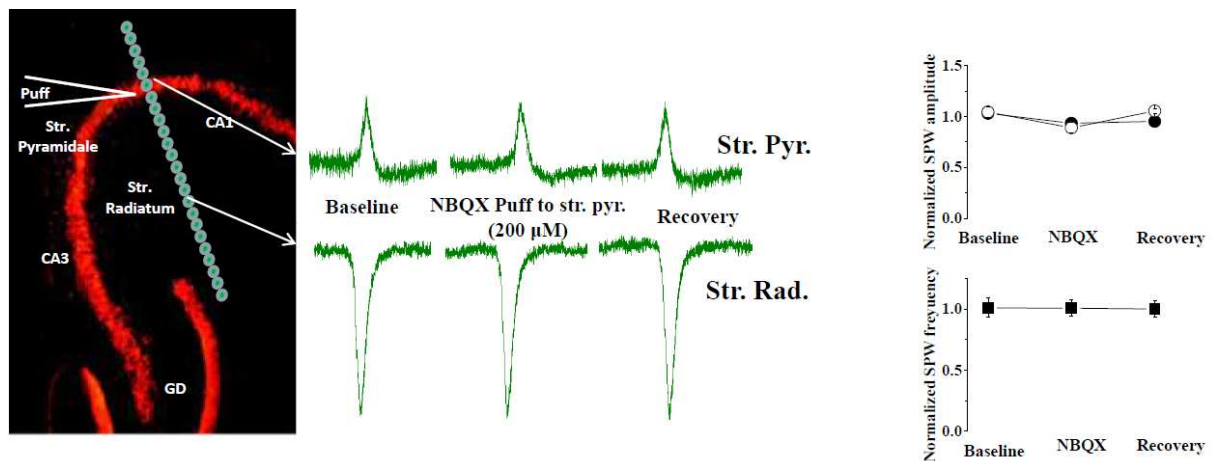


„A hippocampális éleshullámok kialakulásának hálózati mechanizmusa” című és
NNF 85659 számú pályázat zárójelentése

A hippocampális EEG egyik jellemző aktivitásmintázata az ún. éleshullám, mely mai tudásunk szerint fontos szerepet játszhat egyes kognitív folyamatokban, mint pl. a memórianyomok bevésése [1, 2]. A széleskörű in vivo kutatások ellenére az éleshullámok háttérében álló pontos mechanizmusok mindmáig tisztázatlanok. Az egy év időtartamú pályázat alatt célunk volt, hogy egy in vitro modell segítségével felderítsük, miként járulnak hozzá a különböző sejtípusok ezen hálózati események kialakulásához. Vizsgálatainkat egér agyszeleteken végeztük. Mivel a principális sejtek szinkron kisülését a periszomatikus régiójukat beidegző gátlósejtek közül a parvalbumin tartalmú interneuronok tudják leghatékonyabban szabályozni, ezért elsősorban ezen interneuronok szerepét szeretnénk tisztázni az éleshullámok kialakulásában.

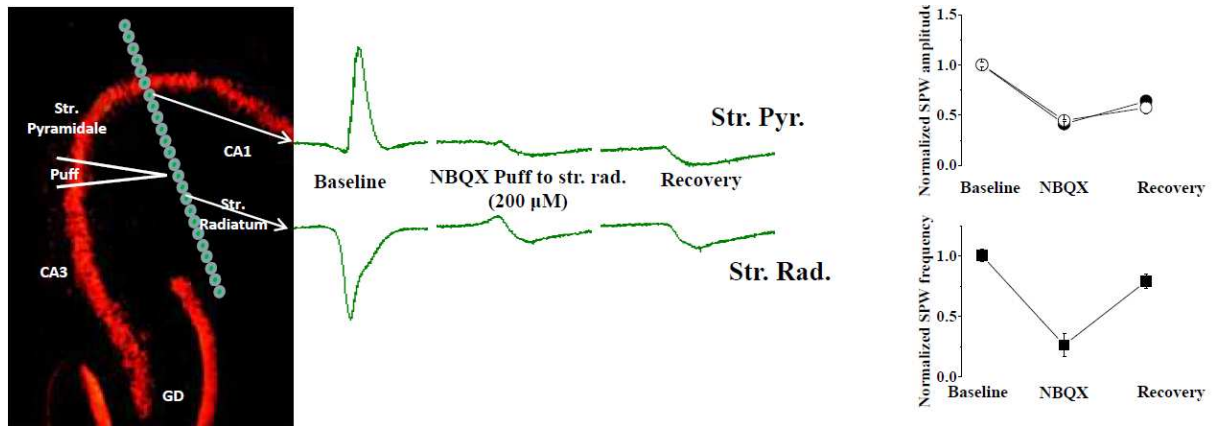
Ezt a célt két módszer segítségével szeretnénk elérni: a) farmakológiai eszközökkel, ill. b) optogenetikai megközelítés alkalmazásával. Az első megközelítésben a különböző receptor antagonistákat lokálisan adagoltuk egy patch pipetta segítségével a hippocampusz-szelet különböző rétegeibe, miközben 24-csatornás lineáris elektródsoron szimultán detektáltuk a lokális mezőpotenciálokat az egyes rétegekből. A következő megfigyeléseket végeztük:

1. Ha lokálisan, a piramisisejtek szomatikus rétegébe adtunk egy ionotróp glutamáterg receptor antagonistát, az NBQX-t, amely csak az AMPA/kainát típusú receptorokra hat, akkor az semmi változást nem okozott az éleshullámok gyakoriságában, vagy amplitúdójában.



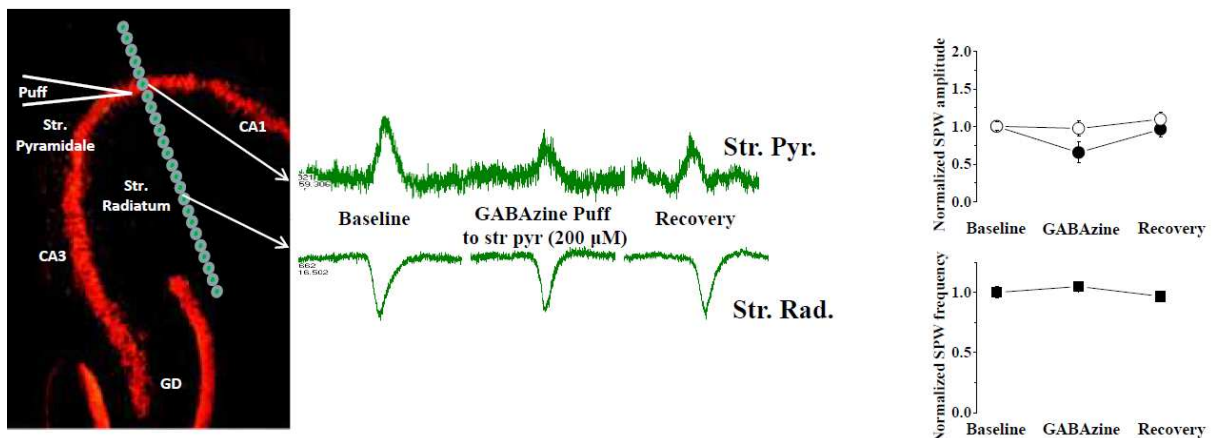
Ez a megfigyelés konzisztens azzal az anatómiai eredménnyel, miszerint a hippocampusz piramisisejtjei nem kapnak serkentő szinaptikus bemenetet a szómáikra.

2. Ha lokálisan, a piramisisejtek dendritfájára adagoltuk az NBQX-t, akkor az csökkentette az éleshullámok gyakoriságát és az amplitúdóját.



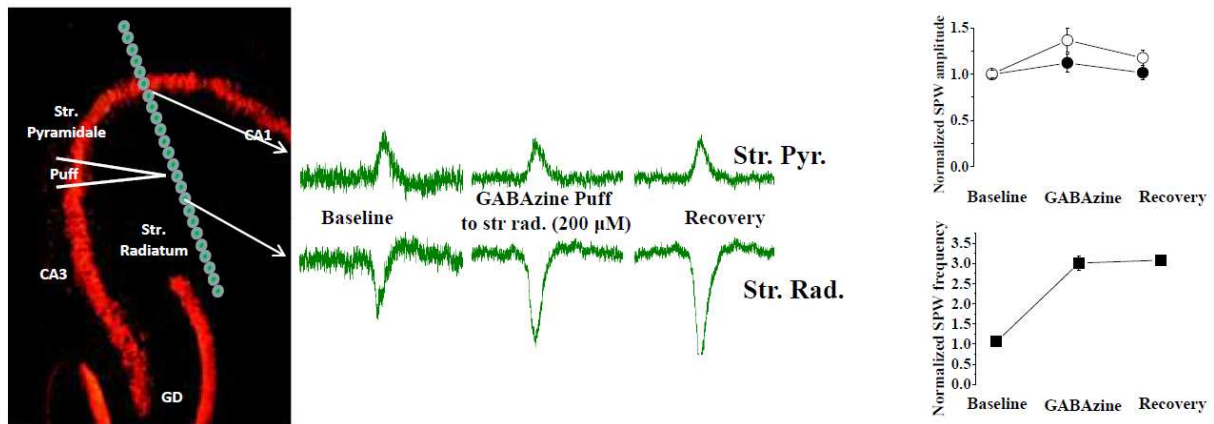
Ez az eredmény azt mutathatja, hogy a dendritikus régió szinaptikus serkentése szükséges az éleshullámok kialakulásához.

3. Ha lokálisan, a piramis sejtek szomatikus rétegébe adtuk egy ionotróp GABA receptor antagonistát, a gabazine-t, amely a GABA-A típusú receptorokra hat, akkor az csökkentett az éleshullámok amplitúdóját a piramis sejtek rétegéből elvezetve, de nem változtatta meg annak a gyakoriságát.



Ez azt sugallja, hogy a piramis sejtek periszomatikus régióját beidegző gátlósejtek szerepet játszanak a lokális mezőpotenciál nagyságának a kialakításában.

4. Ha a piramis sejtek dendritfájára adagoltuk a gabazine-t, akkor az növelte a dendritikus régióban mért éleshullám-amplitúdót és ezzel párhuzamosan a gyakoriságot is.



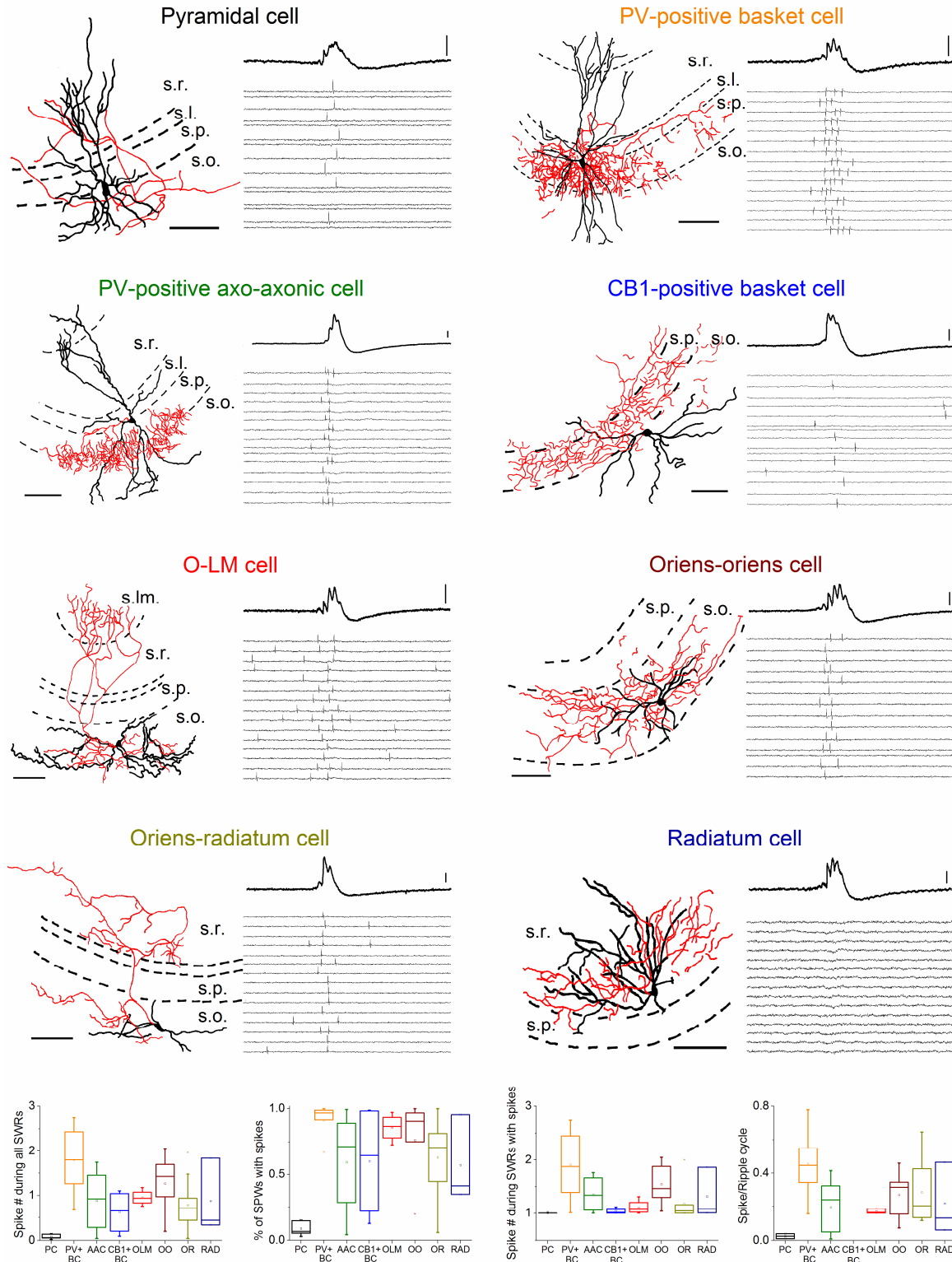
Ez a megfigyelés azt mutatja, hogy a dendritikus régió szinaptikus gátlása is kontrollálja a serkentő sejtek aktivitását, ezáltal az éleshullámok kialakulását.

Összefoglalva, ezek a farmakológiai kísérletek azt a hipotézist támogatják, miszerint a piramissejtek egymás aktivitá válása a rekurrens kollaterális rendszeren keresztül indítja az éleshullámot, amely ha elér egy küszöbértéket, akkor kisüti a periszomatikus gátlósejteket. A modell szerint az így kialakuló visszacsatoló gátlás állítaná le a piramissejtek aktivitását. A lokális mezőpotenciálban az éleshullámok nagyságát a periszomatikus gátlósejtektől eredő szinaptikus gátlás szabályozná, azaz több gátlósejt együtt-tüzelése nagyobb éleshullámot eredményezne, kevesebb gátlósejt aktivitása pedig kisebbet.

Az éleshullámok sztochasztikus indulásáról az agyszeletben egy külön tanulmányt készítettünk, amelyben többek között azt vizsgáltuk, hogy milyen peremfeltételek kellenek ahhoz, hogy egy éleshullám elinduljon a hippocampusz CA3 régiójában. Azt találtuk, hogy az egyes piramissejtek esetleges tüzelése láncreakciószerűen aktiválhat egyre több és több piramissejtet, amely populációs aktivitás ha elér egy kritikus értéket (azaz egy, a piramissejtek által kiváltott szinaptikus serkentés mértéket), akkor az kisüti a gátlósejteket. Azt figyeltük meg, hogy az éleshullámok előtt kb. 50 ms-al indul a piramissejtek láncreakciószerű aktiválása. Ez idő alatt kb. 20-szor valósulhat meg 2.5 ms szinaptikus jelátviteli idővel számolva a visszacsatoló serkentés erősödése a piramissejtek neuronhálózatában anélkül, hogy a visszacsatoló gátlás aktiválódjon. A parvalbumin tartalmú kosársejtek magas tüzelési küszöbe lehet az egyik faktor [3], ami meghatározhatja, hogy a piramissejtek populációs aktivitása mekkora maximális mértéket érhet el. Ezen túlmenően ebben a tanulmányban megvizsgáltuk azokat a sejtszintű mechanizmusokat, amelyek szükségesek és elégségesek ahhoz, hogy a hippocampuszban az éleshullám-aktivitási állapot átváltson gamma oszcillációra (lásd később).

Az NNF 78917 sz. pályázatunk támogatási ideje alatt feltérképeztük az egyes idegsejttípusok tüzelési aktivitását, és a rájuk érkező szinaptikus bemenetek tulajdonságait. A jelent pályázat idejére áthúzódott az adatok elemzése és azok rendszerbefoglalása. Ebben a munkában azt a megfigyelést tettük, hogy a parvalbumint expresszáló kosársejtek a legaktívabban az éleshullámok alatt. A többi gátlósejt kevesebbet tüzelt. Ha összevetettük az egyes sejttípusokra érkező szinaptikus bemenetek tulajdonságait az adott sejtek tüzelési sajátágaival, akkor azt állapítottuk meg, hogy a piramissejtek az éleshullámok alatt akkor tüzelnek, ha csökkent a szinaptikus gátlás mértéke a rájuk érkező serkentéshez képest. Ezzel szemben a gátlósejtek tüzelését a rájuk érkező serkentés megnövekedett mértéke

determinálja. Tehát, amíg a gátlósejtek tüzelését az éleshullámok alatt a szinaptikus serkentés szabályozza, addig a piramis sejtek aktivitását a szinaptikus gátlás. Az, hogy egy idegsejt kisül-e az éleshullámok alatt, azt döntően a szinaptikus serkentés és gátlás arány határozza meg, ill. a serkentés abszolút mértéke. Ha a szinaptikus gátlás mértéke jellemzően nagyobb, mint a szinaptikus serkentés, akkor az a sejt nem fog akciós potenciált generálni. Akkor sem fog tudni kisülni a sejt, ha a szinaptikus serkentés nagysága küszöbalatti mértékű. Ezekről az eredményekről egy kézirat készült, ami beküldésre került (Hájos et al., beküldve).

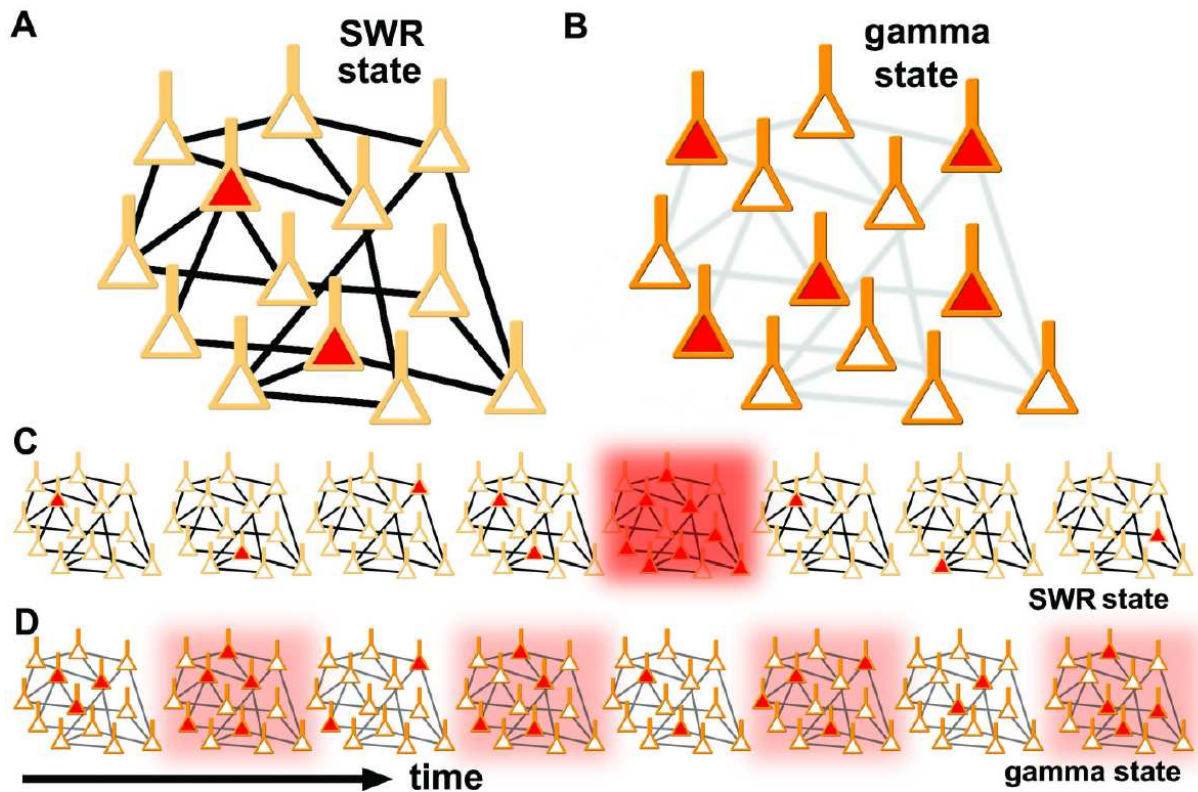


Amit azt az ábra is mutatja, a parvalbumin tartalmú kosársejtek a legaktívabbak az éleshullámok alatt. Hogy bizonyítsuk szerepüket az éleshullámok keletkezésébe, ezért olyan

farmakológiai eszközöket alkalmaztunk, amelyek csak ezen sejtek szinaptikus kimenetét gátolják. Két ilyen drog hatását teszteltük, egy mű-opioid receptor agonistát, a DAMGO-t, amely bizonyítottan csak a parvalbumin tartalmú gátlósejtek idegvégződéseire hat a periszomatikus régióban [4]; ill. egy P/Q típusú feszültség-függő Ca^{2+} csatorna blokkolót, az agatoxin-t, amely a periszomatikus gátlást kialakító GABAerg sejtek közül szelektíven szintén csak a parvalbumin tartalmú idegsejteken hat [5]. A kísérletek predikciója az volt, hogy ha a parvalbumin tartalmú gátlósejtek szükségesek az éleshullámok kialakításához, akkor ezen idegsejtek kimenetének a csökkentése DAMGO-val vagy agatoxinnal az éleshullámok drasztikus csökkenését vagy akár eltűnését is eredményezheti. A piramissejtek rétegébe lokálisan adagolt mindkét drog esetében valóban azt találtuk, hogy az éleshullámok jelentősen csökkentek. Ez a kísérleti eredmény az eredeti hipotézisünket látszik alátámasztani, miszerint a parvalbumin tartalmú gátlósejtek által generált ionmozgás alakítaná ki az éleshullámot a lokális mezőpotenciálban.

Ezeket a farmakológiai kísérleteket szeretnénk volna optogenetikai eszközök alkalmazásával is megerősíteni, de sajnos az MTA KOKI víruslaborjának a kialakítása, amely elengedhetetlen feltétele e kísérleteknek, több mint fél év csúszással, ez év januárjában került beüzemelésre. Az év első három hónapjában, azaz a pályázat utolsó negyedében beállítottuk a módszert, amellyel a parvalbumin-cre transzgenikus egerekben reprodukálható módon be tudunk AAV 2.9 szerotípusú vírussal kék fényre aktiválódó channelrhodopsin csatornafehérjéket vinni, és azok szelektíven a parvalbumin tartalmú gátlósejtekben expresszálni. Az elektrofiziológiai vizsgálatok folyamatban vannak, és a pályázat lezárulásával tovább folytatjuk e kísérleti vonalat.

Összefoglalva, a pályázat futamideje alatt farmakológiai eszközök alkalmazásával bizonyítékokat találtunk annak a hipotézisünknek az alátámasztására, mely szerint a piramissejtek egymást aktiválva indítják az éleshullámokat, míg az éleshullám nagyságát a periszomatikus régióban döntően a parvalbumin tartalmú gátlósejtek axonvégződéseiből felszabaduló GABA által kiváltott Cl^- ionmozgás okozza az extracelluláris térben. Mivel nagyon hasonló mechanizmus hozza létre a gamma oszcillációt is a hippocampusz-szeletben, ahogy azt egy korábbi munkánkban mutattuk [6], ezért felmerül a kérdés, hogy ugyan azok a neuronhálózati elemek, nevezetesen a piramissejtek és a parvalbumin tartalmú gátlósejtek, milyen feltételek mellett alakítanak ki egyszer éleshullám-aktivitást, míg máskor gamma oszcillációt a hippocampusz CA3 régiójában. Elektrofiziológiai vizsgálatokat kombinálva számítógépes modellezéssel azt kaptuk, hogy a neuronhálózat működésének átkapcsolása egyik aktivitási állapotából a másikba döntően két paraméter áthangolásával elérhető: a sejtek serkenthetőségének és a szinaptikus súlyoknak a módosításával. Ez a nagyon egyszerű megoldás drámai hatást vált ki a neuronhálózatok dinamikájában. Az éleshullámok alatt a piramissejt-populációban az aktivitási szint magasra tud nőni, mert erős a sejtek közti jelátvitel hatékonysága, amivel párhuzamosan a gátlósejtek magasabb küszöbnél kapcsolnak be. Ezzel szemben a gamma oszcilláció alatt a piramissejtek gyakran aktiválódnak, mert depolarizálódnak, de mivel a közöttük lévő szinapszisok hatékonysága csökkent, így az aktivitás gyorsan elhal a hálózatban részben azért, mert a gátlósejtek hamarabb, kisebb aktivitási szint mellett kezdenek tüzelni, ami meggátolja a piramissejtek további tüzelését addig, amíg a szinaptikus gátlás tart. Ezt az elméletet szemlélteti a következő ábra:



Az éleshullámok alatt (SWR), ami ritkán következnek be (~1Hz gyakorisággal), kevés piramisneuron indítja a hálózati aktivitást (piros sejtek), amely viszont magas szintet ér el a sejtek közti erős kapcsolatok miatt (fekete vonalak). A gamma oszcilláció alatt (amikor ~30 Hz-es gyakorisággal követik egymást a szinkron és nem szinkron állapotok), több piramisneuron aktív a szinkronaktivitáson kívül, de a szinkronaktivitás alatt kisebb mértékű a piramisneuron-tüzelés populációs szinten, ami viszont elégséges a gátlósejtek kisütéséhez, így a gamma oszcillációgenerálásához. Ebben az állapotban a sejtek közti szinaptikus jelátvitel gyengébb (szürke vonalak) (Gulyás et al., kézirat).

Az eddigi eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a két szinkronitási állapotot (az éleshullámot, ill. a gamma oszcillációt) feltehetően ugyan az a neuronhálózat hozza létre, de más paraméterek mellett. További vizsgálatokban szeretnénk ezt a tézist megerősíteni (vagy cáfolni), mert ez az új szemlélet döntő hatású lehet a szinkronitási állapotok mögött meghúzódó mechanizmusok megértésére, és jelentősen módosíthatja a neuronhálózatokban bekövetkező információfeldolgozásról alkotott képünket.

Mivel a pályázat célkitűzéseinek eléréséhez szükséges kísérletes munkák még nem zárultak le, és ezért az eredmények publikálása is későbbre tolódik, ezért szeretném kérni, hogy az OTKA egy kiegészítő eljárásban két éven belül minősítse majd újra e zárójelentésben elért eredményeket, figyelembe véve a később megjelent publikációkat.

Budapest, 2012. május. 24.

Hájos Norbert

Kéziratok:

Attila I. Gulyás, Szabolcs Káli, Rita Karlócai, Zsolt Kohus, Dániel Schlingloff, Tamás F. Freund, Norbert Hájos. **Cholinergic tuning of excitability and synaptic efficacy transforms hippocampal network activity.** (beküldve)

Norbert Hájos, Mária R. Karlócai, Judit Veres, Beáta Németh, Gergely Szabó, Hannah Monyer, Gábor Szabó, Ferenc Erdélyi, Tamás F. Freund and Attila I. Gulyás. **Input-output features of anatomically identified CA3 neurons during hippocampal sharp wave/ripple oscillation in vitro.** (beküldve)

Referenciák:

1. Girardeau, G., et al., *Selective suppression of hippocampal ripples impairs spatial memory.* Nat Neurosci, 2009. **12**(10): p. 1222-3.
2. Jadhav, S.P., et al., *Awake Hippocampal Sharp-Wave Ripples Support Spatial Memory.* Science (New York, N.Y., 2012).
3. Goldberg, E.M., et al., *K⁺ channels at the axon initial segment dampen near-threshold excitability of neocortical fast-spiking GABAergic interneurons.* Neuron, 2008. **58**(3): p. 387-400.
4. Glickfeld, L.L., B.V. Atallah, and M. Scanziani, *Complementary modulation of somatic inhibition by opioids and cannabinoids.* The Journal of neuroscience, 2008. **28**(8): p. 1824-32.
5. Wilson, R.I., G. Kunos, and R.A. Nicoll, *Presynaptic specificity of endocannabinoid signaling in the hippocampus.* Neuron, 2001. **31**(3): p. 453-62.
6. Gulyas, A.I., et al., *Parvalbumin-containing fast-spiking basket cells generate the field potential oscillations induced by cholinergic receptor activation in the hippocampus.* J Neurosci, 2010. **30**(45): p. 15134-45.