

Az "Aktivitás- és információfüggő szinaptikus plaszticitás in vitro neuronhálózatokban" című OTKA pályázat (T043162)

Zárójelentése

A 2003. évben indult OTKA pályázatunkban kompakt neuronhálózatok szinaptikus szerveződésének plaszticitását és a hálózati dinamika változásait tanulmányoztuk a preszinaptikus aktivitás függvényében gerinctelen neurobiológiai modelleken. A kísérletekhez a nagy mocsári csiga (*Lymnaea stagnalis*) azonosított neuronjait használtuk, amelyeknek szinaptikus topológiáját és főbb biofizikai tulajdonságait már saját korábbi kutatásainkból illetve irodalmi adatokból ismerjük. A kísérletekben hagyományos és modernebb elektrofiziológiai módszerek kombinálásával és a mért adatokat részletes matematikai analízisnek alávetve kerestünk olyan újszerű szerveződési elveket, amelyek a neuronok közötti szinaptikus kapcsolatok finom változásait eredményezhetik. Ambíciós tervünk szerint a vizsgált kompakt neuronhálózatban olyan plasztikus változásokat igyekeztünk kimutatni, amelyek érzékenyen függenek a preszinaptikus aktivitás időbeli szerkezetétől, viszont kevésbé annak általános statisztikai jellemzőitől. A feltételezett, mintázatfüggő plaszticitás tanulmányozására a hagyományos intracelluláris elektrofiziológiai módszerek mellett főleg a mintázat clamp technikát alkalmaztuk, amellyel kiválasztott preszinaptikus neuronok aktivitását tudtuk tetszőlegesen vezérelni és annak hatását mérni a posztzinaptikus hálózatban. Kitűzött céljainkat részben sikerült megvalósítani, mivel

- 1) újszerű, mintázatszelektív (rezonáns) viselkedést mutattunk ki a vizsgált neuronhálózatban,
- 2) demonstráltuk a neuronhálózat plasztikus átszerveződését különböző kémiai modulátárok hatására,
- 3) részletesebben megismertük a légzésvezérlő neuronhálózat architektúráját és elemeinek funkcionális viszonyait,
- 4) hibrid, biológiai-elektronikus áramkörök és software kifejlesztésében vettünk részt, amelyeket sikeresen alkalmaztuk a *Lymnaea* neuronhálózatok vizsgálatában,
- 5) mindemellett nem észleltünk egyértelműen azonosítható, a preszinaptikus mintázat magasabb rendű paramétereitől függő plasztikus változásokat a vizsgált rendszerben,
- 6) ezek alapján megállapítottuk, hogy a *Lymnaea* idegrendszerben a szinaptikus plaszticitás Hebb-féle, vagy magasabb rendű formái helyett a meglévő hálózati kapcsolatok kémiai újrakonfigurálása dominál.

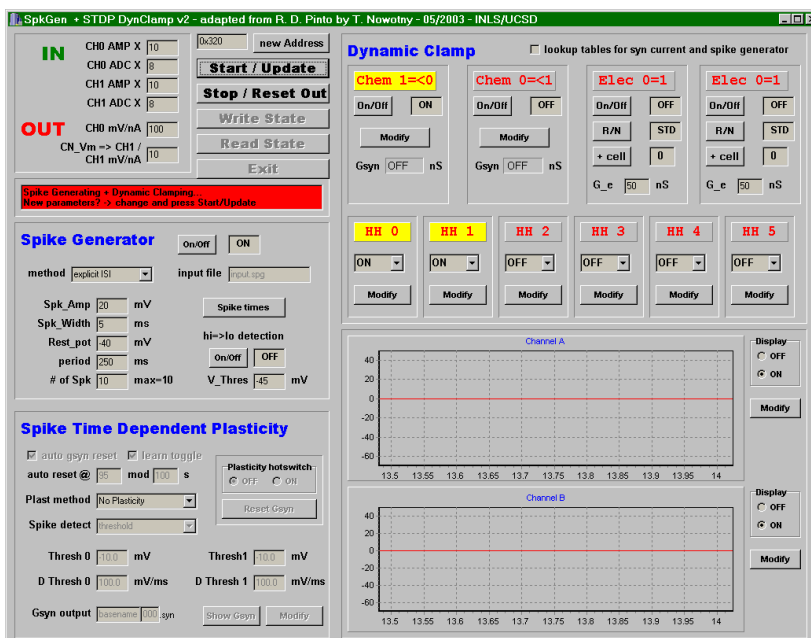
Vizsgálataink módszertani feltételeit és időrendjét több menet közben felmerült észlelés is módosította. A külső szinaptikus, illetve neurohumorális hatások kiküszöbölése érdekében a kísérleteket minél több esetben sejttenyészetben kívántuk elvégezni. Itt a kardiorespiratorikus hálózat több azonosított neuronját izoláltuk mechanikai és enzimatisz uton, majd kondicionált médiumban tartottuk azokat. A tenyészetben tartott neuronok között ugyanakkor ritkán jöttek létre kémiai szinapszisok, jóval gyakrabban elektromos kontaktusok. Ezek az elektromos kapcsolatok nem mutattak markáns sejttípus-preferenciát, tehát egymással in vivo nem kapcsolódó neuronok között is megjelentek. A mintázat clamp kísérleteket emiatt célszerűbbnek ítéltük in vivo preparátumban folytatni, tehát intakt, már kialakult szinaptikus kapcsolatokat alapul véve. A kutatás előrehaladtával természetszerűleg felmerültek olyan kérdések is, amelyek új megvilágításba helyezték a téma több aspektusát. Bár explicite nem szerepeltek a pályázatban, ezek a kérdések és az általuk generált kísérleti eredmények említést érdemelnek a zárójelentésben. Itt elsősorban a neuronhálózatok biofizikai és topológiai változatosságának problémakörét említjük meg.

A dinamikus clamp és a mintázat clamp módszer bevezetése és alkalmazása

A kutatási program szerves részét képezte olyan elektrofiziológiai módszerek implementálása és alkalmazása, amelyeket részben korábbi hazai vizsgálatainkban teszteltünk, részben külföldi

kollaborációban fejlesztettünk. A mintázat clamp módszert a témavezető vezette be kompakt neuronhálózatok vizsgálatára korábban (Szücs et al., 1998). Ennek némileg egyszerűsített verzióját alkalmaztuk Lymnaea neuronok stimulálására és tüzelésük vezérlésére. Új aspektust jelentett kísérleteinkben a mintázat clamp protokoll és a neuronhálózat farmakológiai manipulációjának kombinálása. Itt számos érdekes effektust sikerült megfigyelnünk (lásd alább).

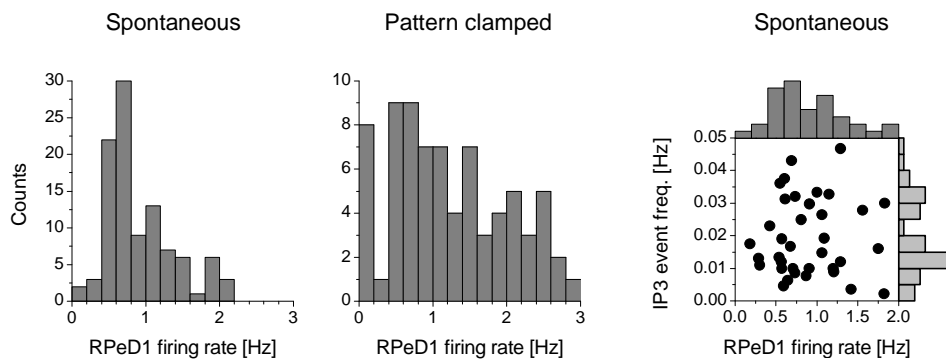
A témavezető egy már korábban megkezdett kollaborációt folytatva részt vett egy magasan fejlett dinamikus clamp software kifejlesztésében (Pinto et al., 2001, Nowotny et al., 2006) és alkalmazásában számos biológiai kísérletben (1. ábra). Itt biológiai neuronokba injektáltunk mesterséges ionkonduktanciákat, amellyel hűen tudtuk szimulálni a neuront érő szinaptikus áramokat, illetve a feszültség-aktiválta ionáramokat. A dinamikus clamp kitűnő eszköznek bizonyult mind a Lymnaea neuronok intrinsic dinamikai tulajdonságainak vizsgálatában (Szücs et al., 2004), mind egy másik gerinctelen biológiai modell, a langusza pilorikus neuronhálózat szinkronizációs tulajdonságainak kutatásában (Szücs, 2007) (továbbá publikálás alatt). Az StdpC nevű dinamikus clamp programot a web-en elérhetővé tettük az azt alkalmazni kívánó neurofiziológusok számára, valamint további két- és többoldalú nemzetközi projekteket kezdeményeztünk és indítottunk a hibrid technológia irányában.



1. ábra. Dinamikus clamp program Windows alatt. Ez a technika lehetővé teszi kémiai és elektromos szinapszisok realiztikus szimulációját és biológiai neuronokba történő inzertálását standard current clamp erősítők használatával. A program képes a szinaptikus plaszticitás több formájának szimulációjára és így valós időben tudja hangolni biológiai és/vagy elektronikus neuronhálózatok működését és interakcióját.

A Lymnaea kardiorespiratorikus neuronhálózat működésének és szinaptikus konnexitásának jellemzése

A mocsári csiga légzésvezérlő neuronhálózata már több, mint 15 éve kedvelt kísérleti objektuma a neurobiológiai kutatásoknak. A hálózat sejtes és szinaptikus elemeit korábban azonosították és azok biofizikai tulajdonságait meglehetősen részletességgel feltárták. Mindemellett a neuronhálózatban működő sejtek hosszútávú tüzelési mintázatait, azok szinaptikus modulációját és az egész rendszer dinamikus szerveződését még csak hiányosan ismertük. A hálózatból regisztrált idősorokat (tüzelési mintázatokat) többszintű analízisnek alávetve megállapítottuk a főbb interneuronok poszt-szinaptikus hatékonyságát és megvizsgáltuk a légzési mintázatgenerálás korábban elfogadott sémájának érvényességét. Megállapítottuk, hogy a háromkomponensű mintázatgenerátorról korábban alkotott kép finomításra szorul. A légzési működéssel összefüggő fő hálózati esemény, az IP3 epizód a nagy dopamintartalmú RPeD1 neuron működésének felfüggesztésekor is bekövetkezik, tehát az RPeD1 nem inicializálja az IP3 ritmust. Hasonló a helyzet a peptiderg VD4 neuronnal, amelynek működése a

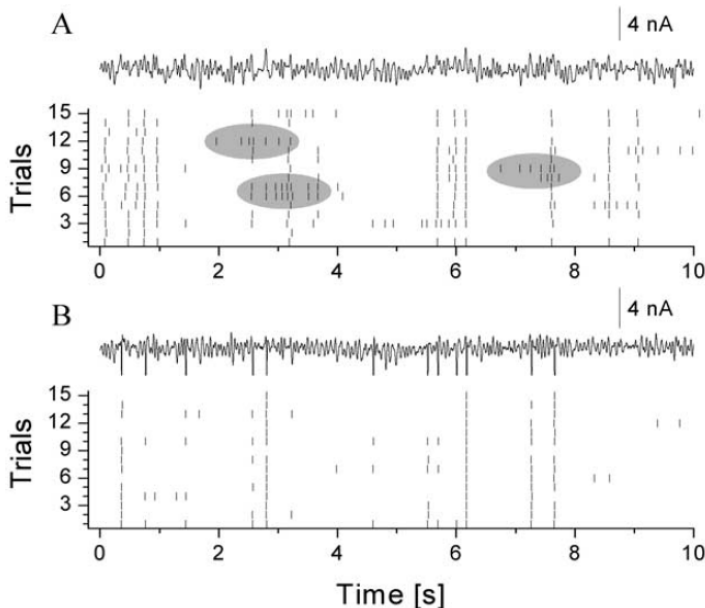


2. ábra. A baloldali és a középen látható hisztogramok az RPeD1 neuron közepes kisülési gyakoriságát mutatják az IP3 epizódokat megelőző néhány másodperces intervallumban. Baloldalt a spontán, középen a mintázat clamp kísérletben stimulált RPeD1 neuronok eloszlásai szerepelnek. A hisztogramok szerint a légsési epizódok gyakrabban fordulnak elő az RPeD1 szórványos tüzelése esetén (1 Hz alatt). Jobboldalt az IP3 burst-ök frekvenciáját ábrázoltuk az RPeD1 sejt kisülési frekvenciájának függvényében. Itt nem tapasztalható statisztikailag megalapozható összefüggés.

korábbi séma szerint a pneumosztóma zárását kezdeményezi. Ez a sejt meglepő módon csak csekély posztszinaptikus hatással bír a pneumosztóma izomzatot innerváló motoneuronokra. Az RPeD1-et használva bemenetként mintázat clamp kísérletekben megállapítottuk, hogy a légsési ritmus nem szinkronizálódik a dopamintartalmú sejt aktivitásával. A spontán tüzelési mintázatok elemzéséből pedig az derült ki, hogy az IP3 epizódok gyakorisága és az RPeD1 közepes aktivitásszintje egymással nincs korrelációban (2.ábra). Ezek az észlelések a légsési mintázatgenerátorról alkotott korábbi séma (Syed and Winlow, 1991) felülvizsgálatát, de legalábbis finomítását igénylik. Kísérleteink szerint az RPeD1 sejt sokkal inkább a légsési ritmus szenzoros kapuzásában vesz részt, mint a ritmus generálásában. Az IP3 sejt (vagy sejcsoport) valószínűleg intrinsic burst tulajdonságokkal rendelkezik és így önmagában is képes a légsési epizódok kiváltására. Ezeket az észleléseinket jelenleg készítjük elő folyóiratban történő publikálásra.

Lymnaea neuronok tüzelési tulajdonságai ismétlődő stimuláció alatt

A spontán tüzelési mintázatok és a neuronhálózat szinaptikus dinamikájának jellemzése mellett részletesen megvizsgáltuk az azonosított neuronok tüzelési válaszait zajszerű áram-hullámformák



3. ábra. Zajszerű hullámformákra adott válasz Lymnaea B2 neuronban. Az A panelen a közvetlen szomatikus áraminjekció hatása látható a stimulus 15 prezentálása után. A sejt endogén burst-ölése jól azonosítható spike-szekvenciákat eredményezett az idősorokban és ekkor a spike-ok megbízhatósága és időzítésük pontossága alacsony volt. A B panelen az elektrotónusos csatolás (konduktancia injektálás) hatása látható. Itt nagyon jól reprodukálható válaszokat kaptunk és a stimuláció lényegében leárnnyékolta a sejt endogén dinamikáját (Szücs et al., 2004).

hatására. A kiváltott akciós potenciálok időzítésének megbízhatóságát és precizitását vizsgáltuk és az intracellulárisan injektált aperiodikus, valamint szinuszos áram-hullámformák hatására. A válaszokat sejttípustól, valamint a neuronok intrinsic aktivitásától függően összehasonlítottuk. Megállapítottuk, hogy a szimulált, fluktuáló szinaptikus bemenetek hatása alatt a kardiorespiratorikus hálózat H- és J-sejtjei, valamint a bukkális rendszer B4, B4cl neuronjai pontosan reprodukálható spike-mintázatokat generáltak. Jellemeztük a spike válaszok megbízhatóságának és pontosságának frekvencia- és amplitudófüggését. A zajos hullámformák az elektrotonikus csatolás mellett váltották ki a legmegbízhatóbb válaszokat. Periodikus hullámformák (szinusz) vagy konstans áramlépcső injektálása nem eredményezett a sejtek spontán működésétől lényegesen eltérő tüzelési mintázatokat, míg a zajszerű stimuláció jól reprodukálható válaszokat eredményezett. A konduktancia injektálással (dinamikus clamp) kiváltott spike válaszok sokkal inkább a bemenő stimulusra, mint a sejt endogén működésére voltak jellemzők (3. ábra) (Szücs et al., 2004).

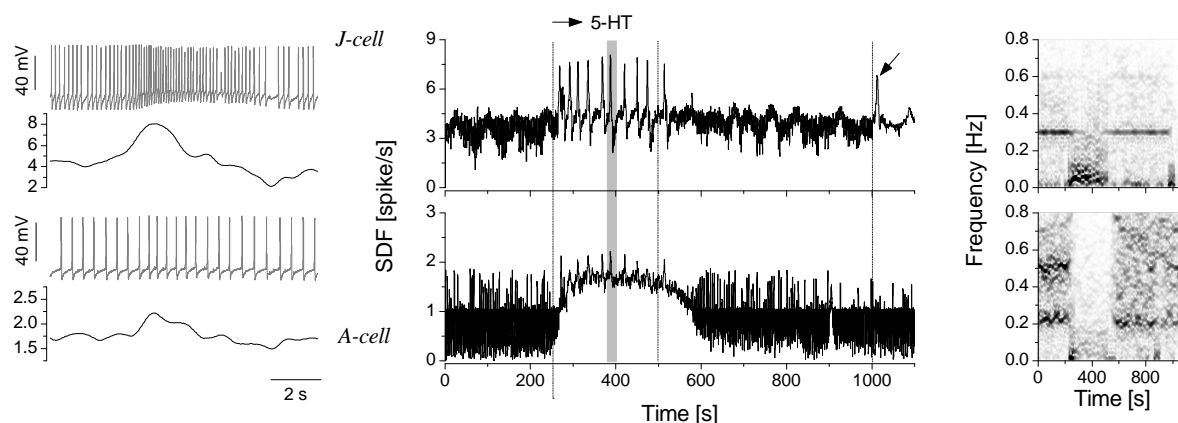
Mintázatszelektív viselkedés a kardiorespiratorikus hálózatban

Az aktivitás- illetve információfüggő plaszticitás tesztelésére gyakran alkalmaztunk időben lineáris módon emelkedő frekvenciájú oszcillációkat, amelyek érdekes, mintázatszelektív viselkedést tártak fel a H- és J-neuronokban. Ezekben a kísérletekben a nagy dopaminerg neuront úgy stimuláltuk, hogy annak spike denzitása egy növekvő frekvenciájú szinuszhullámot rajzoljon ki (konstans amplitudó és középérték). Eszerint a preszinaptikus neuron átlagos tüzelési frekvenciája (közepes aktivitásszintje) állandó volt, viszont annak időbeli szerkezete folyamatosan változott a protokoll alatt. A posztszinaptikus H- és J-neuronok erőteljes választ mutattak a bemenő szinuszfrekvencia 0.3 Hz körüli értékeinél, viszont ez alatt, illetve ennél magasabb frekvenciákon a hatás gyengült. Figyelemreméltó, hogy a kardiorespiratorikus hálózatban gyakran kimutatható egy spontán 0.3 Hz-es oszcilláció (IP2), amely független a légzési ritmustól és az RPeD1 vagy IP3 neuronok működésétől. A hálózat egyes elemei tehát preferálják az őket érő lassú, kb. 3 s periódusidejű szinaptikus oszcillációkat. Ez a frekvenciaszelektivitás valószínűleg nagy mértékben függ a H- és J-motoneuronok intrinsic membrántulajdonságaitól (Ca-áramok és Ca-aktiválta K-áramok mennyisége, kintikája). A mintázatszelektivitás (vagy rezonancia) jelen esetben nem társult a szinaptikus összeköttetések plasztikus változásaival, tehát ez a jelenség a hálózat architektúrájának és a sejtek belső tulajdonságainak következménye.

A neuronhálózat monoaminerg modulációja és újrászerveződése

Vizsgálataink következő részében neuromodulátorok applikálásával kombináltuk a neuronhálózat preszinaptikus stimulációját. Irodalmi adatokból ismeretes, hogy a monoaminok és főleg a szerotonin fontos szerepet töltenek be a sejt szintű tanulási mechanizmusokban és a hosszútávú memória kialakulásában. A mintázatfüggő plaszticitás és a neuromodulátorok lehetséges kölcsönhatásait így olyan kísérletekben tanulmányoztuk, ahol az időben struktúrált, oszcilláló jellegű tüzelési mintázatokat monoaminok alkalmazásával kombináltuk.

A 4. ábra mutat be egy ilyen kísérletet. Itt a nagy dopamintartalmú RPeD1 neuronban egy 0.3 Hz frekvenciájú (szinuszos) oszcillációt hoztunk létre, amely erőteljesen modulálta nagyszámú posztszinaptikus neuron, pl. a J-és H-sejtek működését. Ezen neuronok aktivitás mintázatában könnyen azonosítani lehetett a 0.3 Hz-es preszinaptikus oszcillációt, de ennek Fourier-amplitudója nem mutatott változást a hosszabb (egy órás) időskálán. Szerotonin extracelluláris alkalmazásakor a preszinaptikus oszcilláció lényegében eltűnt a posztszinaptikus sejtek idősorából, tehát azok mintegy funkcionálisan lekapcsolódtak az RPeD1 sejtről. Megállapítottuk, hogy a szerotonin preszinaptikus támadásponttal blokkolja a dopaminerg ingerületátvitelt ebben a rendszerben. Ilyen értelemben a dopaminerg RPeD1 neuron hatását a szerotonin teljesen fel tudja függeszteni a légzési hálózatban és ezáltal átkonfigurálja annak összeköttetéseit. Figyelemreméltó, hogy az RPeD1 sejt szerotonin-



4. ábra. Szerotonin alkalmazása mintázat clamp kísérletben. A középső két panel a J-és A-motoneuronok spike denzitás függvényeit mutatják be egy 1000 s hosszú kísérletben. Az RPeD1 sejten az elvezetés alatt egy 0.3 Hz frekvenciájú oszcillációt hoztunk létre. Ez a frekvencia kitűnően látszik a J-sejt spektrogramjában (jobb-felső panel), mielőtt a szerotonint applikáltuk (250 s-tól). 5-HT jelenlétében a preszeinaptikus oszcillációt jelző Fourier-csúcs eltűnik, viszont egy lassabb légzési ritmus épül fel. Ez nyilvánvalóan az IP3 bemenet aktiválódásának következménye. Kimosáskor a 0.3 Hz-es csúcs visszatér, vízszintes sávot rajzolva a spektrogramban. Az A-neuron hasonló ábrája nem mutat 0.3 Hz-es csúcsot, tehát az RPeD1 nem modulálja ennek a sejtnek a működését. Itt ugyanakkor jól látható egy 0.25 Hz frekvenciájú spontán hálózati oszcilláció hatása (IP2), amelyet a szerotonin szintén felfüggeszt. A baloldali két panel a J- és A-sejt idősorainak rövidebb részletét mutatják be, egy-egy IP3 epizódot a szerotonin alkalmazása alatt (membránpotenciál és spike denzitás).

indukálta kikapcsolása nem függesztette fel a légzési aktivitást, éppen ellenkezőleg, azt serkentette. A bemutatott példán kontroll körülmények között nem is tapasztaltunk IP3 aktivitást, míg 25 μM 5-HT alatt tipikus légzési ritmus jelentkezett. A szerotonin hatékonyan szabályozza az RPeD1 befolyását a posztzinaptikus neuronokra. További kísérleteink azt is megmutatták, hogy a szerotonin más szinaptikus bemeneteket is képes blokkolni (pl. Az IP2 eredetű spontán hálózati oszcillációt is eltörli), így a neuronhálózatot jelentős mértékben átkonfigurálja.

Dopaminnal és oktopaminnal hasonló kísérleteket végezve további sejt- és bemenetfüggő hatásokat tártunk fel, amelyek ismét a hálózat dinamikus újraszerveződését eredményezték. Az oktopamin a fő respirációs bemenet, az IP3 hatását gátolta egyes neuronokon, míg másokon azt lényegében változatlanul hagyta. A monoaminok tehát fontos szerepet játszanak a neuronhálózat dinamikus átkonfigurálásában, de hatásaik reverzibilisek az egy-két órás időskálán, tehát nem eredményeznek hosszútávú plasztikus változásokat a kémiai szinapszisokban. A monoaminokkal végzett kísérleteink eredményeit jelenleg készítjük elő publikálásra.

Változékonyság és konzisztencia kompakt neuronhálózatok azonosított elemein

A mintázatfüggő plaszticitás és hálózati dinamika témájához lazábban kapcsolódó és korábbi nemzetközi együttműködésünkben már megkezdett kísérletsorozatunkban arra az általános kérdésre kerestünk választ, hogy kompakt neuronhálózatok celluláris és szinaptikus elemei mekkora biofizikai változatosságot mutatnak ugyanazon állatfaj különböző elemein. A probléma iránt újabban élénk érdeklődés mutatkozik, mert modell szimulációk és molekuláris biológiai kísérletek is azt a hipotézist erősítik, hogy az identifikált neuronok biofizikai paraméterei nagyságrendi eltéréseket mutatnak különböző egyedek között (Prinz et al., 2004, Schulz et al., 2006). A hálózati dinamika (főleg mintázatgenerátorokban) konzisztens volta annak köszönhető, hogy az idegi szerveződés magasabb szintjein homeosztatikus szabályozás hangolja össze a sok neuronból álló hálózatok működését. Eszerint az egyes biofizikai paraméterek sejtenként és áramtípusként mért értékei ugyan nagy eltéréseket mutathatnak az egyedek között, de a mintázatgeneráló hálózat mégis jól reprodukálható működést mutat, mert a különböző paraméterekben meglévő eltérések mintegy kompenzálják egymást.

Kísérleteink, amelyeket a langusza pilorikus neuronhálózatának identifikált neuronjain végeztünk, nem erősítik meg ezt az elképzelést. A hálózat szinaptikus összeköttetéseinek farmakológiai manipulálása (pikrotoxinnal és atropinnal), valamint a sejtek feszültség-aktiválta áramainak részleges blokkolása (4-amidopiridinnel) nagyon jól reprodukálható válaszokat eredményezett a különböző preparátumokban (Szücs and Selverston, 2006). Eszerint a feltételezett homeosztatisz szabályozásnak képesnek kellene lennie a hálózat egészét érintő biofizikai változások ellensúlyozására is. A farmakológiai manipuláció azonban néhány perces időskálán már jól reprodukálható hatásokat eredményez, és véleményünk szerint valószínűbb, hogy a pilorikus hálózatban az egyes neuronok (és szinapszisok) biofizikai paraméterei szűk határok között változnak az egyedek között. Saját modell számításaink, amelyek a 4-aminopiridin hatást voltak hivatottak szimulálni, ugyancsak ezt az elképzelést támogatják (Nowotny et al., 2007). Megjegyezzük ugyanakkor, hogy a molluskákban a hálózati változatosság sokkal nagyobb mértékű, mind a tüzelési mintázatokat, mind az identifikált sejtek biofizikai tulajdonságait illetően – nagyrészen a neurohumorális hatások miatt.

Összefoglalás

Az általunk vizsgált molluska idegrendszer neuronhálózati kapcsolatai figyelemreméltóan modulálhatók és dinamikusan újrakonfigurálhatók a rendszert érő kémiai hírvivők függvényében, ugyanakkor csak kismértékű plaszticitást mutatnak abban az értelemben, hogy a pre- és posztzinaptikus neuronok milyen mértékű aktivitást mutatnak, vagy tüzelési mintázataik egymással hogyan korrelálnak. Kutatásaink valószínűsítik, hogy a *Lymnaea* idegrendszer a meglévő hálózati kapcsolatok kémiai újrakonfigurálását részesíti előnyben a Hebb-féle szinaptikus plaszticitás, vagy annak magasabb rendű formái helyett. Ezt saját, neuromodulátorokkal végzett kísérleteink mellett azok az észlelések is alátámasztani látszanak, amelyek szerint a *Lymnaea*-ban a jól azonosítható és régen leírt szinaptikus összeköttetések is jelentős spontán variabilitást mutatnak az egyedek között. Mindezek után rendkívül érdekes problémát jelent annak megértése, hogy hogyan képes az állat konzisztens viselkedést produkálni egy ilyen dinamikusan átszerveződő idegrendszer irányítása alatt.

Szücs Attila
témavezető

La Jolla, 2008. március 4.

Hivatkozott cikkek

- Nowotny, T., Szücs, A., Levi, R. and Selverston, A. I., 2007. Models wagging the dog: are circuits constructed with disparate parameters? *Neural Comput.* 19, 1985-2003.
- Nowotny, T., Szücs, A., Pinto, R. D. and Selverston, A. I., 2006. StdpC: a modern dynamic clamp. *J Neurosci Methods.* 158, 287-299.
- Pinto, R. D., Elson, R. C., Szücs, A., Rabinovich, M. I., Selverston, A. I. and Abarbanel, H. D., 2001. Extended dynamic clamp: controlling up to four neurons using a single desktop computer and interface. *J Neurosci Methods.* 108, 39-48.
- Prinz, A. A., Bucher, D. and Marder, E., 2004. Similar network activity from disparate circuit parameters. *Nature Neuroscience.* 7, 1345-1352.
- Schulz, D. J., Goaillard, J. M. and Marder, E., 2006. Variable channel expression in identified single and electrically coupled neurons in different animals. *Nat Neurosci.*
- Syed, N. I. and Winlow, W., 1991. Respiratory behavior in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. II. Neural elements of the central pattern generator (CPG). *J Comp Physiol A.* 169, 557-568.

- Szücs, A., 2007. Artificial synapses in neuronal networks. In: Lassau, J. A. (Ed.), Neural synapse research trends. Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, pp. (in press).
- Szücs, A., Rózsa, K. S. and Salánki, J., 1998. Presynaptic modulation of Lymnaea neurons evoked by computer-generated spike trains. Neuroreport. 9, 2737-2742.
- Szücs, A. and Selverston, A. I., 2006. Consistent dynamics suggests tight regulation of biophysical parameters in a small network of bursting neurons. J Neurobiol. 66, 1584-1601.
- Szücs, A., Vehovszky, Á., Molnár, G., Pinto, R. D. and Abarbanel, H. D., 2004. Reliability and precision of neural spike timing: simulation of spectrally broadband synaptic inputs. Neuroscience. 126, 1063-1073.

A jelen OTKA téma keretében nyert eredményeink egy része még nem jelent meg tudományos közleményben, de azokat a következő max. 2 év folyamán publikálni kívánjuk. Emiatt kérem, hogy a zárójelentésben foglaltak alapján született minősítést az OTKA kiegészítő eljárásban később módosítsa, figyelembe véve a később megjelent közleményeket.

Köszönettel:

Szücs Attila
témavezető