

**Mielinhüvely degradációt követő lipid törmelék eloszlás
vizsgálata a központi idegrendszerben CARS mikroszkópiával**

és

**Agykérgi neurogliaform sejthálózat által kiváltott ionotróp és
metabotróp gátló posztzinaptikus válaszok eltérő összegződése**

Doktori értekezési tézis

Ozsvár Attila

Témavezetők:

Dr. Tamás Gábor, Ph.D., D.Sc.

egyetemi tanár

Dr. Molnár Gábor Ph.D.

tudományos főmunkatárs

Szegedi Tudományegyetem

Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék

Biológia Doktori Iskola



2019

Szeged

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	1
Ábrajegyzék	3
Rövidítések jegyzéke.....	4
1. Bevezetés.....	7
1.1 Agykéreg felépítése	7
1.2 Mielinhüvely és demielinizáció	9
1.3 Demielinizáció vizsgálata.....	10
1.4 Az neokortikális hálózatok szerveződési elve	12
1.5 Neurogliaform interneuronok az agykéregben	15
1.6 Szinaptikus kapcsolatok kvantális paraméterei	17
1.7 GABAerg Ionotróp és metabotróp receptorok működése	19
1.8 Szinaptikus jelek összegződése	21
2. Célkitűzések	25
3. Közreműködések	27
4. Anyagok és módszerek.....	29
4.1 Agyszelet készítés.....	29
4.2 <i>In vitro</i> Elektrofiziológiai mérések és farmakológia	29
4.3 Hisztológia.....	31
4.4 Koponyaműtét	31
4.5 Két-foton Ca^{2+} képalkotás <i>in vivo</i>	32
4.6 Minta előkészítés immunohisztokémiához.....	33
4.7 Fluoreszcens immunohisztokémia és visszatérképezés.....	33
4.8 Adatkiértékelés	33
4.9 Statisztika.....	34
4.10 MCell modell konstrukció	34
4.11. Állatok cuprizon kezelése.....	37
4.12. Emberi Agyszövet előkészítése	37
4.13. Koherens anti-Stokes Raman szóródáson alapuló képalkotás.....	37
4.14. Time lapse képalkotás	38
4.15. Fluoreszcens jelölés	38
4.16. Felvételek kiértékelése	38

5. Eredmények.....	40
5.1.1. Lipid gazdag struktúrák megjelenítése CARS módszerrel	40
5.1.2. Demielinizáció detektálása cuprizon kezelt állatokban CARS képalkotással.....	42
5.1.3. Lipid tartalmú törmelék mennyiségének meghatározása mielinizált struktúrákban ..	45
5.2.1. Egyes neurogliaform sejt által alkotott gátló kapcsolatok funkcionális és strukturális paramétereinek jellemzése.....	48
5.2.2. Első rétegi neurogliaform sejthálózat által alkotott gátló kimenetek strukturális jellemzése	53
5.2.3. Az első rétegi neurogliaform sejt populáció összehangolt aktivációja szomatoszenzoros agykéregben <i>in vivo</i>	56
5.2.4. Neurogliaform sejtek által kiváltott konvergens IPSP-k összegződése.....	61
5.2.5. Neurogliaform sejtek által kiváltott konvergáló bemenetek kinetikájának farmakológiai vizsgálata.....	64
5.2.6. GABA _B receptor és GIRK csatorna komplex szubcelluláris elhelyezkedése befolyásolja a posztzinaptikus válaszok összegződését.....	67
6. Diszkusszió.....	72
6.1. CARS-on alapuló mikroszkópiás módszer alkalmazása lipid tartalmú struktúrák vizsgálatához	72
6.2. NGF sejthálózat által kialakított konvergáló gátló ionotróp és metabotróp jelek eltérő összegződése.....	74
7. Összefoglalás.....	79
7.1. Mielindegradációt követő lipid törmelék eloszlásának a vizsgálata a központi idegrendszerben	79
7.2. Agykérgi neurogliaform sejthálózat által kiváltott ionotróp és metabotróp gátló posztzinaptikus válaszok eltérő összegződése	80
8. Summary	84
8.1 Quantitative analysis of lipid debris accumulation caused by cuprizone induced myelin degradation in different CNS areas	84
8.2 Superficial neurogliaform cells activation leads to different summation of ionotropic and metabotropic GABA receptor mediated postsynaptic responses.....	85
9. Köszönetnyilvánítás	88
10. Irodalomjegyzék.....	89

Ábrajegyzék

1. ábra: Ramon y Cajal által készített rajz az agykéreg felépítéséről.....	8
2. ábra: Kétfoton abszorpció és CARS Jablowski-diagramja	12
3. ábra: Ionotróp GABA _A és metabotróp GABA _B receptor alapvető működésének valamint az intracelluláris molekuláris jelátviteli folyamatok sematikus áttekintése.....	21
4. ábra: Egér és emberi agyszövet lipid gazdag struktúráinak megjelenítése CARS mikroszkópiás módszerrel.....	41
5. ábra CARS jelintenzitáson alapuló lipid tartalom vizsgálat.....	42
6. ábra: Kontroll és kezelt csoport lipid tartalmának összehasonlítása CARS módszerrel.....	43
7. ábra: Mielinhüvely vastagságának a vizsgálata kontroll és kezelt állatokban	44
8. ábra: Lipid tartalmú törmelék előfordulása különböző agyterületeken	45
9. ábra: Mielin törmelék mennyiségének kvantifikálása mielinizált struktúrákban.....	46
10. ábra: NGF sejtről piramissejtre érkező gátló kapcsolat kvantális paramétereinek jellemzése	49
11. ábra: NGF sejtről piramissejtre érkező gátló kapcsolatok kvantális paraméterei	50
12. ábra: Anatómiai és funkcionális felszabadulási helyek mennyiségének összehasonlítása	51
13. ábra: Anatómiai és funkcionális felszabadulási helyek mennyisége a távolság függvényében	52
14. ábra: Egyetlen neurogliaform sejt átlagos axon eloszlásának a meghatározása	54
15. ábra: Első rétegi neurogliaform sejt-hálózat kimenetének térbeli modellje	56
16. ábra: Első rétegi interneuronok aktivitásának a vizsgálata in vivo	57
17. ábra: Az első rétegi interneuron populáció összehangolt aktivációja szomatoszenzoros agykéregben in vivo	58
18. ábra: Első rétegi neurogliaform sejtek visszatérképezése	60
19. ábra: Neurogliaform sejtek által kiváltott konvergens bifázikus GABA _A és GABA _B komponens tartalmazó IPSP-k összegződése.....	62
20. ábra Neurogliaform sejtek által kiváltott konvergens kizárólag GABA _B komponens tartalmazó IPSP-k összegződése	63
21. ábra GABA _B receptor jelek összegződése nem függ a HCN1 csatorna aktivitásától és a GABA visszavételtől.....	66
22. ábra: GABA _B receptor és GIRK csatorna komplex szubcelluláris kompozíciójának modellezése	68
23. ábra: A szimuláció során lezajló molekuláris interakciók összefoglalása növekvő GABA felszabadulás során.....	70
24. ábra Szimulációban részt vevő molekulák normalizált értékei növekvő GABA felszabadulás során.....	71

Rövidítések jegyzéke

[Ca²⁺]	Ca ²⁺ koncentráció
[Mg²⁺]	Mg ²⁺ koncentráció
ACSF	Mesterséges cerebrospinális folyadék
AMPA	2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il)propánsav
AP	Akciós potenciál
A.U.	Arbitrary unit- tetszőleges egység
BAPTA	1,2-bisz(o-aminofenoxi)etán-N,N',N'-tetraecetsav, kalcium kelátor
BQA	Bayesian kvantális analízis
CA	Anterior komisszura
CARS	Koherens anti-Stokes Raman szóródás
Ca_v	Feszültségfüggő Ca ²⁺ csatorna
CB	Cerebellum, kisagy
CC	Corpus callosum, kérgestest
CPZ	cuprizon
Ctrl	kontroll
D-AP-5	(2R)-Amino-5-foszfonovaleriánsav, NMDA receptor antagonist
DIC	Infravörös differenciál interferencia kontraszt videómikroszkópia
EAE	kísérletes autoimmun encephalomyelitis
EPSP	Serkentő szinaptikus potenciál
Ffhsz	Funcionális felszabadulási helyek száma
FM	Forceps minor, kérgestest laterális területe
GABA	Gamma-amino-vajsav
GAT-1	GABA transzporter

GDP	Guanozin-5'-[β -tio]difoszfát
GIRK	G-fehérjéhez kapcsolt befelé egyenirányító káliumcsatorna
GM	Szürkeállomány
GTP	Guanozin-trifoszfát
HCN	Hiperpolarizáció-aktivált ciklikus-nukleotid által kapuzott csatorna
IPSC	Gátló posztszinaptikus áram
IPSP	Gátló posztszinaptikus potenciál
KIR	Befelé egyenirányító káliumcsatorna
K-S próba	Kolmogorov-Szmirnov-próba
MPFA	Több valószínűségi fluktuációs analízis
MW U próba	Mann Whitney U próba
NBQX	2,3-dihidroxi-6-nitro-7-szulfamoil-benzo[f]quinoxalin-2,3-dion, AMPA receptor antagonist
NDNF	Neuron-derived neurotrophic factor
NGF	Neurogliaform
NMDA	N-metil-D-aszparaginsav, NMDA receptor agonista
nNos	Neuronális nitrogén oxid szintáz
NO-711	1-[2-[[[(difenilmetilén)imino]oxi]etil]-1,2,5,6-tetrahidro-3-piridinkarbonsav-hidroklorid, GABA transzporter gátló
NPY	Neuropeptid Y
OGB-1 AM	Oregon Green BAPTA (acetyl-oxi) -metil-észter
PB	Foszfátpuffer
Pr	Valószínűség
PSP	Posztszinaptikus potenciál
q	Kvantális méret

ROS	reaktív oxigéngyök
Rs	Elektromos soros ellenállás
SD	Standard deviáció
SM	Sclerosis multiplex
TBS	Tris-puffer oldat
VGCC	Feszültség-kapuzott Ca^{2+} csatorna
ZD 7288	4-etil-fenil-amino-1,2-dimetil-6-metil-amino-pirimidinium-klorid, HCN1 csatorna gátló

1. Bevezetés

Doktori disszertációmban kettő egymástól független kutatási témával foglalkozok:

1. Egy újonnan fejlesztett koherens anti-Stokes Raman szóródáson (CARS) alapuló mikroszkóprendszer implementálását végeztem agyszeletekre. A mikroszkóprendszerrel a mielinhüvely degradációjának folyamatát vizsgáltuk.
2. Agykérgi neurogliaform sejhálózat által kiváltott konvergáló ionotróp és metabotróp gátló jelek integrációját a vizsgáltuk.

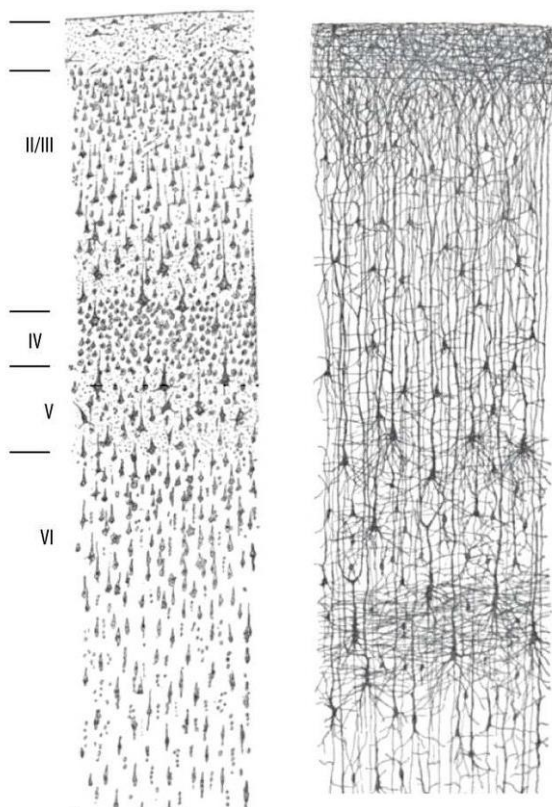
1.1 Agykéreg felépítése

Az agy mai napig intenzíven kutatott, legbonyolultabb biológiai struktúra. Felépítése és komplexitása alapján vitathatatlanul az evolúciós fejlődés csúcsát képezi. Az emberi agy a testtömeg mindössze 2%-át adja, de ezt a kb. 1,3 kg tömegű struktúrát megközelítőleg $8,6 \cdot 10^{10}$ idegsejt és $8,4 \cdot 10^{10}$ gliasejt alkotja (Azevedo et al. 2009), a neuronok egymás között 10^{12} - 10^{14} számú szinaptikus kapcsolatot alakítanak ki (Tang et al. 2001). Az agy felszínét a réteges szerkezetű agykéreg alkotja, amely rágszálókban 1-2 mm, magasabb rendű emlősökben 3 mm vastagságú. A magasabb rendű emlősökben az agyfelszín szembetűnő jellegzetessége a tekervényezettsége, amely például rágszálók túlnyomó többségében nem figyelhető meg.

Az agykérget filogenetikailag 2 csoportba sorolhatjuk:

- (1) Allocortex - törzsfejlődés szempontjából ősi, evolúciósan konzervált része az agykéregnek, amelynek kevesebb, mint 5%-át foglalja el. Három részből épül fel: paleocortex, archicortex és periallocortex. A paleocortex az agy ventrolaterális részén helyezkedik el és a szaginger feldolgozásáért felelős szagló kérget alkotja. Réteges felépítésű, 3 sejtréteg alkotja. Az Archicortex szintén réteges felépítésű, 3 sejtréteg alkotja és magába foglalja a hippocampust és a dentate gyrust, amelyek az epizodikus memória kialakulásakor és a térbeli tájékozódás során nélkülözhetetlenek. A periallocortex egy átmeneti struktúra az allocortex és a neocortex között. A periallocortexhez tartozik az entorinális kéreg, a presubiculum, a parasubiculum, a retrosplenialis kéreg, a perirhinális kéreg, a subcallosális és a subgenuális területek.
- (2) Neokortex – a törzsfejlődés során a legkésőbb kialakult része az agykéregnek, amelynek mintegy 95%-át foglalja el. Hat sejtréteg alkotja (**1.ábra**), amelyek agykéreg felszínétől a mélyebb agyi rétegek irányába haladva a következők:

- I. réteg az ún. *molekuláris réteg* kevés sejttestet tartalmaz, és az itt található idegsejtek kivétel nélkül mind gátló interneuronok. Az interneuronokon kívül, mélyebb rétegekben elhelyezkedő piramissejtektől származó apikális dendritok, valamint távoli agyterületekről származó projekciós afferens axonok is megtalálhatóak.
- II. réteg, az ún. *külső szemcsés réteg*, amelyben többnyire piramissejtek valamint interneuronok találhatóak.
- III. réteg, *külső piramis sejtréteg*. Szintén piramissejtek valamint interneuronok alkotják. A lokális piramissejtek jellemzően koritko-kortikális kapcsolatokat létesítenek.
- IV. réteg, *belső szemcsés réteg*. Piramissejtek, csillagsejtek és helyi interneuronok alkotják. Jelentős mennyiségű talamo-kortikális és inra-hemiszfériális kortiko-kortikális bemenet érkezik ide.
- V. réteg, *belső piramissejt réteg*. Piramissejtek és interneuronok alkotják ezt a réteget.
- VI. réteg, *plexiform réteg*. Az itt levő piramissejtek mellett, orsó formájú piramissejtek, interneuronok és multiform idegsejtek találhatóak.



1. ábra: Ramon y Cajal által készített rajz az agykéreg felépítéséről

Balra: Nissl-festési eljárás után készített mikroszkópos felvétel felnőtt emberi motoros agykéregről. Baloldalt, a réteghatárok római számmal vannak jelölve. Jobbra: Golgi-festési eljárással láthatóvá tett idegsejtek, újszülött, egyhónapos emberi agykéregből (Cajal 1899).

1.2 Mielinhüvely és demielinizáció

A mielinhüvely az idegrostokra spirálisan feltekeredett, kiterjedt, módosult plazmamembrán. Kettő glia sejttípus felelős a mielinhüvely kialakításáért: (1) a perifériás idegrendszerben a Schwann-sejtek, (2) míg a központi idegrendszerbe az oligodendrociták alkotják. Az axon mentén a mielinizált szakaszok periodikusan fordulnak elő. A mielinizált szegmensek között található mielinhüvely hiányosságot Ranvier-befűződéseknek nevezzük, Ezek a befűződések lehetővé teszik az axonban a szaltatorikus ingerületvezetést, amellyel sokkal gyorsabb ingerületvezetés érhető el, összehasonlítva a nem-mielinizált rostokon történő vezetéssel. Összetételét tekintve a mielin 40%-ban vizet tartalmaz, illetve szárazanyag tartalma 70-85%-ban lipid, 30-15%-a fehérje (Morell and Richard H 1999).

Egyes neurodegeneratív betegségekre, mint pl. a sclerosis multiplex (SM), az oligodendrociták szelektív károsodása jellemző. A betegség során a szürke és fehér állomány mielinizált rostjai egyaránt károsodnak. Az előrehaladott károsodás során a tünetek szinte minden betegnél másképp jelentkeznek. A leggyakoribb panaszok: végtaggyengeség, mozgási nehézség, fáradékonyság, végtagremegés, egyensúly zavaros, stb. (Hemmer, Archelos, and Hartung 2002; Trapp and Nave 2008). A legtöbb esetben a betegség tüneteinek súlyosbodó és javuló szakaszainak a váltakozása figyelhető meg, amely során progresszíven egyre rosszabb állapotba kerül a beteg. A SM során demielinizáció és gyulladásos folyamatok mennek végbe. A mielinhüvely kritikus szerepet játszik a megfelelő ingerületvezetés kialakításában. A mielin károsodásakor romlik elektromos jeltovábbítás (Bando et al. 2008; Hamada and Kole 2015), amely idővel axon-, később neurodegenerációhoz vezet (Huizinga et al. 2012; Kuhlmann et al. 2002), viszont ezeknek a folyamatoknak a pontos patomechanizmusa mai napig nem teljesen tisztázott. A legnépszerűbb elmélet szerint a SM autoimmun eredetű betegség: az immunrendszer hibás működésének következtében autoreaktív T-sejtek jelennek meg a központi idegrendszerben, amelynek hatására pedig mikroglia és makrofágok támadják meg a mielinhüvelyt, így szelektív oligodendrocita pusztulást idéznek elő (Frohman, Racke, and Raine 2006; Kornek and Lassmann 2003; Stadelmann, Wegner, and Brück 2011). Ezzel az elméletben összhangban, jelenleg a SM betegség leghatásosabb kezelési módjainak az alapja a gyulladás csökkentés és immunszuppresszáció. A SM kiváltó okai jelenleg ismeretlenek, de egyes vélemények szerint bizonyos környezeti tényezők- például vírusfertőzés, genetikai hajlam, nem, illetve az életmód együttesen hatással lehetnek a betegség kialakulására (Sawcer et al. 2011). Egyes esetekben, a betegség korai szakaszában a limfociták beáramlásának a hiányát tapasztalták, amely az eddig elméletekkel szemben alternatív

hipotézist kínál a betegség kialakulásával kapcsolatban (Barnett and Prineas 2004). Ezek alapján feltételezhető, hogy az oligodendrocita pusztulás a betegség kialakulásának forrása, ezt követően pedig a felszabadult mielin törmelék hatására jelentkezik az immunválasz és a későbbi gyulladásos folyamatok (Clarner et al. 2012; Stys et al. 2012; Traka et al. 2016).

A demielinizációval járó neurodegeneratív betegségek vizsgálatának egyik elterjedt módja az állatmodellek vizsgálata. A legszélesebb körben használt modell a SM betegség vizsgálatára a kísérletes autoimmun encephalomyelitis (EAE) (Merrill 2009; Ransohoff 2012). EAE során, összhangban az autoimmun eredetű hipotézissel, antigénként immunizáláskor egy oligodendrocitára jellemző fehérjét vagy annak egy szakaszát használják. Ezen felül az állatmodellekben genetikai módosítás, vírus vagy kémiai anyag által is kiváltható demielinizáció. A demielinizáció kiváltására széles körben használt kémiai anyag a cuprizon. Ebben a modellben a rézkelátor, cuprizon hatására oligodendrocita apoptózis és multifokális demielinizáció alakul ki az agy különböző területein, elsősorban a erősen mielinizált rostokon, mint pl. a kergestest. Ennek háttérben mitokondriális patológia áll, mivel a cuprizon kezelés hatására az oligodendrocitákban a mitokondriális légzési lánc különböző komplexeinek csökkent működése és a reaktív oxigéngyökök (ROS) fokozott termelése mutatható ki (Acs and Kalman 2012; Gudi et al. 2009; Kipp et al. 2009; Matsushima and Morell 2001). Ezen folyamatok hatására az oligodendrociták pusztulása és mielin lebomlás megy végbe, aminek eredményeként lipid tartalmú törmelék halmozódik fel az agyszövetben.

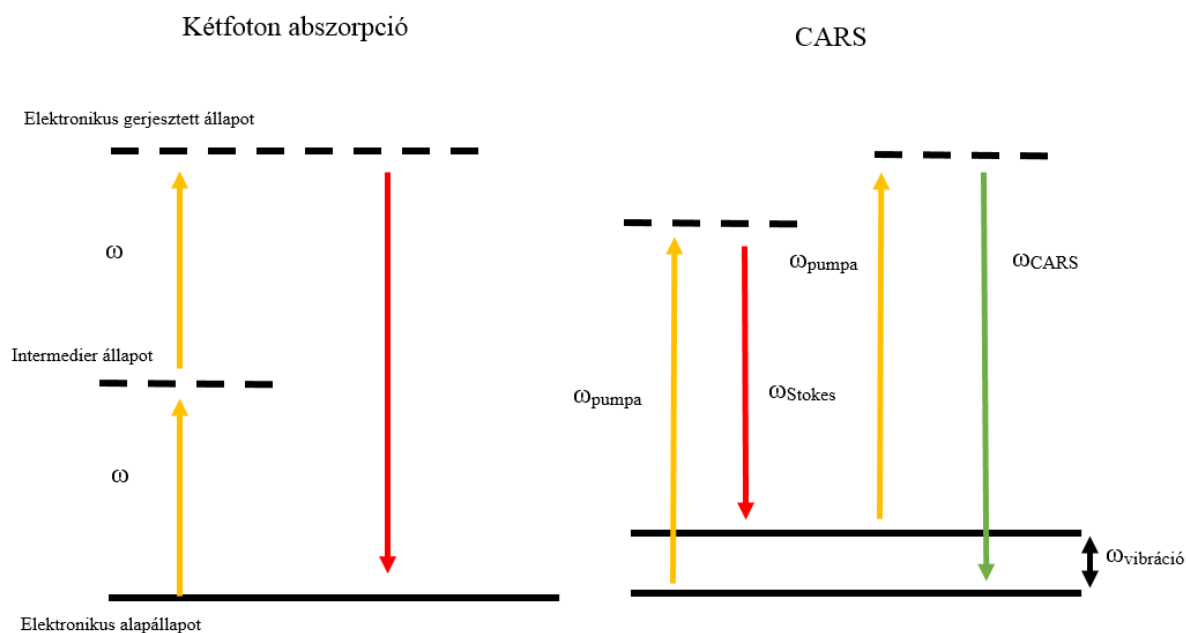
1.3 Demielinizáció vizsgálata

A demielinizáció diagnosztikai célú kimutatására jellemzően a klinikumban számítógépes tomográfia (CT) és mágneses rezonancia képalkotó (MRI) módszereket használnak. Ezekkel a módszerekkel a betegség előrehaladottabb stádiumában a demielinizációs gócok detektálhatóvá válnak a fehérállományban, viszont a betegség kezdeti stádiumában a diagnosztika nem lehetséges kizárólag ezekkel a módszerekkel.

Kutatások során a demielinizáció folyamatát jellemzően indirekt módszerekkel vizsgálják, mint pl. bizonyos gliális fehérjék immunhisztokémiai jelölése. Illetve direkt vizsgálati módszerek az elektronmikroszkópos tanulmányok tekinthetőek. Azonban ezen technikák számos hátránnyal járnak. Ezeket a vizsgálatokat élő szöveten nem lehet elvégezni, jellemzően hosszadalmas, több napon át tartó mintakezelési eljárásokat kell alkalmazni, amik során kémiai anyagok használatával a minta károsodhat.

A felmerült problémákra azonban a nemlineáris optikai elven működő két-foton abszorpciós fluoreszcencia mikroszkópiai használata megoldást nyújt. A nemlineáris optika az optikának az a területe, amely a fény terjedését, nemlineáris kölcsönhatását írja le optikai közegben, ami tipikusan nagy fényintenzitások esetén érzékelhető és mérhető. Ebben az esetben az optikai közeg polarizáltsága nemlineárisan függ a fény elektromos terétől. Az impulzusüzemű lézerek esetén a lézer energiája kis csomagokba, impulzusokba koncentrálódik, ezért ilyen lézerekben tapasztalható a nemlineáris jelenség. Számos nemlineáris optikai folyamat alkalmas élő minták vizsgálatára, mint pl. a két-foton abszorpciós fluoreszcencia, másodharmonikus (SHG) vagy a koherens anti-Stokes Raman szórás (CARS). A két-foton fluoreszcencia mérés nagy előnye abban rejlik, hogy a gerjesztő fényforrás csak $\sim 0,3 \mu\text{m}$ átmérőjű, 0,1 femtoliter térfogatú fókuszpontban hozza létre az anyag két-foton gerjesztéséhez szükséges energiamennyiséget, jellemzően pikó szekundumos intervallumban. Ezzel a módszerrel a fókuszponton kívül nem történik energiaközlés, így a nagy energia által történő sejtkárosító hatás nem jellemző. A kétfoton effektus kialakulása során az egyszerre két azonos energiájú foton nyelődik el a gerjesztendő molekulában, így energiájuk összeadódik (**2. ábra**).

A CARS folyamat egy négyhullám-keveréses módszer, amely lejátszódásához két eltérő frekvenciájú lézer nyaláb elektromágneses tere hat kölcsön egymással: az ún. pumpa lézer (ω_p) és egy ún. Stokes nyaláb (ω_s). A két lézernyaláb frekvenciája meghatározott annak érdekében, hogy a különbségük ($\omega_p - \omega_s$) megegyezzen a gerjesztetni kívánt molekulakötés belső rezgési energiájának a frekvenciájával ($\omega_{\text{vibráció}}$). A pumpa lézer a molekulát egy virtuális gerjesztési állapotba viszi, míg a kisebb energiájú Stokes lézer hatására a molekula elhagyja a gerjesztett állapotot. Ennek a kettős megvilágításnak a következtében az alapállapothoz közeli gerjesztett állapotba kerül a molekulakötés belső rezgési energiája. Ezt követően az ismételt pumpa lézer egy újabb, magasabb virtuális gerjesztési állapotra juttatja a molekulát. Végül a kívánt molekula erről a virtuális energia színről az alapállapotra kerül vissza miközben energia szabadul fel, amely nagyobb mint a pumpa nyaláb energiája ($\omega_{\text{CARS}} = 2\omega_p - \omega_s$). Ez ehhez köthető frekvenciát nevezzük anti-Stokes frekvenciának (ω_{CARS}) (**2. ábra**).



2. ábra: Kétfoton abszorpció és CARS Jablowski-diagramja

A konfokális mikroszkópia és multi-foton fluoreszcens lézer pásztázáson alapuló technikák a biológiai struktúrákáról kizárólag akkor képesek képet alkotni, amennyiben a vizsgálni kívánt struktúra autofluoreszcenciával rendelkezik, vagy fluoreszcensen van megjelölve. A fluoreszcens festési eljárások elvégzése gyakran időigényes, drága és mivel kémiai reakciókon alapulnak ezek az eljárások, ezért maga a festési folyamat módosíthatja a biológiai struktúrát. Ezek a fluoreszcens festékek idővel elveszíthetik intenzitásukat, élő szöveten való használatuk pedig fototoxicitást is eredményezhet. A CARS mikroszkópián alapuló módszer kémiai jelölő anyagok nélkül biztosít kémiai szelektivitást, ezért a biológiai mintát a vizsgálat nem módosítja, és károsító hatás nélkül lehet vizsgálni az élő szövetet.

1.4 Az neokortikális hálózatok szerveződési elve

A neokortex kritikus szerepet játszik a magasabb rendű kognitív funkciók kivitelezésében, úgymint a szenzoros bemenetek feldolgozása, asszociatív gondolkodás, memória, motoros parancsok kialakítása a tudat (Eric R. Kandel, James H. Schwartz, Thomas M. Jessell, Steven A. Siegelbaum 2013). Ezeknek a feladatoknak a végrehajtásához a neokortikális hálózat komplex működésére van szükség. A legelső agykérgen végzett anatómiai vizsgálatok Santiago Ramón y Cajal, spanyol idegtudós és patológus nevéhez fűződnek, aki Camillo Golgi, olasz kollegája által kidolgozott ezüst impregnációs festési eljárás használatával az idegsejtek finom anatómiai szerkezetét vizsgálta az 1800-as évek végén (1. ábra). Az idegrendszer szisztematikus feltérképezése során mai szemmel is impozáns illusztrációkat készített, ezzel jól

definiálva az idegsejtek anatómiai struktúráját (Cajal 1899). Cajal számos akkoriban idegsejteken végzett morfológiai vizsgálata és megfigyelése, valamint a belőlük levont következtetése még ma is helytálló.

Az neocortexben lejátszódó információfeldolgozás két nagy neuron csoport által alkotott dinamikus mikrohálózat által meghatározott. Az egyik nagy csoportot a serkentő glutamaterg idegsejtek, az úgynevezett principális piramissejtek alkotják. Jellemző rájuk, hogy nagy számban vannak jelen, az agykérgi idegsejtek 85-90%-át a piramissejtek alkotják. A piramissejtek egy háromszög formájú sejttestből, több dendritből és egy sűrűn elágazó axonból állnak. Egy tipikus piramissejt felépítését tekintve a sejttest, ún. szóma csúcsából radiális irányba egyetlen apikális dendrittel rendelkeznek, amely néhány száz mikrométerre a szómától elágazik és egészen a legfelső agykérgi rétegekben végződik. A szóma alapjából több elágazó bazális dendrit ered laterális irányba. A dendritek mentén több ezer szinaptikus kapcsolat létesül más idegsejtekkel, így tekinthetünk rá úgy, mint az idegsejt bemeneti egységére. A szóma alapjából egyetlen axon ered, amely gyakran a dendriteknél sokkal hosszabb és többször elágazhat, így axon kollaterálisokat kialakítva. Az axon, mint kimeneti alegység, képes a szóma és dendritek által integrált információt továbbjuttatni a célsejtekhez.

A piramissejtek többnyire egységes felépítést követnek, azonban némi variancia figyelhető meg a lamináris elhelyezkedésük függvényében. A piramissejtek az axonon elhelyezkedő preszinaptikus terminálisokból glutamát neurotranszmitter tartalmú vezikulák felszabadításával képesek serkentő posztzinaptikus potenciált (EPSP) kiváltani a posztzinaptikus célsejten. Serkentő mivoltukból adódóan a piramissejtek feladata, hogy a jel terjedését biztosítsák az információfeldolgozás különböző állomásain.

Másik nagy csoportot a gátló GABAerg interneuronok alkotják, amelyek sokkal kisebb számban, a sejtek mintegy 10-15%-át alkotják az agykéregben (Meyer et al. 2011). Szerepük fontos az idegrendszeri jelek áramlásának szabályzásában és az idegrendszer dinamikus hálózati szintű működésének formálásában. A hatékony jelfeldolgozás érdekében a serkentő jeleknek változatos szabályozása szükséges, amelyről az agykéregben található rendkívül diverz interneuron populáció gondoskodik. Anatómiai szempontok alapján az agykérgi interneuron csoportok rendkívül sokszínű szomatikus, dendritikus és axon morfológiával rendelkeznek. A jellegzetes axon morfológiájuk határozza meg, hogy egyes célsejteknek melyik szubcelluláris alegységét célozzák meg, amely alapján karakterisztikus interneuron csoportokat lehet definiálni. A kosársejt az axonterminálisaival például a piramissejtek periszomatikus régióját öleli körbe, amely kosárra emlékeztető struktúrát alakot. Egy másik jellegzetes axon

struktúrával rendelkező interneuron az axo-axonikus sejt, vagy kandeláber sejt, amely a nevét a piramissejt axon iniciális szegmentumán végződő kandeláberre emlékeztető axonterminálisairól kapta. A piramissejtek dendrit szakaszának a gátlása több interneuron között oszlik meg: a kettős csokor sejt, Martinotti sejt és a neurogliaform sejt. A specifikus morfológia által az egyes interneuron csoportoknak szigorúan meghatározottá válik a be- és kimenő kapcsolataik, így elrendelt az idegrendszeri hálózatokban betöltött szerepük.

Elektrofiziológiai szempontból is nagy változatosság jellemző az interneuron csoportok aktív és passzív membrán biofizikai tulajdonságaira, ami az egyedi membrán ioncsatorna kompozícióra vezethető vissza. Az egyes interneuron típusok karakterisztikus elektromos tulajdonságaik alapján is definiálhatóak. Az úgynevezett gyorsan tüzelő interneuronok beinjektált áramlépcső hatására magas frekvencián képesek akciós potenciálokat generálni, amely főleg a kosársejtekre és az axo-axonikus sejtekre jellemző. Ezzel szemben, a Martinotti sejt esetében például sokkal lassabb, adaptálódó frekvenciájú akciós potenciál generálódás figyelhető meg, a magasabb frekvenciájú burst-aktivitás kíséretében beinjektált áramimpulzus elején. Továbbá, a passzív membrán tulajdonsága is jellegzetes, mivel a hiperpolarizáló áramimpulzusra adott feszültségválaszukban megjelenik ún. sag potenciál.

Az egyes szinaptikus kapcsolatok hatékonysága, kinetikája is sajátos az egyes interneuron csoportokra. Ezen kapcsolatok diverzitásának kialakításában például az egyedi GABA receptor alegység kompozíció alapvető szerepet játszik (Ali and Thomson 2008; Freund 2003), ezzel meghatározva a gátló kapcsolatok hatékonyságát a célsejten. Továbbá, az egyes interneuron csoportok működése eltérően modulálódik az egyes neuromodulátor neurotranszmitterek, mint például dopamin, acetilkolin, vagy a szerotonin hatására. Ennek eredményeként az agykérgi hálózatok működése is dinamikusan változik a környezet, illetve az eltérő agyi állapotok függvényében (Y Kawaguchi and Kubota 1998; Poorthuis, Enke, and Letzkus 2014; Towers and Hestrin 2008).

A morfológiai és elektrofiziológiai jellemzők mellett fontos molekuláris különbségek is megfigyelhetők az egyes interneuron csoportok között. Ezek a molekulák lehetnek transzkripciós faktorok, neurotranszmitterek vagy azokat szintetizáló enzimek, receptorok, neuropeptidek, Ca^{2+} -kötő fehérjék, strukturális proteinek, ioncsatornák vagy membrántranszporterek. Molekuláris szempontból az interneuronokat több nagyobb, nem átfedő csoportba lehet sorolni: parvalbumin (PV) pozitív interneuronok közé a periszomatikus és az axoninicializációs régiót innerváló kosársejtek és kandelábersejtek tartoznak (Defelipe et al. 1999; Inda, DeFelipe, and Muñoz 2009), szomatosztatin (SOM) -pozitív interneuronok főleg

az apikális dendrit szakaszokat célozzák, míg a 5-HT_{3A} receptort expresszáló interneuronok heterogén csoportot alkotnak a vazóaktív intestinalis peptidet (VIP) expresszióinak a megléte alapján, amelyek elsősorban dendrit disztális végződéseket célozzák (Rudy et al. 2011).

Molekuláris-, morfológiai- és elektrofiziológiai modalitások alapján jól elkülönülnek az egyes interneuron csoportok, így funkcionálisan is vizsgálható és elkülöníthető osztályokat alkotnak, amelyek alapján az utóbbi évtizedek egyik népszerű kérdésköre lett a különböző interneuron csoportok definiálásának módja (Ascoli et al. 2008; Yasuo Kawaguchi and Kubota 1997; Markram et al. 2004; Rudy et al. 2011; Tasic et al. 2016).

Mindezek a példák arra a megállapításra világítanak rá, hogy az agykérgi neuronális hálózatok megfelelő szintű szabályzásának szempontjából a kis számban reprezentált interneuronok diverz szerveződése szükséges.

1.5 Neurogliaform interneuronok az agykéregben

1899-ben Santiago Ramón y Cajal egy rövid axonnal rendelkező sejtípust figyelt meg emberből származó motoros agykérgi agyszövetben. A megfigyelt sejt apró sejttesttel rendelkezett és rövid, már-már csökevényes dendritekkel. Rövid nyúlványai miatt, első ránézésre könnyen összetéveszthető egy asztrogliaával, azonban alaposabb szemügyre vételét követően a vékony axon nyúlványok jelenléte is feltűnt. Az axon a szómából kiindulva rövidesen sűrűn elágazott, így létrehozva egy dús axon hálózatot. A jellegzetes axon morfológiájú sejtet több agykérgi területen és rétegben is megfigyelte. A megfigyelt sejtet törpesejt, pókhálósejt, arachniform, illetve neurogliaform sejt néven emlegetik.

Későbbi kutatások során a neurogliaform sejtet központi idegrendszer több különböző részén figyelték meg: patkány striátumban (Kemper, Pasquier, and Drazen 1978), laterális szaglópálya magjában (McDonald 1983), prefrontális mediális (Gabbott et al. 1997) és frontális kéregben (Yasuo Kawaguchi and Kubota 1997), oposszum bazolaterális amigdalában (McDonald and Culberson 1981), macska és kutya agykéregben (Ferrer, Fabregues, and Condom 1986), rézus majom vizuális (Werner et al. 1989) és laterális enthorinális kéregben (Carboni et al. 1990), makákó prefrontális kéregben (Lund and Lewis 1993) és emberi motoros és prefrontális kéregben (Ferrer, Fabregues, and Condom 1986; Kalinichenko, Pushchin, and Dyuzen 2006; Kisvárdy et al. 1990; Oláh et al. 2009; Uylings and Delalle 1997).

Az agykéregben a gátló interneuronok teljes mennyiségének hozzávetőleg 20%-a neurogliaform sejt (Schuman et al. 2018; Wozny and Williams 2011). Morfológiájukat tekintve 10-20 µm átmérőjű kerek szómával rendelkeznek. A szómából kiinduló multipoláris dendritek

rövidék és hamar elágaznak. A sűrű axon arborizáció túlnyomóan a szomatodendritikus elhelyezkedést követi, térben szorosan egymáshoz közel helyezkednek el. Egy-egy axon nyúlvány a szómától számítva 1000 μm távolságig is elnyúlhat, azonban az axon a szóma körül $\sim 100\text{-}150$ μm távolságra koncentrálódik és teljes hossza ~ 20000 μm is lehet. Az ilyen szintű axon sűrűség egyedülálló az interneuronok között. Mindazonáltal, hogy a neurogliaform sejt axonjának a térbeli kiterjedése kis területre korlátozott, a preszinaptikus bouton sűrűsége a legnagyobb az interneuronok között. Átlagosan számítva 100 μm axonszakaszon ~ 30 preszinaptikus bouton található (ez ~ 3 μm egymást követő boutonok közötti távolságot jelent). A parvalbumin pozitív kosársejtekhez viszonyítva a neurogliaform sejteken 5-6-szor sűrűbb a preszinaptikus boutonok eloszlása (Oláh et al. 2009).

Molekuláris jellemzőit tekintve az agykérgi neurogliaform sejtek neuropeptid y (NPY), reelin, α -aktinin2, 5-HT_{3A} receptor, neuronális nitrogén-monoxid szintáz (nNOS) immun pozitivitást mutatnak (David et al. 2009; De Marco García et al. 2015; Rudy et al. 2011; Schuman et al. 2018; Uematsu et al. 2008).

Az utóbbi évtizedekben számos tanulmányban foglalkoztak az egyes agykérgi interneuron típusok kimenetének vizsgálatával. Többszörös patch clamp elvezetésekkel sikerül azonosítani egyes interneuron csoportoktól származó gyors kinetikájú GABA_A receptor által végbemenő gátlást, azonban sokáig kérdés volt, hogy a bifázikus GABA_A és többnyire extraszinaptikusan elhelyezkedő GABA_B receptorok aktivációját mi okozhatja. Az egyes GABAerg interneuronok szigorúan meghatározott módon célozzák meg a piramissejtek egyes szubcelluláris alegységeit (Freund and Buzsáki 1996; Somogyi et al. 1998), ennek kapcsán feltételezhető volt, hogy a GABA_B receptor általi dendritikus gátlás is specifikus GABAerg interneuron csoportok által mehet végbe (Benardo 1994). Emellett több kutatási eredmény is azt mutatta, hogy a GABA_B receptor aktiváció megvalósulhat több interneuron együttes aktivációja, vagy egyes neuronok hosszantartó aktivációja során (Mody et al. 1994; Scanziani 2000; A. M. Thomson and Destexhe 1999; Alex M. Thomson et al. 1996), ilyen GABA_A receptor aktiváció során nagymennyiségű többlet GABA neurotransmitter szivárog a szinaptikus térből az extracelluláris térbe, ezzel elérve a GABA_B receptorokat (Destexhe 1995; J. S. Isaacson, Solis, and Nicoll 1993; Thunell, Locke, and Williams 1988). Ezzel szemben későbbi, laborunk által folytatott kutatások kimutatták, hogy a kombinált GABA_A és GABA_B receptor aktiváció már kiváltható egyetlen interneuron, a neurogliaform sejt egyetlen akciós potenciáljával (Tamás et al. 2003). A szinaptikus és az extraszinaptikus receptor aktiváció arra utal, hogy egyidejű szinaptikus és nem-szinaptikus jelátvitel mehet végbe. Laborunkban folyó további kutatások

beigazolták, hogy a neurogliaform sejt az ún. térfogati jelátvitel által képes GABA neurotranszmittert felszabadítani az extracelluláris térbe, amellyel nem csak a szinaptikus GABA_A receptorokat aktiválja, de megbízhatóan vált ki a posztzinaptikus sejten extraszinaptikusan elhelyezkedő GABA_B receptor aktivációt is. Ugyanakkor az által, hogy a preszinaptikus terminálisokon levő GABA_B receptorokat is aktiválja, képes a környező idegsejtek közötti kapcsolatokat lecsendesíteni (Oláh et al. 2009). A GABA neurotranszmitter az idegsejteken kívül az asztrocitákra is mérhető hatást képes gyakorolni, így szabályozva az extracelluláris homeosztatisz környezetet (Rózsa et al. 2015).

Az agykéreg 1. rétegében elhelyezkedő neurogliaform sejtek axonja laterális irányba néhány száz μm -re kiterjed, így nemcsak az azonos kortikális oszlopokba tartozó 2./3. és 5. rétegi piramissejtek apikális dendritjén, de a szomszédos kortikális oszlopokból származó apikális dendriteken is képes gátló hatást kifejteni, ezáltal a piramissejtek széles populációjára képes hatást gyakorolni. A neurogliform sejt a piramissejtek disztális dendrit szakaszain kiinduló NMDA receptor által kiváltott rövid idejű depolarizációt, az úgynevezett NMDA tüskét, valamint a dendrit törzstől kiinduló Ca^{2+} tüske kialakulását képes megakadályozni (M. E. Larkum, Kaiser, and Sakmann 2002; Matthew E. Larkum, Zhu, and Sakmann 1999; Palmer et al. 2014). Mindemellett a neurogliaform sejtek jellemzően más interneuron típusokat is például a Martinotti sejteket, kettőscsokor sejteket és más neurogliaform sejtek is gátolhatnak, ennél fogva képesek a gátlás alól felszabadítani a piramissejtek apikális dendrit szakaszait (Jiang et al. 2013; Lee et al. 2015). A kémiai szinapszisok mellett a neurogliaform sejtek gyakorta alakítanak ki elektromos részekapcsolatokat (gap junction) más neurogliaform sejtekkel és különböző interneuron típusokkal, ezáltal képesek hálózati szinten összehangoltan erőteljes agykérgi gátlást kifejteni (Jiang et al. 2013; Simon et al. 2005; Yao et al. 2016). Az erőteljes lassú kinetikájú gátlás a θ hálózati oszcilláció (4-10 Hz) kialakításában fontos szerepet játszik a hippocampusban (Capogna and Pearce 2011). Ezek az oszcillációk jellemzőek az alvás alatti gyors szemmozgás (REM) során, ébrenlét, mozgás és egyéb magastartási folyamatok alatt (Buzsáki 2002). Továbbá a clastrum aktiválásával a preforntális kéregben erőteljes feed-forward lassú gátlás figyelhető meg, amelyet a neurogliaform sejtek közvetítenek (Jackson et al. 2018). Mindezek mellett a neurogliaform sejt az asszociatív memóriafüggő plaszticitási mechanizmusokban is aktív szerepet játszik (Abs et al. 2018).

1.6 Szinaptikus kapcsolatok kvantális paraméterei

Klasszikus értelemben az információ továbbítás az idegsejtek közötti kapcsolatok, a szinapszisok révén történik. A preszinaptikus végződésekből az akciós potenciált követően

neurotranszmitter molekulákat szabadulnak fel. A neurotranszmitter molekulák a szinaptikus részbe jutnak, ezt követően a posztzinaptikus receptorokhoz kötnek, aminek hatására ioncsatornák nyitódnak, így posztzinaptikus választ váltanak ki.

A szinaptikus transzmisszióra vonatkozó legelfogódottabb modellt Katz és munkatársai fejlesztették ki az 1950-es években (del Castillo and Katz 1954). A modell eredetileg az ideg-izom ingerületáttevődésben jelenlevő szinaptikus kapcsolat leírására szolgált, azonban később ez a modell széles körben elterjedt a központi idegrendszer szintjén is. A modell szerint a szinaptikus jelátvitel során a vezikulákban levő neurotranszmitter molekulák diszkrét csomagokként, úgynevezett kvantumokként szabadul fel, meghatározott valószínűséggel. A kvantális modell értelmében a pre- és posztzinaptikus sejt közötti kommunikáció hatékonyságát a két sejt által alkotott funkcionális felszabadulási helyek száma (N), ezeken a helyeken a neurotranszmitter felszabadulás valószínűsége (P), illetve a felszabadulási helyeken a kvantális méret (q) határozza meg. A legegyszerűbb kvantális modell, a binomiális modell szerint a preszinaptikus sejt meghatározott mennyiségű felszabadulási helyeket alkot a posztzinaptikus sejten. Ezeken a felszabadulási helyeken a neurotranszmitter felszabadulása hasonló valószínűséggel megy végbe. Ennek értelmében az egyes felszabadulási helyeken mindent vagy semmit elv alapján, vagy nem vagy csak egy vezikulából szabadul fel neurotranszmitter az akciós potenciál hatására a felszabadulási valószínűségnek megfelelően. A neurotranszmitter koncentráció, tehát a kvantális méret nagysága független a felszabadulási valószínűségtől. Mivel a felszabadulási helyek egységesen hasonlóak a kvantális mérettel egyetemben, ezért az átlagos posztzinaptikus áram (I) nagyságát az

$$I = N \cdot P \cdot q \quad (1)$$

képlettel lehet meghatározni (Bekkers 1994; Korn and Faber 1991). A legelső kvantális analízis kísérletek során az ideg-izom kapcsolat szintjén történő transzmisszió kvantális természetét Poisson eloszlást feltételező modell alapján írták le (del Castillo and Katz 1954). Ezek a kísérletek során alacsony felszabadulási valószínűség mellett vezettek el elektromos jeleket a posztzinaptikus izomsejtről. Az alacsony felszabadulási valószínűség hatására minimális mennyiségű preszinaptikus terminálison történhet neurotranszmitter tartalmú vezikula felszabadulás, így lehetőség volt egy-egy önálló kvantum detektálására. Hasonló módon jellemezték a központi idegrendszerben a kehely-szinapszist („Calyx of Held” a corpus trapezoideum mediális magjában) (Jeffrey S. Isaacson and Walmsley 1995; Sahara and

Takahashi 2001). Mivel a központi idegrendszerben egy-egy idegsejt között jelentősen kevesebb felszabadulási hely van jelen, mint a kehely-szinapszison és az ideg-izomkapcsolatokon, valamint a felszabadulási helyeket relatív magas felszabadulási valószínűség jellemzi, ezért a Poisson eloszlás helyett megfelelőbb a binomiális eloszlás statisztikai használata. A központi idegrendszeri szinapszisok kvantális paraméterinek becslésére több binomiális eloszlást feltételező módszert fejlesztettek, ilyen a több valószínűségi fluktuációs analízis (MPFA) (Silver, Momiyama, and Cull-Candy 1998) vagy variancia-átlag analízis (Reid and Clements 1999). Ezen analízis módszerek használatához relatív sok kiváltott válaszra, és legalább három különböző felszabadulási valószínűségi állapotra van szükség. Ennek a problémának a megoldására nyújt lehetőséget a Bayesian valószínűségszámításon alapuló Bayesian kvantális analízis (BQA) módszer (Bhumbra and Beato 2013; Turner and West 1993). A módszer feltételezi, hogy a szinaptikus jelek fluktuációja leírható Gauss eloszlások keverékeként. Nagy előnye, hogy a kvantális paramétereket pontosan képes a kinyerni kettő felszabadulási valószínűségi állapot során származó szinaptikus jelekből. Az utóbbi kvantál analízis módszerekkel sikeresen jellemezték a központi idegrendszeri glutamaterg (Lanore et al. 2012; Sargent 2005; Silver, Momiyama, and Cull-Candy 1998) és GABAerg (Biro 2005) szinaptikus kapcsolatok kvantális paramétereit. Mindemellett a módszer alkalmas a rövid-távú (Fejtova et al. 2010; Oleskevich, Clements, and Walmsley 2000; Saviane and Silver 2006), illetve hosszú-távú (Reid and Clements 1999; Sola et al. 2004) plaszticitási folyamatok pre- és posztszinaptikus terminálison végbemenő változások hozzájárulásának a meghatározására.

1.7 GABAerg Ionotróp és metabotróp receptorok működése

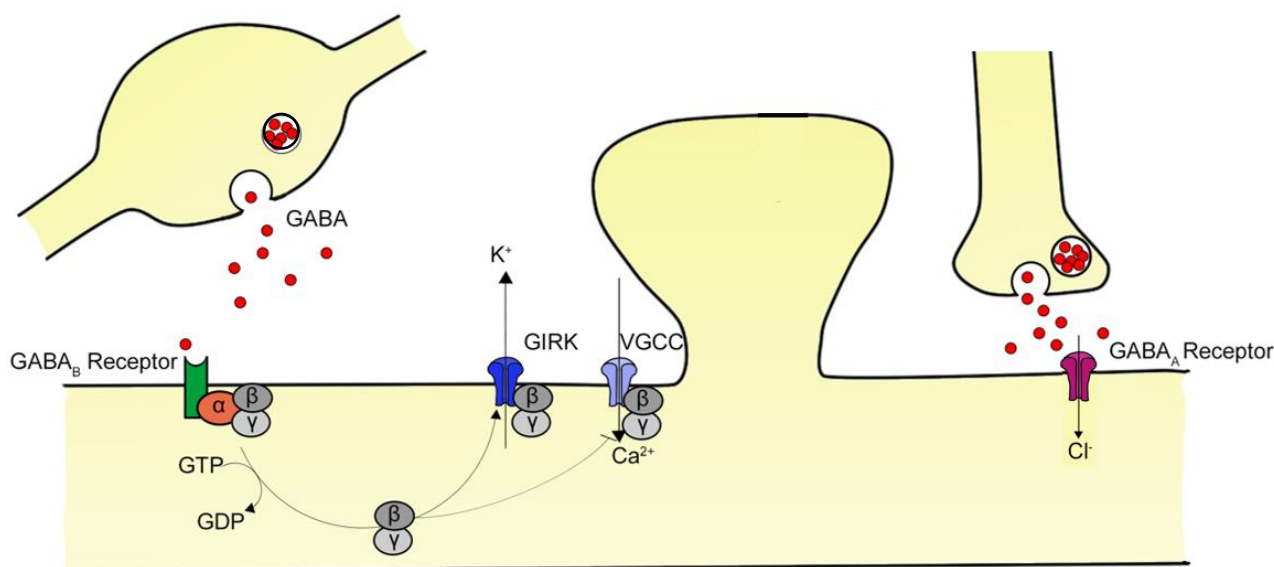
A posztszinaptikusan elhelyezkedő ion csatornák nyitása és zárása két nagy receptor protein család által diktált módon mehet végbe. Az egyik nagy receptor család az úgynevezett ligandvezérelt ioncsatorna, ezek az integrált transzmembrán fehérjék két funkcionális alegységgel rendelkeznek: egy extracelluláris specifikus kötőhellyel, ami az endogén ligandok, a neurotranszmitterek számára biztosít helyet a bekötésre, illetve másik alegység egy membránon keresztül ívelő transzmembrán fehérje, ami az ionáramlás számára alakít ki csatornát. A központi idegrendszerben a fő gátló ligandvezérelt ioncsatorna a GABA_A receptor. Szerkezetét tekintve pentamer transzmembrán receptor, azaz a központi pórust öt alegység veszi körbe. Ezen alegységek különböző izoformái határozzák meg a receptor ligand affinitását, nyitási valószínűségét, és konduktanciáját (Cossart, Bernard, and Ben-Ari 2005). A GABA_A receptor túlnyomó részt szinaptikusan helyezkedik el, azonban egyes izoformák jelenlétét

megfigyelték extraszinaptikusan is (Wei et al. 2003). GABA bekötés hatására a receptor konformáció változáson megy keresztül, így nyitott állapotba kerül a csatorna, amin keresztül szelektíven Cl^- ionok haladnak át (Barker, Ransom, and Neurobiology 2009). Az agyban a Cl^- ionok egyensúlyi potenciálja körülbelül -70 mV , ezért ha az idegsejt nyugalmi membránpotenciál értéke valamelyest pozitívabb ettől az értéktől, akkor a GABA_A receptor által közvetített potenciálváltozás során az extracelluláris Cl^- a sejten belülré fog áramlani az elektrokémiai gradiensnek megfelelően. Ennek a hiperpolarizáló hatásának köszönhetően az idegsejtre érkező serkentő bemenetek által kialakítható akciós potenciál generálódásának valószínűsége jelentősen csökken.

Másik nagy receptor családot a metabotróp receptorok alkotják. Nevüket onnan kapták, hogy a csatorna nyitás feltétele közvetett metabotróp jelátviteli interakciók lejátszódása. A ligandvezérelt ioncsatornákkal ellentétben ezek a receptorok nem rendelkeznek közvetlen ioncsatorna strukturális alegységgel, helyette a környezetükben elhelyezkedő csatorna proteinek G-fehérje közvetítésével aktiválják. Emiatt a metabotróp receptorokat G-fehérje-kapcsolt receptoroknak is nevezik. Strukturálisan a metabotróp fehérjék egy neurotranszmitter-kötő extracelluláris alegységet, valamint egy intracelluláris G-fehérje-kötő alegységet tartalmaznak. Neurotranszmitter bekötés hatására a szignáltranszdukció első komponensei, a heterotrimer G-fehérjék, melyek három alegységgel rendelkeznek (α , β és γ) és inaktív formában GDP-t kötnek. GABA_B aktiváció során a G-fehérje GTP-áz aktivitású alegysége GTP-t köt, amelyet konformáció változás követ. Az α -alegység disszociál a heterotrimer komplexről és további molekuláris kaszkád folyamatokban vesz részt. Időközben a dimer $\beta\gamma$ -alegység laterálisan diffundál a plazmamembrán intracelluláris oldalán. Ezt követően több divergens jelátviteli folyamat is végbemehet. Az $\beta\gamma$ -alegység képes az P-, Q- és N-típusú feszültség-függő Ca^{2+} (VGCC, Ca_v) csatornákhöz kötni, így azok működését, a Ca^{2+} beáramlást gátolja (Guyon and Leresche 1995; Harayama et al. 1998; Huston et al. 1995; Vigot et al. 2006). GABA_B szinapszisok esetén ismert a preszinaptikusan jelenlevő GABA_B receptor által közvetített Ca_v csatorna gátlása, ami a preszinaptikus neurotranszmitter felszabadulás csökkenéséhez vezet, ez a negatív visszacsatolás által autoreceptor funkció valósul meg (Chen and van den Pol 2018; Doze, Cohen, and Madison 2017). Posztzinaptikus GABA_B receptor aktiváción követő Ca_v áram gátlásának hatására a dendritikus aktivitás is szabályozható (M. E. Larkum, Kaiser, and Sakmann 2002; Matthew E. Larkum, Zhu, and Sakmann 1999; Palmer et al. 2014). Az $\beta\gamma$ -alegység továbbá beköthet a közeli G-fehérjéhez kapcsolt befelé egyenirányító káliumcsatornához (GIRK), amelynek hatására a kálium konduktancia megváltozik. A K^+

egyensúlyi potenciálja -88 mV körül helyezkedik el, ezért a GIRK csatorna nyitásának hatására nyugalmi membránpotenciál értéken is áramlanak ki K^+ ionok, ezzel hiperpolarizálva az idegsejtet.

Összességében a két posztszinaptikus receptor család aktiválása merőben eltérő posztszinaptikus válaszokat képes eredményezni az idegsejtben. A ligandvezérelt ioncsatornák rendszerint gyors, néhány tíz milliszekundum alatt lejátszódó posztszinaptikus hatásokat közvetítenek. Ezzel szemben a metabotróp receptorok az által, hogy a működésük több molekuláris kölcsönhatáshoz van rendelve, több száz milliszekundummal lassabb hatásokat eredményeznek (Eric R. Kandel, James H. Schwartz, Thomas M. Jessell, Steven A. Siegelbaum 2013). Továbbá a pre- és posztszinaptikusan is kifejtett hatásaik által diverz szerepet játszanak a neuronális serkentés szabályzása mellett a plaszticitásában is.



3. ábra: Ionotróp GABA_A és metabotróp GABA_B receptor alapvető működésének valamint az intracelluláris molekuláris jelátviteli folyamatok sematikus áttekintése

1.8 Szinaptikus jelek összegződése

A központi idegrendszerben az idegsejtekre több ezer gátló és serkentő szinaptikus bemenet érkezik, ezeknek a bemeneteknek az összegződése fogja meghatározni azt, hogy az idegsejt membránpotenciál értéke eléri-e a küszöbpotenciál értéket, hogy akcióspotenciál keletkezzen. Az agy működésének megértésének szempontjából az, hogy hogyan dolgozzák fel az idegsejtek a bementi információt és alakítják kimenetté mindig is központi kérdés volt az agykutatásban.

A legtöbb szinaptikus bemenet az idegsejtek dendritikus szegmensére érkezik. Annak ellenére, hogy már meglehetősen régen megfigyelték a dendritek aktív membrán tulajdonságait (M. Kuno R. Llinás 1962), hosszú ideig a dendriteket egyszerű passzív ingerületterjedés kábel modelljeként kezelték az egyszerűség kedvéért. A kábel modell elmélet szerint a passzív dendritikus vezetés által a dendrit szakaszokra beérkező szinaptikus jelek összeadódnak és passzívan tovaterjednek a szóma, illetve az axon irányába (Rall et al. 1967; Wilfrid Rall 1967). Habár a kábel modell fontos alapját képezi a dendritikus folyamatok biofizikai szempontból való megértésének, mostanára tisztázódott, hogy a dendritek aktív membrán tulajdonságokkal rendelkeznek, amelyek segítik a megfelelő jelfeldolgozást és a nem-lineáris jel transzformációt. Az idegsejtek számítógépes kompartment modelljei napjainkban is a kábel modell elvei alapján szimulálják a szinaptikus bemenetek integrációját és a lehetséges kimenet meghatározását, azonban a minél realisztikusabb modellek elkészítéséhez kísérleti utón szerzett adatokra van szükség. Ezen a kísérletek alapján az elmúlt évtizedekben a szinaptikus bemenetek három lehetséges integrációját figyelték meg:

- (1) *Szinaptikus bemenetek szublineáris integrációja*: Az dendrit mentén egymáshoz közel beérkező szinaptikus bemenetek hatékonyságának a csökkenését, azaz a szublineáris összeadódását figyelték meg *in vitro* 2./3. és 5. rétegi piramissejteken (Tamás, Szabadics, and Somogyi 2002) (Polsky, Mel, and Schiller 2004). Továbbá a látókéregben levő binokuláris idegsejtekben orientációszelektivitást írtak le *in vivo* módon, szublineáris összegződést alapján (Longordo et al. 2013). A szublineáris összegződést főként az eredményezi, hogy az egymáshoz közeli szinaptikus bemenetek hatására a kis térfogatú dendrit szakasz membránpotenciál értéke a membránon keresztül mozgó ionok egyensúlyi potenciálja felé tolódik el, így csökkentve az ion mozgás elektrokémiai hajtóerejét. Összességében a szublineáris összegződés fontos szerepet játszik a szinaptikus bemenetek jelentőségének mérséklése szempontjából, így a térben egymáshoz közel érkező szinaptikus bemenetek mintázat-függő bemeneti/kimeneti karakterisztikával rendelkezhetnek, ilyen módon növelve a sejtek információ feldolgozó képességét.
- (2) *Szinaptikus bemenetek lineáris integrációja*: A dendrit szerkezet különböző dendritágain térben szétszórt szinaptikus bemenetek egymástól független, lineáris összegződést mutat (Losonczy and Magee 2006; Polsky, Mel, and Schiller 2004). Bizonyos esetekben a térben egymáshoz közeli szinaptikus bemenetek is integrálódhatnak lineárisan: ha szinaptikus bemenetek kis amplitúdójúak (Cash and Yuste 1999; Polsky, Mel, and Schiller 2004), aktív konduktancia hatására (Cash and Yuste 1998), ha a szinapszisok proximálisan

helyezkednek el (Branco, Clark, and Häusser 2010; Losonczy, Makara, and Magee 2008) vagy ha szinaptikus bemenetek egymáshoz viszonyított aszinkron időzítésűek (Gasparini 2004). A lineáris összegződés eredményeként az aktív szinaptikus bemenetek egymástól független, párhuzamosan történő feldolgozása válik lehetővé az által, hogy a bemenetek között nincs komputációs kölcsönhatás. Így az egyes szinaptikus bemenetek fenntartják a jelentőségüket.

- (3) *Szinaptikus bemenetek szupralineáris integrációja*: A dendrit aktív ion konduktancia által képes úgynevezett dendritikus túske kisülést generálni. Közvetlen apikális dendriteken végzett elektrofiziológiai elvezetések során bemutatták, hogy bizonyos feszültségfüggő csatornák, amelyek permeábilisek a Na^+ , K^+ és Ca^{2+} ionok számára, aktívan részt vesznek a visszaterjedő akciós potenciál terjedésében (Stuart, Dodt, and Sakmann 1993), valamint a helyileg generálódó regeneratív dendritikus események kialakulásában (Schiller et al. 1997). A távoli apikális dendritre érkező helyi serkentő szinaptikus bemenetek képesek Ca^{2+} áramot aktiválni, amely Ca^{2+} tuskét generál. A Ca^{2+} túske jelenléte képes az idegsejt tüzelési mintázatát átkapcsolni magasabb frekvenciájú sorozat-tüzelési módba (Matthew E Larkum and Zhu 2002). Továbbá, piramissejtek apikális dendritjén feszültségfüggő Na^+ csatornák által közvetített szupralineáris összegződést is megfigyeltek (Ariav, Polsky, and Schiller 2003; Matthew E Larkum and Zhu 2002), amelyek kiváltásához kis dendrit szakaszon nagy mennyiségű szinkron érkező serkentő bemenetre van szükség. A dendriten kialakult Na^+ túske hatékonyan segíti a disztális dendrit szakaszokra érkező bemenetek sejttestbe történő terjedését és akciós potenciál generálódását (Q. Sun et al. 2014). Ezek mellett NMDA receptor által közvetített dendritikus tuskék kialakulását is megfigyelték helyi serkentő bemenetek által (Major et al. 2008; Polsky, Mel, and Schiller 2004). A fő szerepe az NMDA tuskének az, hogy a küszöb potenciál elérésével elősegítse az akciós potenciál kialakulását (M. Larkum et al. 2009). Összességében a dendritikus túske kialakulása nagy mértékben növeli az idegsejtek jelfeldolgozáskapacitását, illetve kialakulásuk nagy mértékben meghatározhatja a hálózati aktivitást (M. Larkum 2019).

Az agykérgi GABAerg gátló interneuronok széleskörű elemi funkciókat látnak el az információ áramlás térbeli és időbeli lefolyásában az által, hogy a principális sejtek különböző strukturális alegységeit célzottan gátolják. Fontos szerepet játszanak a sejtek tüzelésének precizitásának fokozásában (Hu, Gan, and Jonas 2014), a hálózati aktivitás szinkronizálásában (Bohannon and Hablitz 2018; Julia et al. 2012; Tamas et al. 2000) vagy az agykérgi hálózatokon keresztül haladó serkentés időbeli és térbeli szabályzásában (Pouille and Scanziani 2002;

Stefanelli et al. 2016). Ezen agykérgi folyamatok lejátszódása az dendriten történő gátló szinaptikus bemenetek integrációja által valósul meg.

2. Célkitűzések

A mielinhüvely károsodás a fő okozója egyes neurodegeneratív betegségeknek, úgy, mint a SM, azonban a mielin degeneráció folyamatával kapcsolatos ismereteink hiányosak. Az utóbbi időben a betegség kialakulásával kapcsolatos elmélet, miszerint a betegség autoimmun eredetű megkérdőjeleződni látszik. Egyes kutatások alapján felmerül a kérdés, hogy az immunreakciót esetleg az oligodendrociták szelektív károsodása váltja-e ki? Az utóbbi elmélet alapján a degradálódott mielinhüvelyből származó lipid törmelék akkumulációja kritikus lehet a betegség progressziója során. Ezért doktori értekezésemben a következő kérdésekre kerestük a választ:

1. A CARS módszer alkalmas-e az élő, festetlen agyszövet lipid tartalmú struktúrainak a vizsgálatára?
2. A CARS módszerrel alkalmas-e a mielinhüvely szelektív károsodásának nyomon követésére? Továbbá a különböző agyterületeken felhalmozódó lipid törmelék eloszlása feltérképezhető-e?

Az agykérgi hálózatok működése során az ionotróp receptorok által összegződő poszt-szinaptikus válaszok törvényszerűségéről nagyszámú ismeretekkel rendelkezünk, azonban a metabotróp receptorok által közvetített poszt-szinaptikus válaszok integrációjáról eddigi ismereteink szerint nincs kísérletes adat. Az agykérgi interneuronok közül a neurogliaform sejt egyedi térfogati transzmisszióval hatékonyan képes aktiválni a poszt-szinaptikus metabotróp GABA_B illetve, az ionotróp GABA_A receptorokat.

Doktori értekezésemben rágcsgáló agykéreg felsőrétegi neurogliaform sejtek által alkotott gátló kapcsolatokat vizsgálva a következő kérdésekre kerestünk a választ:

1. Az első rétegi neurogliaform sejt által kialakított gátló kapcsolatokat milyen kvantális paraméterek jellemzik?
2. A térfogati transzmisszió által mekkora a biztosított effektív jelátviteli távolság a neurogliaform sejt preszinaptikus terminálisa és poszt-szinaptikus GABA receptokok között?
3. Első rétegi neurogliaform sejtek által alkotott hálózat strukturális elrendeződése milyen térbeli szummációs lehetőséget szolgáltat?
4. *In vivo* körülmények között megfigyelhető-e neurogliaform sejtek együttes aktivációja?

5. Konvergáló neurogliaform sejt bementek révén generált ionotróp GABA_A és GABA_B metabotróp jelek milyen integrációs tulajdonságokkal rendelkeznek?
6. Milyen mechanizmusok befolyásolják a metabotróp GABA_B jelek integrációját?

3. Közreműködések

Az 5.1.1. fejezetben bemutatott kísérletek tervezését Dr. Tamás Gábor és Dr. Molnár Gábor végezte. A CARS mikroszkóp rendszert Dr. Szipőcs Róbert fejlesztette. A CARS rendszeren Ozsvár Attila végezte a méréseket. Az immunhisztokémiai kísérletet Dr. Baka Judith készítette. Az emberi agyszövet műtéti eltávolítását Dr. Barzó Pál végezte.

Az 5.1.2. fejezet kísérleteit Dr. Molnár Gábor, Dr. Tamás Gábor és Ozsvár Attila tervezte. A CARS méréseket Ozsvár Attila végezte. Az adatokat Ozsvár Attila és Dr. Molnár Gábor értékelte ki.

Az 5.1.3. fejezet kísérleteit Dr. Molnár Gábor, Dr. Tamás Gábor és Ozsvár Attila tervezte. A CARS méréseket Ozsvár Attila végezte. Az adatokat Ozsvár Attila és Dr. Molnár Gábor értékelte ki. Az lipid törmelék rekonstruálásához és vizsgálatához a programot Ozsvár Zoltán írta.

Az 5.2.1. fejezet elektrofiziológiai kísérleteit Ozsvár Attila, Dr. Molnár Gábor és Dr. Tamás Gábor tervezte. A kísérletek kivitelezését és kiértékelését Ozsvár Attila végezte. Az idegsejt párok anatómiai előhívását Tóth Éva, a fénymikroszkópos rekonstrukciókat Ábrahám-Tóth Nelli készítette.

Az 5.2.2. fejezetben kísérleteket Dr. Komlósi Gergely és Dr. Tamás Gábor tervezte. A 3D rekonstrukciót Dr. Komlósi Gergely készítette. Az immunhisztokémiai kísérleteket Dr. Komlósi Gergely végezte. Az adatokat Ozsvár Attila és Dr. Komlósi Gergely értékelte ki. A térbeli modellt Ozsvár Attila és Dr. Komlósi Gergely készítette el.

Az 5.2.3. fejezetben a kísérleteket Ozsvár Attila és Dr. Tamás Gábor tervezte. A műtéteket, az *in vivo* kísérleteket és az adatok kiértékelését Ozsvár Attila végezte. Az adatok kiértékeléséhez a szoftvert Ozsvár Attila készítette. Az immunhisztokémiai kísérletet és a konfokális mikroszkópos felvételeket Dr. Baka Judith készítette. A sejtek visszatérképezését Ozsvár Attila végezte.

Az 5.2.4. fejezetben az elektrofiziológiai kísérletek tervezését Dr. Komlósi Gergely és Dr. Tamás Gábor végezte. A kísérleteket és a kísérletek kiértékelését Dr. Komlósi Gergely végezte.

Az 5.2.5. fejezetben az elektrofiziológiai kísérletek Ozsvár Attila, Oláh Gáspár és Dr. Tamás Gábor tervezte. A kísérleteket Ozsvár Attila és Oláh Gáspár végezte. A kísérletek kiértékelését Ozsvár Attila, Oláh Gáspár végezte.

Az 5.2.6. fejezetben a kísérletek megtervezését Ozsvár Attila és Dr. Tamás Gábor végezte.
A modell megtervezését, elkészítését, adatok gyűjtését és kiértékelést Ozsvár Attila végezte.

4. Anyagok és módszerek

4.1 Agyszelet készítés

A kísérletek a Szegedi Tudomány Egyetem Etikai Bizottságának engedélyével történtek. Fiatal felnőtt (19 és 46 nap között, (P)23.9±4.9) Wistar patkányok lettek felhasználva a kísérletek során. Az állatokat halothánál történő elaltatását követően dekapitáltuk. Az eltávolított agyból 320 µm vastag agyszeleteket készítettünk vibráló pengéjű mikrotómmal (Microm HM 650 V) a szomatoszenzoros reprezentációért felelős agykérgi területekből. Az agyszeletek metszése jéghideg (4°C) magas szacharóz tartalmú mesterséges agy-gerincvelő folyadékban történt, aminek összetétele mM-ban kifejezve a következő volt: 75 szacharóz, 84 NaCl, 2.5 KCl, 1 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 0.5 CaCl₂, 4 MgSO₄, 25 d (+)-glükóz, a folyadék telítve volt 95% oxigénnel és 5% szén-dioxiddal. Vágást követően az agyszeletek 36°C-on inkubáltuk 30 percig, amit követően a folyadékot lecseréltük alacsony Ca²⁺ tartalmú mesterséges agy-gerincvelő folyadékra, aminek a következő az összetétele mM-ban kifejezve: 130 NaCl, 3.5 KCl, 1 NaH₂PO₄, 24 NaHCO₃, 1 CaCl₂, 3 MgSO₄, 10 d (+)-glükóz, a folyadék telítve volt 95% oxigénnel és 5% szén-dioxiddal. Az inkubációt követően 17 °C-on tartottuk az agyszeleteket az alacsony Ca²⁺ tartalmú mesterséges agy-gerincvelő folyadékban egészen a kísérlet megkezdéséig.

4.2 *In vitro* Elektrofiziológiai mérések és farmakológia

Elektrofiziológiai vizsgálatokhoz az agyszeleteket 37°C-os kamrába helyeztünk, amelyen keresztül elvezető oldatot áramoltattunk 4-5 ml/perc sebességgel. A mérő oldat összetételét tekintve megegyezett az alacsony Ca²⁺ tartalmú mesterséges agy-gerincvelő folyadékkal, kivéve a 3 mM CaCl₂ és a 1.5 mM MgSO₄ koncentráció tartalmát. Az agykérgi idegsejtekről az elektromos jeleket több csatornás whole-cell patch clamp technikával vezettünk el, egyidejűleg legfeljebb három sejtről ~37°C-on elvezető kamrában, amelyen keresztül ACSF-et áramoltattunk 3-5 ml/perc sebességgel. A kísérleteket során az idegsejteket differenciál interferencia kontraszt (DIC) videómikroszkópiával vizualizáltuk az agyszelet felszínétől számítva 60-160 µm mélységben (Zeiss Axio Examiner LSM7 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Németország), Guppy F-080 CCD kamera (Allied Vision, Németország)) 40x-es nagyítású víz-immériós objektívvel (1.0 NA; Carl Zeiss AG, Oberkochen, Németország). A mikroszkópasztal és a mikropipetták mozgását Luigs and Neumann Junior mikromanipulátorokkal és SM7 manipulátorrendszerrel (Luigs and Neumann, Németország) végeztük. Az elektromos jelek HEKA EPC 10 patch clamp erősítőrendszerrel (HEKA Elektronik, Németország) rögzítettük. Az elektromos jeleket 5 kHz aluláteresztő szűrővel

szűrtük meg és 15kHz-en digitalizáltuk Patchmaster program használatával. A mikropipetták (3-5MΩ) alacsony klorid tartalmú intracelluláris oldattal töltöttük meg (pH 7,25; 300 MΩ), annak érdekében, hogy a GABAerg és glutamaterg események elkülöníthetők legyenek. Az intracelluláris oldat összetétele a következő volt: 126 mM K-glükonát, 4 mM KCl, 4 mM ATP-Mg, 0,3 mM GTP-Na₂, 10 mM HEPES, 10 mM keratin-foszfát és 8 mM biocytin. A sejtek passzív membrán paramétereit és tüzelési mintázatukat nyugalmi membránpotenciál értékén mértük áramzár üzemmódban, 800 ms hosszú négyszögimpulzusok beinjektálásával. A négyszögimpulzusok -100 pA-tól kezdődtek és 20 pA-el növekedtek minden egyes ismétlés során, egészen a sejt küszöbpotenciáljának elérésig. A szinaptikus kapcsolatok vizsgálata során a preszinaptikus sejtek stimulálása rövid időtartamú küszöbáram feletti impulzussokkal történt (800 pA, 2-3 ms), legalább 60 másodperc hosszú szünetekkel. A 100Hz frekvenciájú stimulációs protokoll esetében a szünetek hosszát legalább 300 másodpercre növeltük. A posztzinaptikus sejt membránpotenciálját -50 mV-on tartottuk. Az feszültségzár elvezetések során a sorosellenállást (R_s) és a kapacitásváltozást folyamatosan monitoroztuk. Ha a kísérletek során a soros ellenállás meghaladta a 35 MΩ-t vagy a kezdő értéktől 20%-os változás volt mérhető illetve ha kompenzált R_s értéke meghaladta a 20%-ot, akkor azokat eredményeket nem használtuk fel.

Bayesian kvantális analízis (BQA) során a preszinaptikus neurotranszmitter felszabadulási valószínűséget az extracelluláris Ca²⁺ és Mg²⁺ koncentráció változtatásával idéztük elő. BQA során kettő különböző felszabadulási valószínűségi állapotban mértük amiben az Ca²⁺/Mg²⁺ arány mM-ban a következő lehetett: 1,5 Ca²⁺, 3 Mg²⁺; 2 Ca²⁺, 2 Mg²⁺ vagy 3 Ca²⁺, 1,5 Mg²⁺.

A BQA elvezetések során az ACSF a következő anyagokat tartalmazta annak érdekében, hogy a mért IPSP-k spontán szinaptikus eseményektől mentesek legyenek, illetve a lehetséges plaszticitási mechanizmusokat elkerüljük: 10 μM (2R)-Amino-5-foszfonovaleriánsav (D-AP5) (Tocris), 10 μM 2,3-dihidrox-6-nitro-7-szulfamoi-benzo[f]quinoxalin-2,3-dion (NBQX) (Tocris). A BQA kísérletek legalább 60 perces elvezetések kivitelezését igényeltek és maximálisan legfeljebb 90 percre tartottak. Az egyes preszinaptikus neurotranszmitter felszabadulási valószínűséget jellemző szegmensek 28-tól egészen 42 IPSC-t tartalmaztak (átlag 32.75±4.15). Az összes szegmens esetében ellenőriztük a hosszú távú plaszticitás lehetőségét. Méréseink során nem találtunk korrelációt az IPSC amplitúdók és az eltelt idő között (Pearson r érték a kísérletek során (n=8) -0,39 és 0,46 között volt mérhető, átlag -0.01±0.29).

A neurogliaform sejtek konvergáló bemeneteinek a vizsgálata során az ACSF a következő farmakonokat tartalmazta: 10 μ M 6-Imino-3-(4-metoxi-fenil)-1(6H)-piridazinebutánsav-hidrobromid (gabazine/SR9553 hidrobromid) (Tocris), 10 μ M (2R)-Amino-5-foszfonovaleriánsav (D-AP5) (Tocris), 10 μ M 2,3-dihidroxi-6-nitro-7-sulfamoil-benzo[f]quinoxalin-2,3-dion (NBQX) (Tocris), 10 μ M 4-etil-fenil-amino-1,2-dimetil-6-metil-amino-pirimidinium-klorid (ZD7288) (Sigma-Aldich), 10 μ M 1-[2-[[[(difenilmetilén)imino]oxi]etil]-1,2,5,6-tetrahidro-3-piridinkarbonsav-hidroklorid (NO711) (Sigma-Aldrich). A farmakonokat előkészített törzsoldatban tároltuk -20°C a kísérleteken történő felhasználásig.

4.3 Hisztológia

Az elektrofiziológiai kísérleteket követően a biocytinnel megjelölt idegsejteket tartalmazó agyszeleteket előkészítettük a fénymikroszkópos vizsgálatokra. Az agyszeleteket nitrocellulóz papír (Millipore, USA) közé helyeztük a deformáció elkerülése érdekében és 4% paraformaldehid, 15% pikrin sav és 1,25% glutáraldehid tartalmú 0,1 M foszfátpuffer oldatba (pH= 7,4) helyeztük és tartottuk 4°C-on legalább 12 óráig. A fixáló oldatot többszöri 0,1 M foszfátpuffer oldattal történő átmosással eltávolítottuk a szeletekről. Ezt követően 10%, majd 20% szacharóz tartalmú foszfátpuffer oldatba helyeztük a szeleteket, ami megóvjá a membránszerkezetet későbbi fagyasztás során. Az agyszeleteket néhány másodpercig folyékony nitrogénbe fagyasztottuk, ezt követően 10%-os zselatinba ágyasztuk és hideg foszfátpuffer oldatban újrametszettük 60 μ m vastag szeletekre (Leica VT 1000S mikrotóm). Az újrametszett szeleteket tris pufferben oldott (pH= 7,4) avidin-biotin peroxidáz komplexben (1:100; Vector Labs) tároltuk 4°C-on egy éjszakán át. Az enzimreakcióhoz kromogénként 0,05%-os 3'3'-diaminobenzidine tetrahidrokloridot (DAB), oxidánsként pedig 0,01 %-os H₂O₂-ot használtunk. A szeleteket utófixáltuk 1% OsO₄ tartalmú 0,1 M foszfátpuffer oldatban. Többszöri desztillált vízzel történő mosást követően pedig 1%-os uranil-acetáttal kezeltük és felszálló alkoholsorral dehidratáltuk a szeleteket. Végezetül epoxigyantába (Durcupan, Sigma-Aldrich, USA) ágyasztuk és tárgylemezre helyeztük.

4.4 Koponyaműtét

Fiatal felnőtt (22-től 28 naposig (P)24,75 \pm 2,75) hím Wistar patkányokat halotán belélegeztetését követően uretán intraperitoneális (1,4 g/kg testtömeg) beadásával elaltattuk. Altatás alatt az állat testhőmérsékletét 37°C-on tartottuk melegítő pad (Supertech Instruments, Magyarország) segítségével. A műtétet megelőzően gyulladáscsökkentés és fájdalom csillapítás céljából dexametazon-nátrium-foszfát (2 mg/kg testtömeg) bórallati, valamint

carpofen (5mg/kg testtömeg) hasüregbe történő beadását végeztük. Sztereotaxiás befogó állványba (Kopf Instruments, USA) rögzítettük a bealtatott állatok fejét. Lidokain-hidroklorid helyi érzéstelenítését követően a fejtető bőrszövetét eltávolítottuk. A koponyacsont occipitalis részére fém tartórudat rögzítettünk fogászati cementtel (Sun Medical, Japán). Az elsődleges szomatoszenzoros agykérgi terület felett, 1,5 mm poszterior és 2,2 mm laterálisan a Bregmától 3 mm átmérőjű koponya ablakot fűrtünk nagysebességű fogászati fűróval (Jinme Dental, Kína). A koponya ablak területén a koponyacsontlemez eltávolítását követően a kemény agyhártyát is óvatosan eltávolítottuk. Ezt követően a nyílás 1,5% agarózzal lett feltöltve és vékony üveglemezzel fedtük le részlegesen a mozgási artefaktum limitálásának céljából. Végezetül a HEPES tartalmú ACSF elvezető oldatban tartottuk a koponya ablakot, ami a következő összetétellel rendelkezett mM-ban kifejezve: 125 NaCl, 3,5 KCl, 10 HEPES, 1 MgSO₄, 1 CaCl₂, 0,5 d (+)-glükóz, pH= 7,4.

4.5 Két-foton Ca²⁺ képalkotás *in vivo*

A koponya ablak üveglappal való lefedését megelőzően 10 mM koncentrációjú szintetikus kalcium-érzékeny fluoreszcens festéket, Oregon Green 488 BAPTA-1 AM (OGB-1 AM; Thermo Fisher Scientific, USA) és 1 μ M koncentrációjú asztrocitákat jelölő festéket, szulforodamin 101-t (SR101; Thermo Fisher Scientific, USA) juttattunk be az agyszövet felső rétegébe. Az OGB-1 AM bejuttatása üvegpipettán (1-2M Ω) át történő injektálással történt folyamatos két-foton mikroszkóp (Zeiss Axio Examiner LSM7 (Carl Zeiss AG, Németország)) által történő vizuális ellenőrzés alatt, 40x-es víz-immersiós objektívvel (1.0 NA; Carl Zeiss AG, Németország). Injektálást követően agarózzal és üveglemezzel lefedtük a koponya ablakot. Képalkotó kísérletek egy órát követően kezdődtek. Az első rétegi interneuronok aktivitását ipszilaterális hátsóvégtagi elektromos stimuláció (Digimeter, Egyesült Királyság, 200mA, 10ms) alatt vizsgáltuk. Az OGB-1 AM indikátort 800nm hullámhosszú femtoszekundum hosszúságú Ti:zafir lézerpulzusokkal (Mai Tai Deep See; Spectra-physics, USA) gerjesztettük. A mikroszkóp objektívje után mért lézernyaláb maximális teljesítménye 30mW volt. A hátsóvégtagi reprezentációért felelős szomatoszenzoros agykérgi területen z-stack optikai képsorozatot rögzítettünk (304 μ m x 304 μ m x 104 μ m). Ebbe a térfogatban elhelyezkedő interneuronok aktivitását regisztráltuk video módban (256x100 pixel) ~20Hz képfrissítési frekvencián.

A kísérlet befejeztével egyes 1. rétegi interneuronokat biocytin tartalmú intracelluláris oldattal töltöttünk fel, a későbbi immunohisztokémiai visszatérképezés megkönnyítésének céljából.

4.6 Minta előkészítés immunohisztokémiához

Az *in vivo* Ca^{2+} képképző kísérleteket követően az állatokat mélyaltatásba helyeztük ketamine (100mg/kg) és xylazine (10mg/kg) hasüregbe történő beadásával. Mélyalvás elérését követően a mellkast felnyitottuk és a szív aortán keresztül 0,9%-os fízológias sóoldat áramoltattunk át ~1 percig. Amint a vért sikerült kimosni a szív jobb oldali kamráján keresztül, jéghideg 4% paraformaldehid tartalmú 0,1 M foszfátpuffer fixáló-oldatot keringettünk tovább az érrendszeren ~15 percig. Ezt követően a teljes agyat kiszedtük és tovább tároltuk 4% paraformaldehid tartalmú 0,1 M foszfátpuffer oldatban. 24 óra elteltével többször 0,1 M foszfátpuffer-oldattal átmostuk a teljes agyat. A koponya ablak területén kimetszettük az agyat egy ~3x3x3mm méretű blokk formájában, amit zselatinba ágyasztunk és a pia materrel párhuzamosan 60 μm vastag szeletekre metszettünk jéghideg 0,1 M foszfátpuffer oldatban. Továbbá a szeleteket egy éjszakán keresztül 0,1 M foszfátpuffer oldatban tartottuk.

4.7 Floureszcens immunohisztokémia és visszatérképezés

Többszöri 0,1 M foszfátpuffer oldatban történő mosást követően a szeleteket 10%, majd 20% szacharóz tartalmú 0,1 M foszfátpuffer oldatban helyeztük. Ezt követően a biocytinnel töltött sejtek előhívásához a szeleteket 2 óráig inkubáltuk tris-pufferben (0,1M, pH= 7,4) oldott Alexa-488-streptavidin komplexben (1:400, Molecular Porbes) szobahőmérsékleten. Többszöri tris-puffer oldatban történő mosást követően a szeleteket tris-pufferben oldott ló szérumban (10%) blokkoltuk, ezt követően 2%-os normális ló szérumot és 0,1% Triton x-100 tartalmazó tris-pufferben oldott egér anti-alfa-aktinin (1:20000, Sigma-Aldrich, USA) jelenlétében inkubáltuk 6 órát szobahőmérsékleten. Többszöri tris-puffer oldattal történő mosást követően Cy3 kötött számár anti-egér (1:500, Jackson ImmunoResearch, UK) másodlagos antitestekkel tettük láthatóvá az immunreakciót. További tris-puffer és foszfátpuffer oldattal történő mosást követően a szeleteken DAPI-festést végeztünk (4',6-diamidino-2-fenilindol, ThermoFiser Scientific, USA). Végezetül a szeleteket Vectashield (Vector Laboratories) médiumba ágyasztuk. A szeleteket LSM 880 konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal (Carl Zeiss AG, Németország) vizsgáltuk 40x olaj-immerziós objektívvel (1.4 NA). A konfokális mikroszkóppal készült z-stack optikai szegmentált képsorozatot manuálisan döntöttük és forgattuk, hogy megegyezzen az orientációja a két-foton optikai képsorozattal, így lehetővé téve a interneuronok immunohisztokémiai visszatérképezését. A megfelelő orientáció megtalálásához a biocytinnel megjelölt sejteket használtuk referencia pontnak.

4.8 Adatkiértékelés

Elektrofízológiai adatok kiértékeléséhez Fitmaster (HEKA Elektronik), Origin 7.5 (OriginLab), IgorPro (Wavemetrics) programokat használtunk. BQA kísérletek kiértékeléséhez

PyClamp, Numpy és SciPy programokat használtuk. Két-foton Ca^{2+} jeleket ZEN2 (Zeiss) programmal detektáltuk és regisztráltuk, a kiértékelésük egyedi készítésű MATLAB (The MathWorks) program által történt a Statistical Toolbox, Image Processing Toolbox és saját scriptek használatával.

4.9 Statisztika

Az adatokat, mint átlag \pm standard deviáció (SD) mutatjuk be. A statisztikai teszteket az egyes kísérletek körülményeivel összhangban határoztuk meg. Az eredményeket $p < 0,05$ érték esetében vettük szignifikánsnak.

4.10 MCell modell konstrukció

A GABA_B receptor GIRK csatorna közötti lejátszódó kölcsönhatást MCell v3.4 (www.mcell.org) programmal modelleztük. A modell magába foglal egy piramissejt dendritikus szakaszának elektromikroszkóppal készült sorozatmesztet 3 dimenziós rekonstrukcióját (A 3D modell szabadon letölthető a VolRoverN programcsomaggal együtt (Edwards et al. 2014)). Továbbá a dendrit körüli extracelluláris teret is modelleztük, hogy a megfelelő tortuozitási értéket reprodukáljuk. A dendriten kívüli teret 3D mátrixba rendezett kockák alkotják, oldalhosszúságuk 800×800 nm, belsejük egy 400×400 nm széles és 340 nm mély üreget tartalmaz. Ezek a kockák 32 nm távolságra vannak elrendezve egymástól és a dendrit felszínétől. Egyedi készítésű Matlab scriptek hozták létre a MDL (Model Description Language) fájlt, ami szükséges az MCell stimuláció futtatásához. MCell program szimulálta a GABA felszabadulást, a GABA_B receptor és GIRK csatorna közötti lejátszódó kölcsönhatást, és az összes sztochasztikus molekuláris mozgást.

Az egyes szimulációk lefutása a következő volt: ahhoz, hogy valóságos, a biológiai receptorok és csatornák eloszláshoz nagyon hasonló eloszlást kapjunk a szimulációban, a 3D dendrit rekonstrukciónak a membrán felületén egy reakció kaszkád futott le minden szimuláció kezdetén. Ez a reakció kaszkád eredményezte a végleges receptor eloszlást. Az első iterációk során úgynevezett elsődleges részecskéket helyeztünk el a membránban. Az elsődleges részecskék másodlagos részecskékké bomlanak, amik vagy GABA_B receptor vagy GIRK csatorna csoportosulásokat alkotnak. A másodlagos részecskéből származó GIRK csatorna csoportosulások 1-től 4 csatornát tartalmaztak, amelyek nem voltak képesek mozgásra a membránban. Ezzel szemben, a GABA_B receptor csoportosulások a membránban laterális diffúzióban tudtak terjedni. A megfelelő késleltetést és reakcióidőt a GABA_B receptor képződéséhez (amelyek száma 1 és 8 közötti volt) szimulált hűtés optimalizálási Matlab algoritmus használatával határoztuk meg. Az optimális értékek elérése esetén a modellünkben

a GABA_B receptorok meghatározott ideig voltak képesek a laterális diffúzióra, ezt követően immobilizálódtak, így nagyon hasonló receptor-csatorna eloszlást sikerült elérnünk, mint amelyet Kulik és munkatársai publikáltak (Kulik 2006). Ezt követően történt a GABA felszabadítása az extracelluláris tér 4 különböző pontján. Összesen 1 másodpercrek megfelelő időintervallumban vizsgáltuk a reakciók lefolyását.

Mivel a szimuláció keretein belül kizárólag a GABA_B receptor és a GIRK csatorna között lejátszódó kölcsönhatásra voltunk kíváncsiak, ezért a rendszerünk nem tartalmaz GABA_A receptorokat valamint GABA amino transzportereket. Eddigi tudomásunk szerint nincs kísérletes eredményből származó információ a NGF sejt egyetlen akciós potenciálja által felszabadított vezikulákból származó GABA koncentrációra vonatkozóan, ezért a modellünkben ~1 mM (3750 GABA molekula) GABA neurotranszmittert szabadítottunk fel egy-egy preszinaptikus bouton pozícióban.

Egyszerre 6 MCell szimulációt futtatunk párhuzamosan szerver számítógépen (Intel(R) Core i7-4790 3.6 Ghz CPU, 32 GB RAM) , 1µs-os idő léptékekkel. Összesen 3322 iterációt végeztünk.

1. Táblázat: szimulációhoz felhasznált paraméter értékek

Paraméterek	Érték	Referencia
Teljes dendrit felszín	31,204 μm^2	
Dendrittüskék felszíne	15,621 μm^2	
Dendrit-törzs felszíne	15,583 μm^2	
GABA _B receptor sűrűség	36 részecske/ μm^2	(Degro et al. 2015)
GIRK csatorna sűrűség	12,2 részecske/ μm^2	(Degro et al. 2015)
GABA molekulák száma/felszabadulási hely	3750	
GABA diffúziós koefficiens	0.76 $\mu\text{m}^2/\text{ms}$	(Longsworth 1952)
GABA _B R Kon	$5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(Sodickson and Bean 1996), (Beenhakker and Huguenard 2010)
GABA _B R Koff	5 s^{-1}	(Sodickson and Bean 1996), (Beenhakker and Huguenard 2010)
Membrán asszociált molekulák diffúziós koefficiens	$4 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$	(Perez et al. 2006)
G-protein Kon	$6 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(Brinkerhoff, Choi, and Linderman 2008)
G-protein hidrolízis	$2-3 \text{ s}^{-1}$	(Breitwieser 1988)
G-protein koncentráció	1200 / μm^2	(W. Wang et al. 2016)
1. G-protein- GIRK Kon	$2,6 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(W. Wang et al. 2016)
2. G-protein- GIRK Kon	$5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(W. Wang et al. 2016) alapján feltételezve
3. G-protein- GIRK Kon	$1,6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(W. Wang et al. 2016) alapján feltételezve
4. G-protein- GIRK Kon	$10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(W. Wang et al. 2016)
G-protein – GIRK Koff	500 s^{-1}	(Yakubovich et al. 2015)
G-protein($\beta\gamma$) –G(α) Kon	$0.7 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(Yakubovich et al. 2015)
G-protein($\beta\gamma$) –G(α) Koff	$0,0013 \text{ s}^{-1}$	Yakubovich et al 2015
GABA _B receptor aktivációs idő	50 ms	(Sodickson and Bean 1996)
GABA _B receptor deaktiváció	150 ms	(Sodickson and Bean 1996)
GABA _B receptor inaktiváció	1 s	(Sodickson and Bean 1996)
GIRK nyitott állapot idő	0.9 ms	(Velimirovic et al. 1996)
Szimulációs időlépték	10^{-5} s	
Iterációk száma szimuláción belül	10^5	

4.11. Állatok cuprizon kezelése

A Szegedi Tudomány Egyetem Etikai Bizottságának engedélyével történtek a kísérletek. C57BL/6 hím egerek lettek felhasználva a kísérletek során. Az állatok táplálékhoz és vízhez szabadon hozzáfértek. 8 hetes korukat elérve 2 vagy 4 hetes cuprizon (Sigma Aldrich) kezelés kezdődött a demielinizációs folyamatok kiváltásához (Blakemore 1973; Matsushima and Morell 2001). 0.2% cuprizon tartalmú standard porított tápot kaptak a kezelés alatt az állatok. A kezelés befejeztével a 4.1 fejezetnek megfelelően agyszeletek készültek a CARS-képalkotó kísérletek céljából.

4.12. Emberi Agyszövet előkészítése

Minden vizsgálat a Helsinki Nyilatkozat értelmében és a Szegedi Tudomány Egyetem Etikai Bizottságának engedélyével történt. Az emberi agyszövet 67 éves női páciensből származik, a beteg a műtét előtt a szövetminta ilyen jellegű, kutatásra való felhasználását írásban engedélyezte. A műtét a Szegedi Tudományegyetem Idegsebészeti Klinikáján történt. Midazolam és fentanyl (0.03 mg/kg, 1–2 mg/kg) intravénás beadásával indukálták az altatást. Az endotracheális intubáció könnyítésére a páciens 0,5 mg/kg rocuroniumot kapott. Intubálást követően a páciens O_2 és N_2O 1:2 arányú elegyével lélegeztették. Az anesztézia megfelelő szinten tartása szevofluránnal történt. Mélyagyi benign tumor eltávolítása céljából a kapott agyminta occipitalis agykérgi területéről származik. A műteti úton eltávolított agyszövetet jéghideg szacharóz tartalmú agy-gerincvelő folyadékban szállítottuk, ezt követően pedig a 4.1 fejezet alapján metszettük azzal a különbséggel, hogy 350 μm vastag agyszeleteket készítettünk.

4.13. Koherens anti-Stokes Raman szóródáson alapuló képalkotás

CARS képalkotó rendszer prototípusának részletes ismertetése Haluszka és munkatársai által közölt publikációban megtekinthető (Haluszka et al. 2015). A rendszerünk magába foglal egy FemtoCARS lézer egységet és egy FemtoFiber Yb-erősítőrendszert (mindkettő egyaránt R&D Ultrafast Laser Ltd., Magyarország), Axio Examiner LSM 7 MP kétfoton mikroszkópot (Carl Zeiss, Németország) 40-es víz immerziós objektívvel (Carl Zeiss, Németország) és egy MaiTai femtoszekundumos Ti:zafir lézert (Spectra-Physics, Santa Clara, USA). A LSM 7 MP mikroszkópban az egyik NDD (non-descanned detektor) elé egy 650/20 sávszűrő lett elhelyezve. Az anti-Stokes frekvencia a Ti-zafir 796 nm hullámhosszú pumpalézer, és a 1028 nm-es Yb-szálerősítő rendszer által keltett Stokes pulzusok kombinálásával értük el.

4.14. Time lapse képalkotás

Z-stack optikai képsorozat felvételeket készítettünk 60 percenként 10 órán keresztül a fehér állományról. A z-stack képsorozatok közötti lépték $0,67\ \mu\text{m}$ volt, a felbontás 1024×1024 pixel. A képsorozatokból egyetlen képet készítettünk a maximális-érték projekciójuk alapján.

4.15. Fluoreszcens jelölés

Az agyszeleteket 4% PFA tartalmú 0,1 M koncentrációjú foszfátpuffer oldatban ($\text{pH} = 7,4$) tartottuk $4\ ^\circ\text{C}$ -on 3 órán keresztül. Többszöri 0,1 M koncentrációjú foszfátpuffer oldattal történő mosást követően a metszeteket 10%, majd 20% szacharóz tartalmú foszfátpuffer oldatba helyeztük. Az agyszeleteket néhány másodpercig folyékony nitrogénben fagyasztottuk, ezt követően 10%-os zselatinba ágyaztuk és hideg foszfátpuffer oldatban újrametszettük $60\ \mu\text{m}$ vastag szeletekre (Leica VT 1000S mikrotóm). Az újrametszett szeleteket tris pufferben oldott ($\text{pH} = 7,4$) BODIPY 493/503 ($1\ \mu\text{g}/\text{ml}$; Thermo Fisher Scientific) jelenétében tároltuk $4\ ^\circ\text{C}$ -on egy éjszakán át. A BODIPY 493/503 törzsoldat ($1\text{mg}/\text{ml}$) DMSO-ban volt oldva. Végezetül a szeleteket Vectashield (Vector Laboratories) médiumba ágyaztuk. A BODIPY 493/503 fluoreszcens jeleket LSM 880 konfokális mikroszkóppal (Carl Zeiss, Németország) vizsgáltuk $40\times$ víz immerziós objektívvel (Carl Zeiss, Németország).

4.16. Felvételek kiértékelése

Fluoreszcencia értékeknek a vizsgálata ZEN (Carl Zeiss, Németország) és ImageJ (NIH, USA) programmal végeztük az agyszelet felszínétől számított legalább $20\ \mu\text{m}$ mélységtől. A G-arány meghatározásához a mielinizált rostok belső és külső átmérőjének az arányát számítottuk ki. Azokon a mielinizált rostokon végeztük el a mérést, amelyek egyértelmű jelét mutatták annak, hogy nem károsodtak vagy duzzadt meg. A z-stack optikai felvételeket $1\ \mu\text{m}$ léptékkel készítettük. Az átmérők mérését a mielinizált rostokra merőleges vonal mentén mért fluoreszcencia intenzitás profil alapján végeztük. Az intenzitás profil amplitúdó értékeinek 70%-ánál határoztuk meg az átmérő értékeit Igor pro programban készített egyedi készítésű programparancsokkal (Wavemetrics, Lake Oswego, USA). A mielin törmelék detektálásához és térfogatának vizsgálatához az elkészült z-stack képsorozatokon egyedileg készített C++ programnyelvben íródott analizáló programot használtunk. A program a mielinizált struktúrákat és mielin törmeléket elkülönítette a háttértől, adaptív küszöbölési eljárással. A felvételeken Gauss szűrőt (5×5 pixel keret) alkalmaztunk, amivel a statikus háttér zajból származó fals objektumokat elimináltuk. A detektált pozitív objektumokat Hugh transzformáció használatával szétválasztottuk, amellyel az esetlegesen összekötött mielin

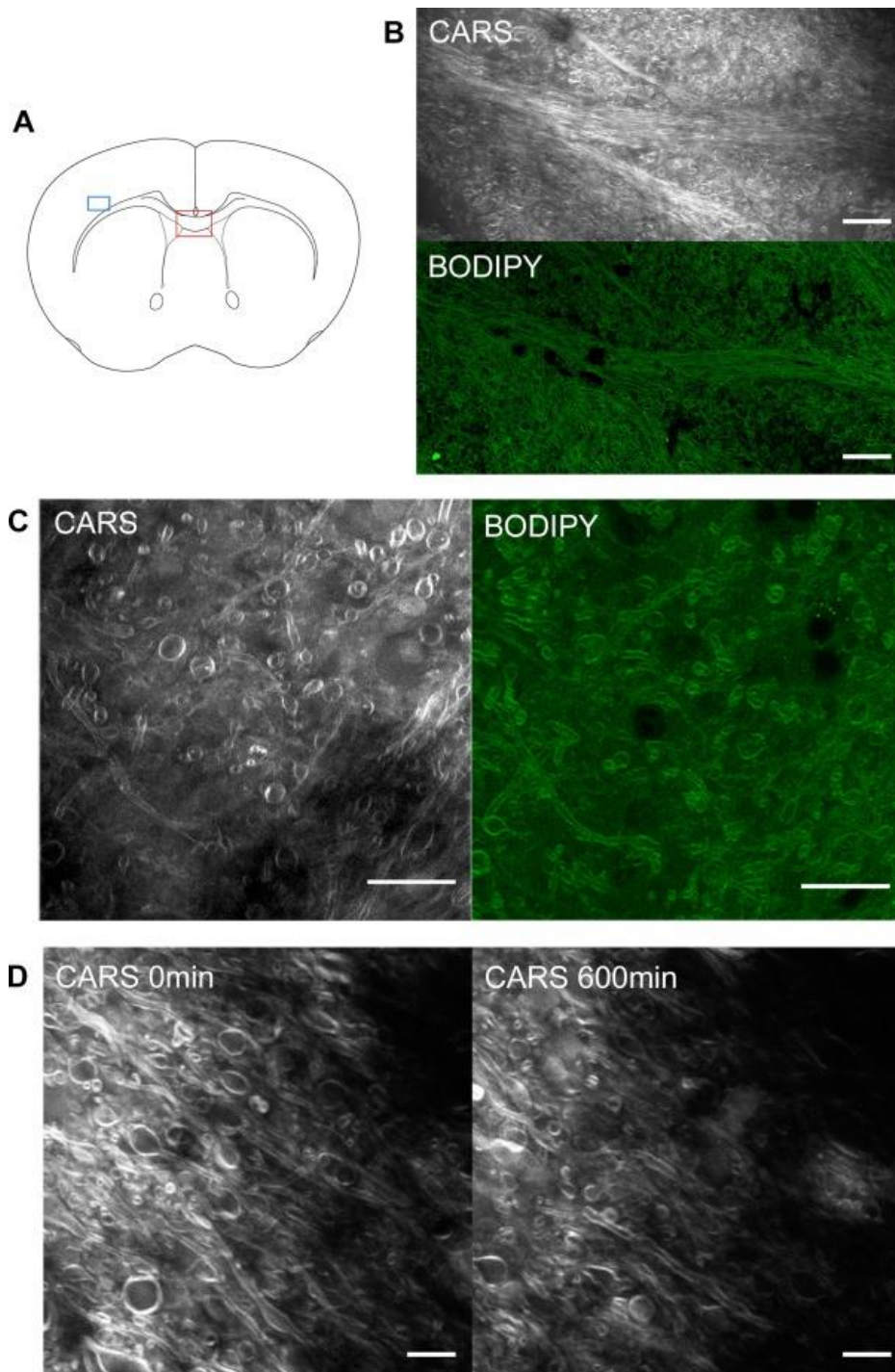
törmelékeket különítettük el egymástól. Ezt követően, a mielin törmeléket a mielintől a méret ($0,3-2\mu\text{m}$) és cirkularitás ($0,8-1,0$) alapján választottuk el. Minden feldolgozott képet ellenőriztük, az esetleges fals pozitív objektumokat manuálisan távolítottuk el. A mielin törmelék térfogata és a kvantitatív mennyisége a rekonstruált háromdimenziós objektumok alapján lett kiszámítva.

5. Eredmények

5.1.1. Lipid gazdag struktúrák megjelenítése CARS módszerrel

A 8 hetes, C57BL/6 egerekből származó akut agyszeletek lipid gazdag struktúráinak vizsgálatához egy egyedi készítésű, koherens anti-Stokes Raman szóródáson alapuló mikroszkóp rendszert használtunk (Fu et al. 2011; Haluszka et al. 2015). A jelöletlen agyszövetben a zsírok eloszlását szinkronizált lézernyalábokkal vizsgáltuk. A lipid molekulákat láthatóvá tettük az által, hogy a CH_2 -es molekulakötést specifikusan gerjesztettük. Ehhez a specifikus gerjesztéshez a lézer nyalábok frekvenciájának a különbsége a CH_2 -es molekuláris kötés vibrációjának frekvenciájával volt megegyező. Annak céljából, hogy igazoljuk a CARS képalkotás specifikusságát lipidekre, immunhisztokémiai kísérletet végeztünk. A CARS képalkotást követően a semleges zsírsavak jelölésére BODIPY festést alkalmaztunk a fixált agyszöveteken, így az azonos agyterületek összehasonlíthatók (**4. A-C ábra**).

Annak érdekében, hogy a klinikai felhasználhatóságát teszteljük a CARS technikának, képalkotó kísérletet végeztünk műtéti úton eltávolított emberi agyszöveten. A CARS képalkotás hosszútávú alkalmazhatóságának a tesztelésére 10 órán keresztül z-stack optikai felvételeket készítettünk. A CARS felvételeken a látható degradáció jelét nem mutató mielinizált rostok G-arányát (a mielinhüvely belső és külső átmérőjének az arányát) vizsgáltuk, ami alapján megállapítottuk, hogy a kísérlet időtartama alatt nem történt szignifikáns változás ($p = 0,57$, t-próba, kísérlet kezdetén: $0,45 \pm 0,1$; $n = 28$; a kísérlet megkezdése után 600 perccel később: $0,46 \pm 0,12$; $n = 32$) (**4. D ábra**).

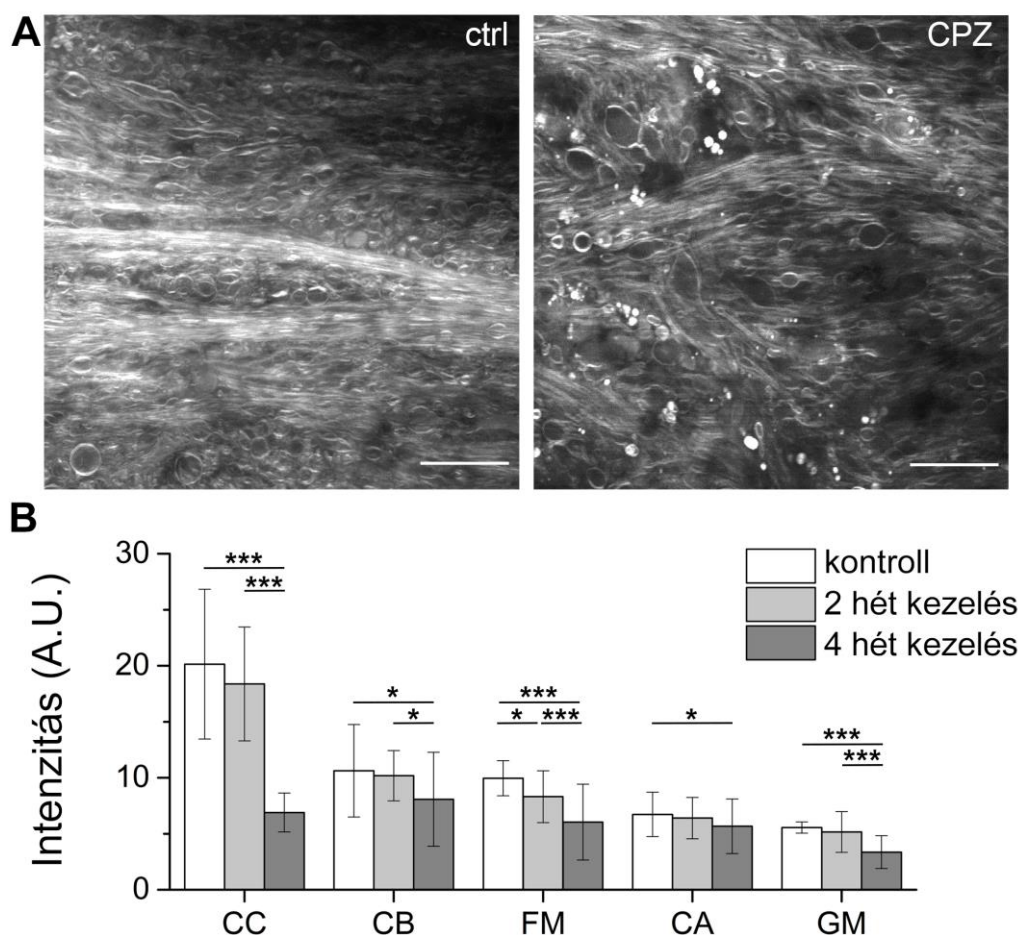


4. ábra: Egér és emberi agyszövet lipid gazdag struktúráinak megjelenítése CARS mikroszkópiás módszerrel

(A) Koronális agymetszetről készített sematikus ábra. A piros és kék négyzettel jelölt területek a (B) és (C) ábrán bemutatott felvételek helyét mutatja. (B) Felső kép: reprezentatív CARS felvétel a corpus callosum területéről egér agyszeletben. Alsó kép: Ugyanaz a terület BODIPY immunhisztokémiai jelölést követően. (C) Bal oldali kép: CARS felvétel a szürke állomány és a corpus callosum közötti területről egér agyszeletben. Jobb oldali kép: Ugyanaz a terület BODIPY immunhisztokémiai jelölést követően. (D) Reprezentatív CARS felvételek emberi agyszövetről timelapse felvétel sorozat elején (bal) és végén (jobb). Mikroszkópos lépték: (B,C) 20 μm , (D) 5 μm .

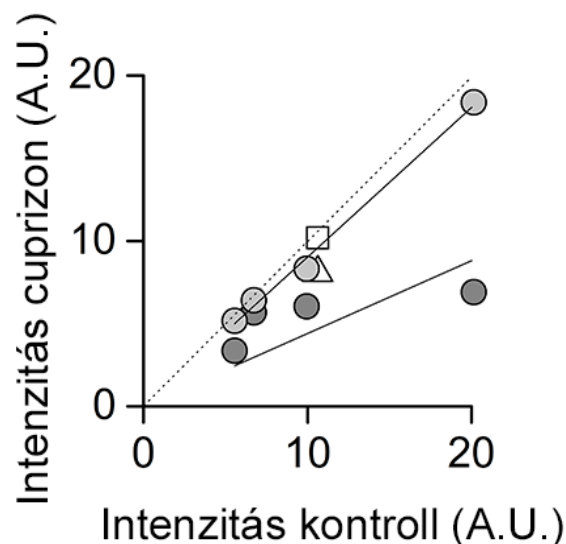
5.1.2. Demielinizáció detektálása cuprizon kezelt állatokban CARS képalkotással

A lipid denzitás vizsgálatához a CARS jelek átlagos pixel intenzitás értékeit mértük meg egységnyi négyzetformájú területeken ($100\ \mu\text{m}^2$) az agy különböző területein. A mérések során CARS jelintenzitás szignifikáns különbségeit detektáltunk agyterület függő módon (ANOVA: $p < 0.001$). Az intenzitás értékek a következő sorrendben csökkentek az agyterületeken: kérgestest (CC) > kisagy (CB) > laterális része a kérgestestnek (FM) > anterior kommisszura (AC) > elsődleges szomatoszenzoros szürkeállomány (GM) (5. A-B ábra). A mielinizált területek összehasonlításával a legmagasabb (CC) és a legalacsonyabb (CA) mértékben mielinizált rostok között háromszoros különbséget detektáltunk. Az elsődleges szomatoszenzoros szürkeállomány és a különböző fehérállományok között 1,2-3,6-szoros (CA/GM és CC/GM) CARS jelintenzitás különbséget tapasztaltunk.



5. ábra CARS jelintenzitáson alapuló lipid tartalom vizsgálat

(A) Reprezentatív CARS felvétel kontroll (bal) és 4 hét cuprizon kezelést követően (jobb) a corpus callosumról. (B) A képen látható CARS jelek intenzitás átlagának vizsgálatával a mielin denzitás eltérő értékei láthatóak különböző agyterületeken kontroll, 2 és 4 hetes cuprizon kezelést követően. ANOVA Tukey-próba: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. (ctrl: kontroll, CPZ: cuprizon, CC: kérgestest, CB: kisagy, FM: laterális része a kérgestestnek, AC: anterior kommisszura, GM: elsődleges szomatoszenzoros agykérgi állomány)



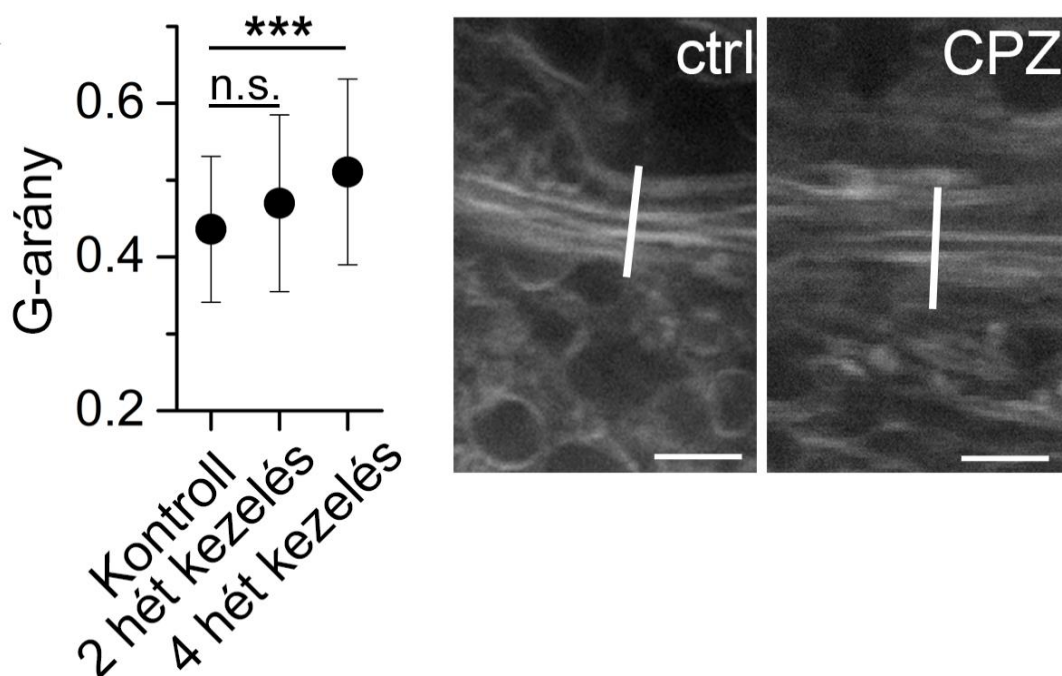
6. ábra: Kontroll és kezelt csoport lipid tartalmának összehasonlítása CARS módszerrel

Átlagos pixelintenzitás összehasonlítása szórásdiagramon kontroll és kezelt állatokban. Szürke színárnyalat a kezelés időtartamát jelzi – világos szürke: kettő hét; sötét szürke: négy hét. A kisagyból származó adatokat (üres négyzet: kettő hetes kezelés; üres háromszög: négy hetes kezelés) nem vettük figyelembe az illesztés során (lásd diszkusszió).

A kontroll állatokban végzett CARS jelek detektálását követően SM modell állatokat vizsgáltunk, amelyekben kísérletes úton váltottunk ki demielinizációt. Az érett oligodendrociták szelektív lézióját kémiai ágenssal, cuprizonnal végeztük. Az így kialakított modellben a hippokampusz és a fehérállomány mielin károsodása jól ismert (Goldberg et al. 2015; Imitola et al. 2011; Koutsoudaki et al. 2009; Skripuletz et al. 2008). C57BL/6 egereket 2 vagy 4 hétig kezeltünk, ez alatt 0.2% cuprizon tartalmú standard porított tápot kaptak az állatok. A kezelést követően az állatokból készült akut agyszöveteken végzett CARS képalkotást követően a jelek átlagos pixel intenzitás értékeinek a szignifikáns csökkenését tapasztaltuk (**5. B ábra, 6. ábra**) (MW U próba: $p < 0,001$). A kontroll értékekhez viszonyítva a CARS jel intenzitás 84,2-34,2% között csökkent agyterületre specifikusan. A legnagyobb lipid tartalmú, 34,2%-es csökkenést a kérgestestben detektáltuk. A mielin degradáció aránya korrelált a kontroll körülmények között mérhető jelintenzitással, tehát a legnagyobb lipid tartalmú területek vannak kitével a legnagyobb károsodásnak a kezelés folyamán.

CARS képalkotással figyelemmel követtük a kérgestest területén az egyes mielinizált nyúlványok degradációját is. Ennek vizsgálatához meghatároztuk a G-arányt azokon a mielinizált rostokon, amelyekről egyértelműen megállapíthattuk, hogy agyszeletkészítés során fellépő károsodáskor nem degenerálódtak. Korábbi tanulmányokkal összhangban (Lindner et al. 2007; Silvestroff et al. 2012), a G-arány szignifikáns növekedését detektáltuk cuprizon

kezelt állatokban (0.52 ± 0.11 , $n = 92$ $n = 6$ állatból; t-próba, $p < 0.001$) a kontroll csoporthoz viszonyítva (0.43 ± 0.09 , $n = 115$, $n = 5$ állatból) (**7. ábra**)

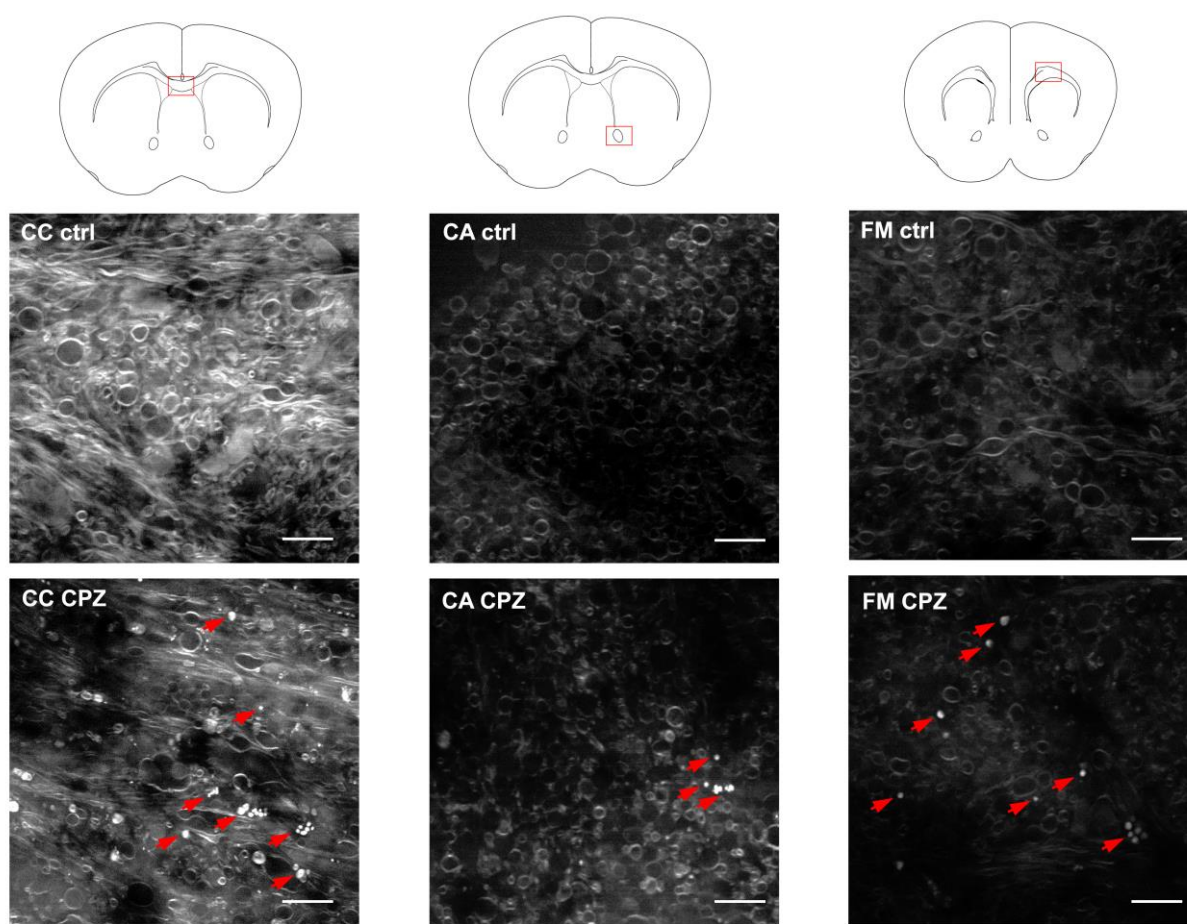


7. ábra: Mielinhüvely vastagságának a vizsgálata kontroll és kezelt állatokban

G-arány változás mielin hüvelyben cuprizon kezelés hatására. Reprezentatív CARS felvételek láthatóak kontroll (bal) és 4 hetes cuprizon kezelést követően (jobb). A CARS jelek pixelintenzitása a mielin hüvelyekre merőleges fehér vonallal jelzett területeken történt. MW U próba: *** $p < 0,001$. Léptékek: (A) 20 μm ; (D) 5 μm . (ctrl: kontroll, CPZ: cuprizon)

5.1.3. Lipid tartalmú törmelék mennyiségének meghatározása mielinizált struktúrákban

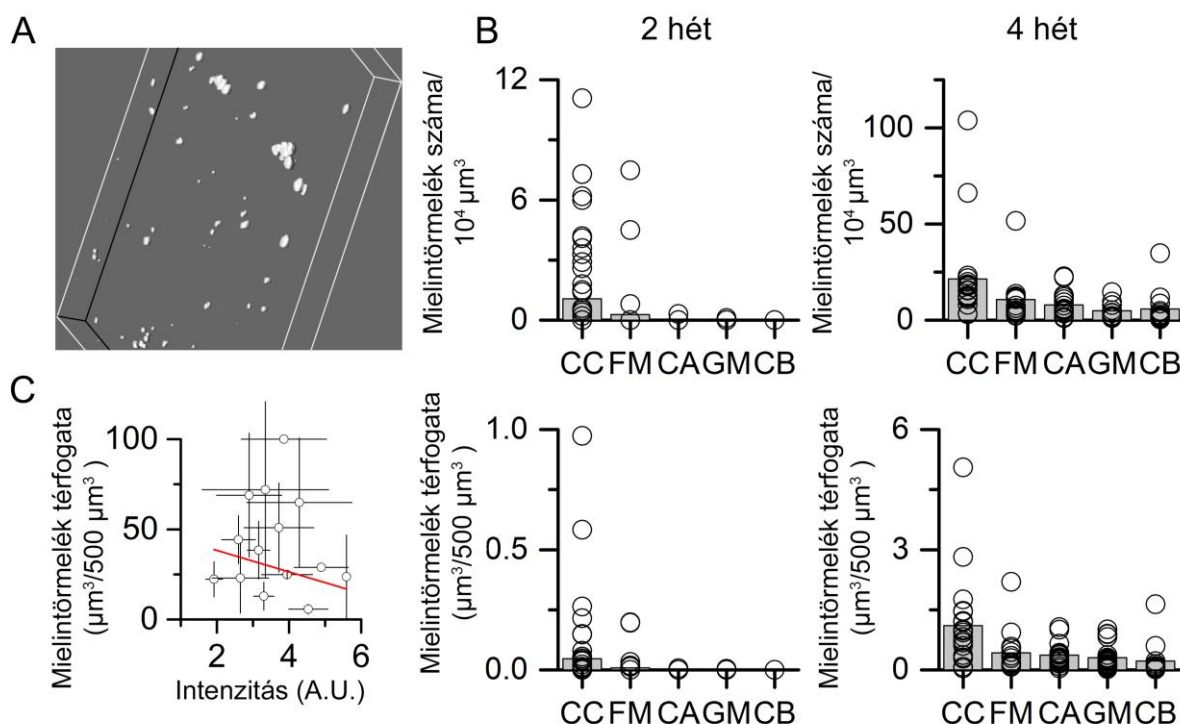
A CARS képalkotó kísérletek során a cuprizonnal kezelt állatok agyában lipid tartalmú részecskéket detektáltunk (**8. ábra**). Mindegyik kezelt állatnál, a mielinizált rostok mentén jelentkezett a gömb alakú, 0,3-2 μm átmérővel rendelkező lipid törmelék, amely minden vizsgált agyterületen megjelent. Számszerűsítésükre kettő módszert alkalmaztunk: (1) meghatároztuk a különálló lipid tartalmú törmelék számszerinti mennyiségét és a (2) háromdimenziós térben elfoglalt térfogatát (**9. A ábra**).



8. ábra: Lipid tartalmú törmelék előfordulása különböző agyterületeken

Reprezentatív CARS felvételek kontroll (középső sor) és 4 hetes cuprizon kezelést követően (alsó sor) a sematikus ábrákon jelzett agyterületeken (felső sor). Piros nyilak jelzik az egyesével előforduló vagy agglomerátumot képző mielin törmeléket. (ctrl: kontroll, CPZ: cuprizon, CC: kérgestest, FM: laterális része a kérgestestnek, AC: anterior kommisszúra). Léptékek: 10 μm .

A lipid törmelék eltérő mennyiségben jelent meg különböző agyterületeken. Mielin törmeléket a legnagyobb mennyiségben ($21,38 \pm 23,29$ részecske/ $10^4 \mu\text{m}^3$) és térfogatban ($1,1 \pm 1,14 \mu\text{m}^3/500 \mu\text{m}^3$, $n = 6$ állat, $1,001 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ teljes térfogaton vizsgálva) a kérgestestben detektáltunk ($p < 0,001$, egymintás Wilcoxon-próba), míg a legkevesebbet a kisagyban detektáltuk (mennyiség: $5,8 \pm 8,94$ részecske/ $10^4 \mu\text{m}^3$; térfogat: $0,22 \pm 0,43 \mu\text{m}^3/500 \mu\text{m}^3$; $n = 6$ állat, $7,01 \times 10^5 \mu\text{m}^3$ teljes térfogaton vizsgálva) (**9. B ábra**). A különböző agyterületeken eltérő mennyiségű lipid tartalmú törmelék akkumulációját figyeltük meg (CC > FM > CA > GM, kivéve CB). Ezeken az agyterületeken az átlagos CARS jelintenzitás (a törmelékből származó CARS jelet nem számítva) értékét hasonlítottuk össze az akkumulált törmelék mennyiségével. Szignifikáns negatív korrelációt találtunk a törmelékmentes területek CARS jelintenzitásának és a törmelék által elfoglalt térfogat nagysága között (**9. C ábra**), ami alapján feltételezhető, hogy a lipid tartalmú törmelék a károsodott mielinizált rostokból származik. Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a demielinizáció és törmelék akkumuláció folyamatát a kezelés korai szakaszában, megismételtük a kísérleteket kéthetes cuprizon kezeléssel átesett állatokon.



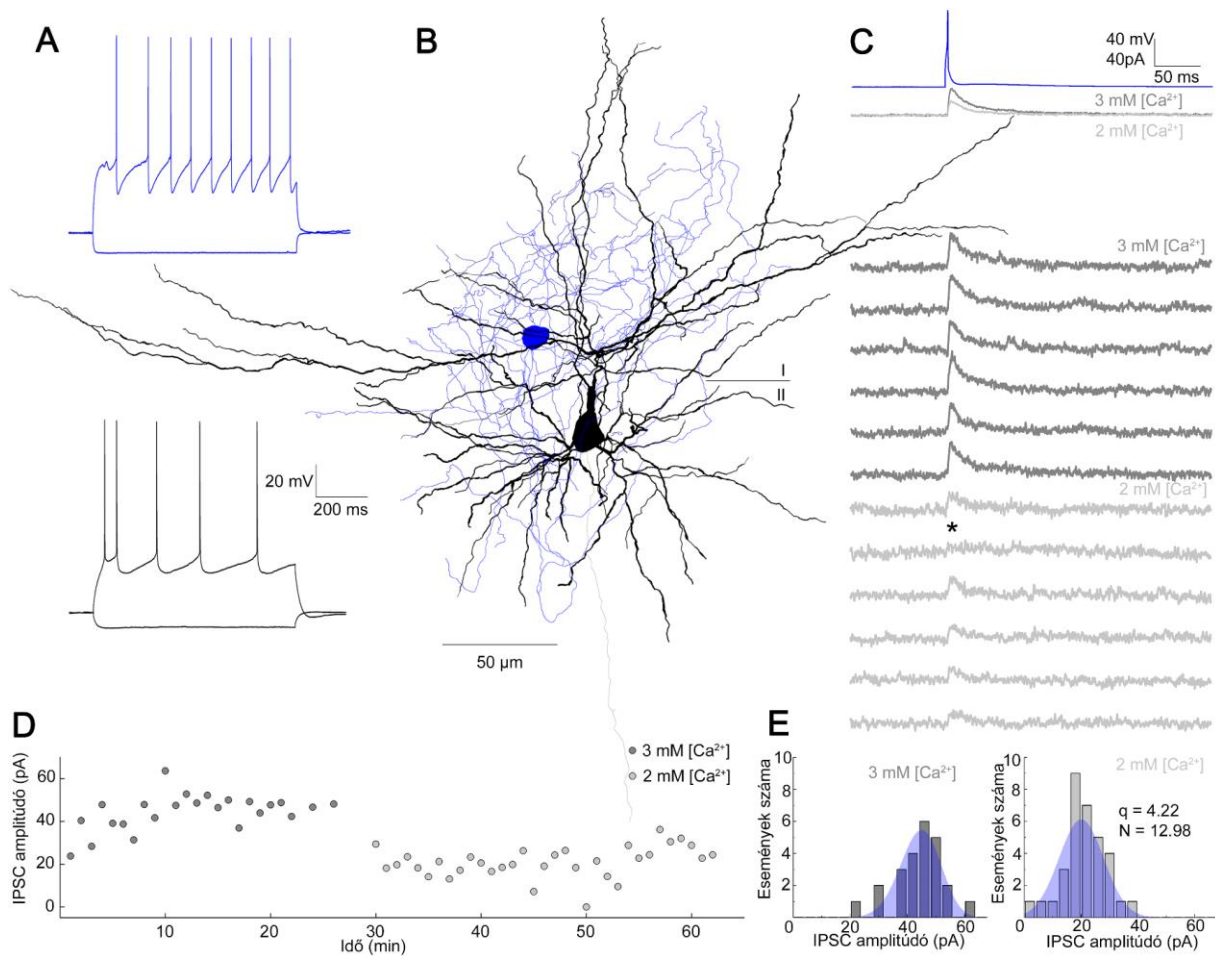
9. ábra: Mielin törmelék mennyiségének kvantifikálása mielinizált struktúrákban

(A) Mielin törmelék reprezentatív háromdimenziós rekonstrukciója cuprizon kezelt állatból származó agyterületről (dimenziók: $71 \times 71 \times 10 \mu\text{m}$). (B) Mielin törmelék előfordulásának (felső sor) és térfogatának (alsó sor) a kvantifikálása különböző agyterületeken kettő (bal oszlop) és négy hetes (jobb oszlop) kezelést követően. (C) Négyhetes kezelést követően a CC, FM és CA területén mért mielin törmelék térfogatának a mennyisége és a CARS jelek intenzitása negatív korrelációt mutat a szórási diagrammon. Piros vonal jelzi a súlyozott lineáris illesztést, Pearson $r = -0,08$, $p = 0,78$.

Ebben a periódusban a mielinhüvely károsodás és lipid tartalmú törmelék megjelenés kevésbé volt kifejezett. Két hetes cuprizon kezelést követően a kérgestest területén a mielinizált rostok G-arányában nem találtunk szignifikáns változást ($0,47 \pm 0,11$, $n = 62$ $n = 6$ állatból; t-próba, $p = 0,07$) (**7. ábra**). A mielin törmelék akkumuláció tekintetében a korábban bemutatott eredményekhez hasonló agykéregspecifikus eloszlást figyeltünk meg. A kérgestest tartalmazott legnagyobb számban és térfogatban lipid törmeléket (mennyiség: $1,07 \pm 2,20$ részecske/ $10^4 \mu\text{m}^3$; térfogat: $0,046 \pm 0,15 \mu\text{m}^3/500 \mu\text{m}^3$, $n = 6$ állatból, $5,8 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ teljes térfogaton vizsgálva; $p < 0,001$, egymintás Wilcoxon-próba (**9. B ábra**)). A négy hetes cuprizon kezelésben részesült állatokhoz hasonlóan a legkisebb mennyiségben a kisagyban volt detektálható mielin törmelék ($n = 6$ állat, $5,5 \times 10^6 \mu\text{m}^3$) (**9. B ábra**).

5.2.1. Egyes neurogliaform sejt által alkotott gátló kapcsolatok funkcionális és strukturális paramétereinek jellemzése

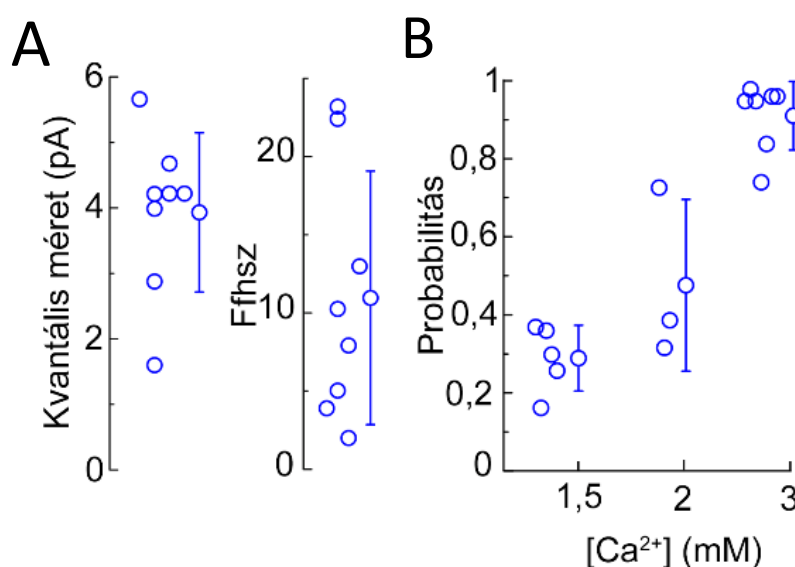
Az eddigi, laborunk által közölt tudományos munka alapján ismert, hogy a NGF sejt aktivációját követően a preszinaptikus terminálisokból felszabaduló GABA képes a közelben levő posztiszinaptikus sejtek receptorait aktiválni (Oláh et al. 2009). Ahhoz, hogy meghatározzuk a lehetséges effektív távolságát a térfogati transzmisszióknak, NGF sejtekről érkező gátló kapcsolatokat jellemeztünk posztiszinaptikus piramissejteken. E célból *in vitro* két csatornás whole-cell patch clamp elvezetésekét végeztünk 1. rétegi NGF sejt és 2./3. rétegi piramissejteken patkány szomatoszenzoros agykérgi preparátumokon. Az elektrofiziológiai kísérletek során a NGF sejteket és piramissejteket a karakterisztikus aktív és passzív membrán tulajdonságai alapján azonosítottuk. A neurogliaform sejtek nyugalmi membránpotenciálja -70mV környékén található, valamint kis bemenő ellenállással és gyors membrán időállandóval rendelkeznek. A depolarizáló áramlépcső hatására többnyire késői tüzelés figyelhető meg, amit a reobázis környékén lassú emelkedő ún. „ramp” szakasz előz meg. Tüzelési mintázata nem akkomodál, hanem gyakran nagyobb frekvenciájúvá válik a depolarizáció során. Az akciós potenciált jellegzetes, nagy utóhiperpolarizációs szakasz követi. Piramissejtek esetében a nyugalmi membránpotenciál érték többnyire -60 mV körül mérhető, membránjuk időállandója lassú. Depolarizáló áramlépcső során alacsony frekvenciájú, akkomodáló tüzelési mintázatot mutat, alkalmanként nagyobb frekvenciájú „burst” aktivitással az áramlépcső elején (**10. A ábra**). Az elvezetések során a preszinaptikus és posztiszinaptikus idegsejteket az elektródában található intracelluláris oldatban található biocytinnel töltődtek fel, amely a későbbi anatómiai azonosítást (**10. B ábra**) és a kapcsolat strukturális vizsgálatát tette lehetővé. Az elektrofiziológiai elvezetések során a NGF sejtekben kiváltott egyetlen akciós potenciál hatására kétfázisú, GABA_A és GABA_B receptor által közvetített posztiszinaptikus választ vált ki (Tamás et al. 2003). Ahhoz, hogy a funkcionális felszabadulási helyek számát meghatározzuk, kiváltott IPSC sorozatokat regisztráltunk piramissejteken változó extracelluláris Ca²⁺ és Mg²⁺ koncentrációjú elvezető oldatban (**10. C ábra**). Az kiváltott IPSC amplitúdók nagysága adekváтан változott a magas (3mM) és csökkentett (2mM) Ca²⁺ koncentráció függvényében, összhangban a csökkenő preszinaptikus felszabadulási hatékonysággal (**10. D ábra**). A NGF sejtek által kiváltott posztiszinaptikus válaszok sűrű ismétlése csökkenti a preszinaptikus felszabadulás hatékonyságát (Karayannis et al. 2010). Annak érdekében, hogy elkerüljük a szinaptikus depressziót a NGF sejteken kiváltott



10. ábra: NGF sejtről piramis sejtre érkező gátló kapcsolat kvantális paramétereinek jellemzése

(A) Jellegzetes tüzelési mintázata a preszinaptikus NGF sejtnak (kék), illetve a posztzinaptikus piramis sejtnak (fekete). (B) Fénymikroszkópos vizsgálat alapján elkészített három dimenziós rekonstrukció az elektrofiziológiailag elvezetett és biocytinnel feltöltött NGF sejtről (sejttest és axon kékkel jelölve) és piramis sejtről (sejttest és dendritek fekete, axon szürke). (C) A NGF sejten rövid áramimpulzus stimuláció által előidézett preszinaptikus akcióspotenciál (kék) hatására a posztzinaptikus piramis sejten megjelenő IPSC-k átlaga -50mV tartó áramon, különböző extracelluláris Ca^{2+} koncentráció alatt (sötét szürke: 3mM Ca^{2+} ; világos szürke: 2mM Ca^{2+}). Lejjebb egyes preszinaptikus akcióspotenciál által kiváltott reprezentatív IPSC-k bemutatása különböző Ca^{2+} koncentrációk alatt. Csillaggal jelöltük a sikertelen szinaptikus transzmissziót. (D) A kísérlet alatt kiváltott IPSC amplitúdója magas (3mM; sötét szürke) és alacsony (2mM; világos szürke) extracelluláris Ca^{2+} tartalmú elvezető oldatban. (E) Magas (3mM) és alacsony (2mM) extracelluláris Ca^{2+} tartalmú oldatban elvezetett IPSC amplitúdók eloszlásának hisztogramja. Kékkel a binomiális eloszlás illesztése látható.

akcióspotenciálok közötti egy perc szünetet határoztunk meg. Ezek a megkötéseket szem előtt tartva $n=8$ NGF sejt-piramissejt kapcsolt párról vezettünk el, ahol páronként átlag $65,5 \pm 5,264$ kiváltott választ, különböző $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ koncentráció által megszabott felszabadulási feltétel alatt átlag $32,75 \pm 4,155$ kiváltott választ regisztráltunk. A limitált mennyiségben kiváltható válaszok kiértékeléshez Bayesian Quantal Analízis (BQA) használtunk, ami robusztus statisztikai alapú becsléssel képes a kvantális paraméterek meghatározására. BQA a két különböző preszinaptikus felszabadulási állapot alatt regisztrált IPSC-k amplitúdóinak az eloszlása alapján binomiális illesztést végez (**10. E ábra**), továbbá ebből az eloszlásból történik a kvantális paraméterek levezetése. BQA alapján az összes kísérletből származó funkcionális felszabadulási helyek számának átlaga $10,96 \pm 8,1$, illetve a kvantális méret átlagosan $q=3,93 \pm 1,21$ pA volt (**11. A ábra**). Ezen felül a funkcionális felszabadulási helyeken a neurotransmitter felszabadulásának a Ca^{2+} függését is meghatároztuk (**11. B ábra**).

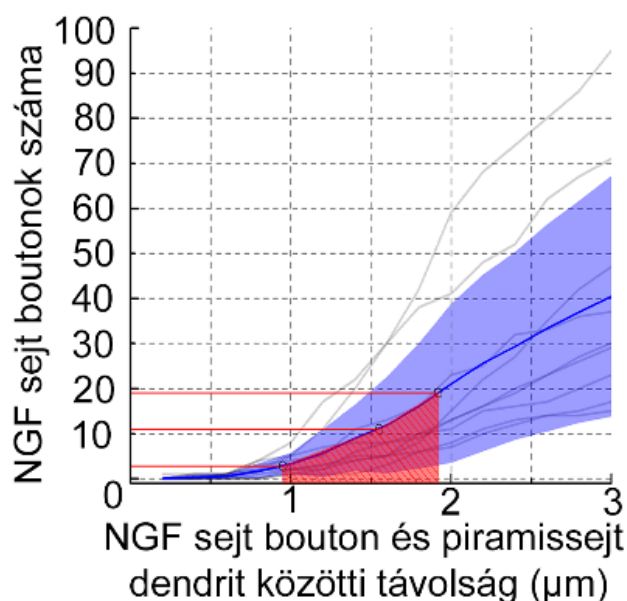


11. ábra: NGF sejtről piramissejtre érkező gátló kapcsolatok kvantális paraméterei

(A) Bayesian kvantális analízissel megbecsült kvantális méret ($3,93 \pm 1,22$ pA) és a funkcionális felszabadulási helyek ($10,96 \pm 8,1$) száma és átlaguk. (B) Különböző extracelluláris Ca^{2+} koncentráció során a felszabadulási valószínűség becslött értéke egyes kísérletek során.

Az által, hogy az elvezett funkcionálisan kapcsolt sejtpárokról teljes három dimenziós rekonstrukciót készítettünk, lehetőségünk nyílt a becslött funkcionális felszabadulási helyek számát összehasonlítani a lehetséges anatómiai strukturális felszabadulási helyek számával. A lehetséges kapcsolatok számát meghatároztuk az által, hogy a preszinaptikus boutonok mennyiségét összegezzük a posztzinaptikus dendrittől való távolság függvényében (**12. ábra**). Meglehetősen alacsony számú közvetlen egymás mellett ($0 \mu\text{m}$) elhelyezkedő preszinaptikus bouton és posztzinaptikus dendrit szakaszt találtunk, azonban a köztük levő távolság

növelésével (3 μm -ig) a potenciális anatómiai kapcsolatok száma jelentősen növekszik. A BQA által meghatározott funkcionális felszabadulási helyek számának a vízszintes tengelyre való rávetítésével (**11. ábra**) meghatároztuk, hogy a térfogati transzmisszió effektív hatótávolsága 0,95-től 1,92 μm -ig kell hogy terjedjen.

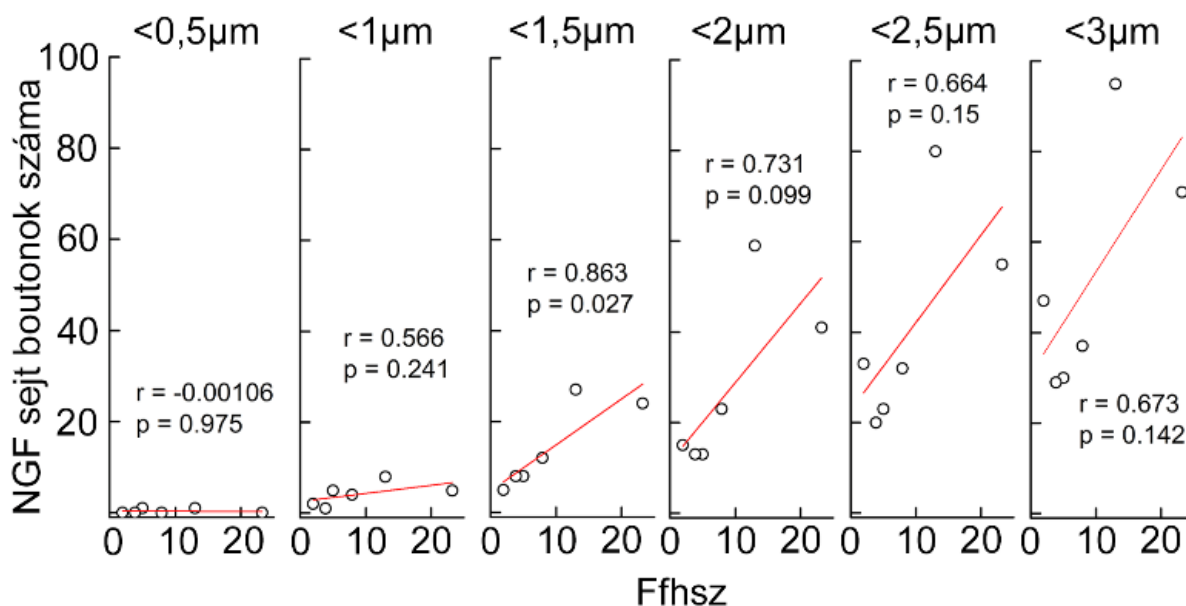


12. ábra: Anatómiai és funkcionális felszabadulási helyek mennyiségének összehasonlítása

NGF sejt – piramissejt kapcsolt párokon végzett fénymikroszkópos anatómiai vizsgálatok által meghatározott egyes NGF sejt boutonok mennyisége, a posztzinaptikus dendrittől való távolság függvényében. Piros vízszintes vonal a funkcionális felszabadulási helyek számának átlaga és standard deviáció értékének a rávetítése a preszinaptikus terminális és posztzinaptikus dendrit közötti távolság tengelyére.

Továbbá megvizsgáltuk a korrelációt a funkcionális felszabadulási helyek száma és a lehetséges strukturális felszabadulási helyek mennyisége között, növekvő preszinaptikus NGF sejt bouton terminális és a posztzinaptikus dendrit szakasz közötti távolság esetén. Abban az esetben, ha feltételezzük, hogy kizárólag kevesebb mint 1 μm távolság van a pre és posztzinaptikus struktúrák között, úgy a funkcionális adatokkal való korreláltatás esetén nem található lineáris összefüggés ($< 0,5 \mu\text{m}$ esetén $r = -0,00106$ $p = 0,975$; $< 1 \mu\text{m}$ esetén $r = 0,566$ $p = 0,241$). Erős lineáris korrelációt és statisztikai szignifikanciát lehet megfigyelni, amennyiben a távolság 1,5 μm -re növekszik ($< 1,5 \mu\text{m}$ esetén $r = 0,863$ $p = 0,027$). Ahogy tovább növekszik a távolság egészen 3 μm -ig, úgy a lineáris korreláció folyamatos csökkenést mutat, habár

mérsékelt összefüggés továbbra is fennáll ($< 2 \mu\text{m}$ esetén $r = 0,731$ $p = 0,099$; $< 2,5 \mu\text{m}$ esetén $r = 0,664$ $p = 0,15$; $< 3 \mu\text{m}$ esetén $r = 0,673$ $p = 0,142$; **13. ábra**).



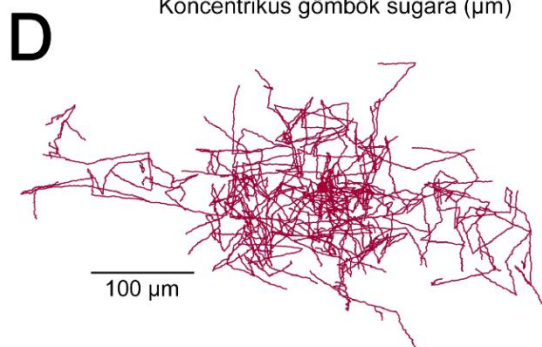
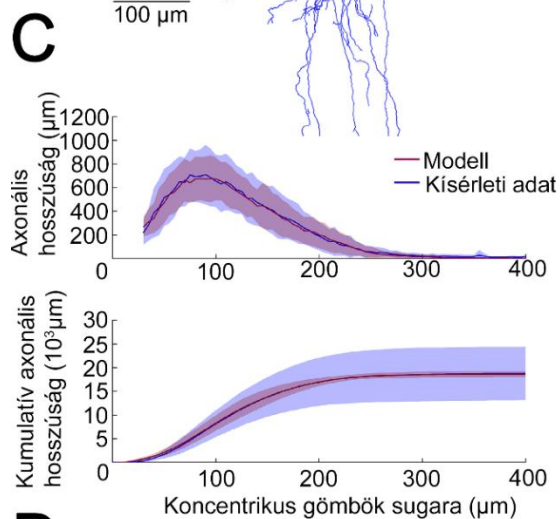
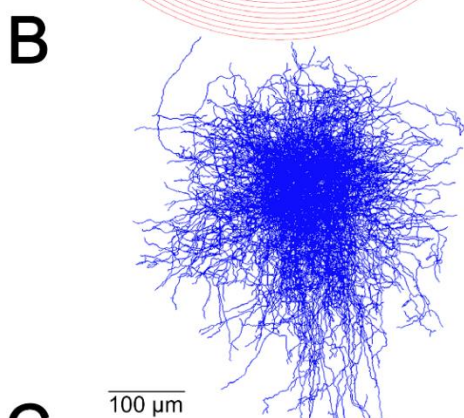
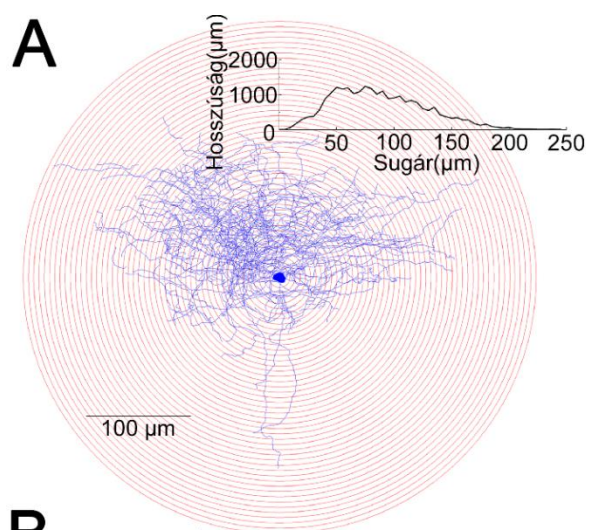
13. ábra: Anatómiai és funkcionális felszabadulási helyek mennyisége a távolság függvényében

Funkcionális felszabadulási helyek száma korreláltatva az strukturális vizsgálatokból származó potenciális anatómiai kapcsolatok számával, növekvő távolság függvényében.

5.2.2. Első rétegi neurogliaform sejthálózat által alkotott gátló kimenetek strukturális jellemzése

A többi interneurontól eltérően a NGF sejt térfogati jelátvitellel képes elérni a távolabbi posztzinaptikus receptorokat. Annak érdekében, hogy megállapítsuk milyen mértékben segíti ez elő a konvergáló bemenetek létrejöttét, biológiailag hű modellrendszert dolgoztunk ki az agykéreg 1. rétegi NGF sejt populáció teljes kimenetéről.

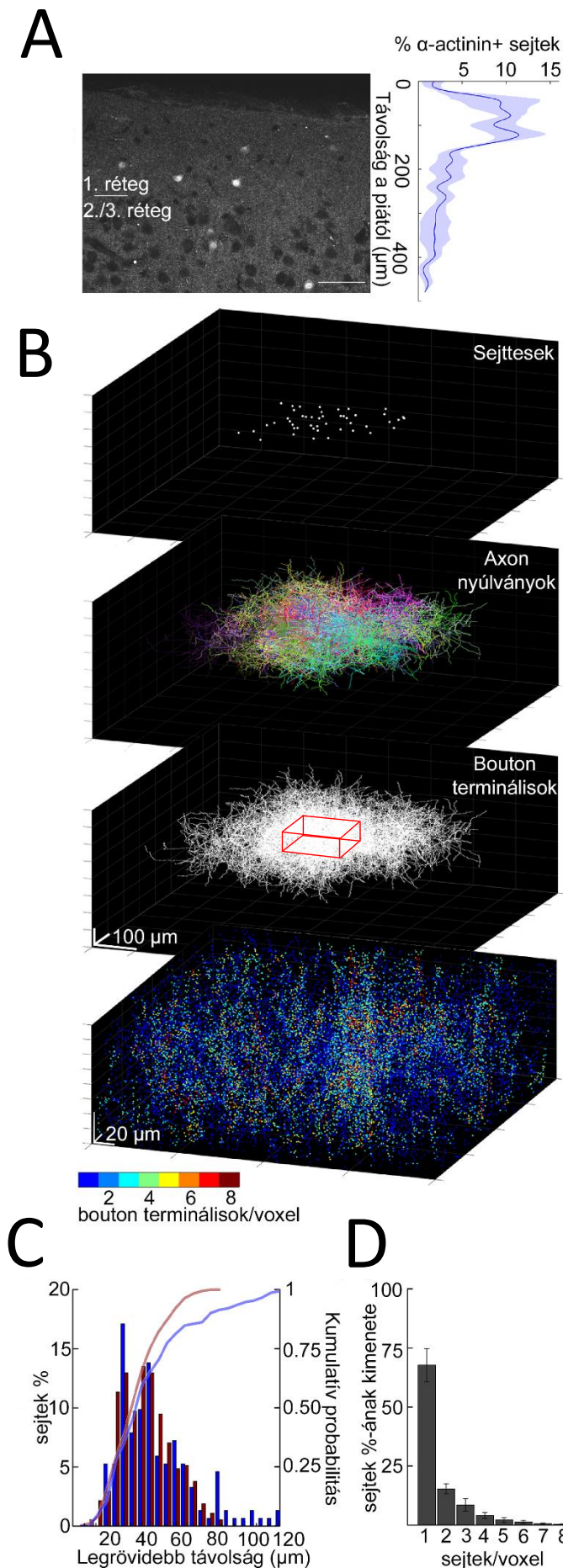
A NGF sejtek gátló kimenete az extrém sűrű axon által lefedett területre korlátozott (Oláh et al. 2009). Következésképpen az egyes NGF sejtekre jellemző axon strukturális paramétereit vizsgáltuk. NGF sejtekről készült rekonstrukciókon Sholl analízis használatával meghatároztuk az egyes sejtek axonjainak hosszúságát (**14. A ábra**). Ezeknek a rekonstrukcióknak ($n=11$) a szómától számított átlag eloszlását vizsgáltuk. Az NGF sejtekre jellemző axon hosszúság és eloszlás alapján számítógépes, biológiailag hű modellsejt megalkotását tűztük ki célul. Számítógépes algoritmusokat készítettünk, amelyek a modell sejtet generálták (**14. D ábra**). A modellsejtek generálásához három paramétert használtunk: (1) axon szakaszok átlagos hosszúságát szórással, (2) az elágazások mennyiségét és (3) axon szakaszok orientációjának értékét. A három paraméter értékeinek megfelelő optimalizálásával véletlenszerűen generált modell sejtet hoztunk létre, amelynek a Sholl analízissel meghatározott átlag axon-hossz eloszlása nagyfokú hasonlóságot mutat a valós NGF sejtekről készült rekonstrukciókkal (**14. C ábra**, $p = 0.99$, kétmintás Kolmogorov-Szmirnov-próba). Az egyes NGF sejtekre jellemző axon struktúráknak a meghatározását követően a felsőrétegi agykéreg NGF hálózatának modelljét rekonstruáltuk. Az α -aktinin2 szelektív strukturális protein az agykéregben található NGF sejtekre (Uematsu et al. 2008). Annak érdekében, hogy egy relatív pontos becslést kapjunk a NGF sejtek és következésképp azok lehetséges axonterminálisainak eloszlásáról, α -aktinin2 immunhisztokémiai jelölést alkalmaztunk az agykéreg felsőbb rétegeiben (**15. A ábra**). A felsőbb rétegekben nagy mennyiségű immunoreaktív szómát figyeltünk meg egészen 150 μm távolságig a piától, azonban a mélyebb rétegekben drasztikusan lecsökken az immunoreaktív szómák mennyisége (**15. A ábra**). A NGF sejtek által alkotott kapcsolatok kvantális paramétereinek eredményei alapján feltételezhető, hogy a NGF sejtek terminálisai felől felszabaduló GABA átlagosan $\sim 1,5 \mu\text{m}$ távolságban képes effektív hatást gyakorolni a posztzinaptikus GABA receptorokra (**12. ábra**). Ezért az agyszövet GABA lefedettséget a teljes NGF sejt populáció axonterminálisaitól számított 1,5 μm diffúziós távolságig határoztuk meg a modellünkben. Az agykéregben található NGF sejthálózat minél realisztikusabb reprodukálása érdekében a modellünkben egy $354 \times 354 \times 140 \mu\text{m}$ térfogatú térben szómákat



14. ábra: Egyetlen neurogliaform sejt átlagos axon eloszlásának a meghatározása

(A) Sholl analízis egy három dimenziósan rekonstruált NGF sejt axon nyúlványain, az átlagos axon eloszlás meghatározására. A beillesztett grafikon bemutatja a Sholl koncentrikus gömbökben elhelyezkedő axon hosszúságokat. (B) Egymásra vetített NGF sejtek axonjának a bemutatása, a rekonstrukciókat a számjuk mentén pozícionáltuk egymásra ($n=11$). (C) Átlagos és kumulatív eloszlása a NGF sejt axon hosszúságnak a távolság főenyében $10\ \mu\text{m}$ -enként növekvő koncentrikus Sholl gömbökben (kék). Ezen adat szolgálta a modell NGF sejt axonjának megfelelő paraméterezését és megalkotását (burgundi). (D) Reprezentatív példa a megalkotott NGF modellsejtről és axonjáról.

véletlenszerűen szórtuk szét a piával megegyező párhuzamos síkban, míg a piával merőleges irányban az α -aktinin2 immun pozitív sejtek eloszlása alapján rendeztük el őket. Mindegyik elhelyezett szómából a modellsejtnak megfelelően axonok erednek, ezen axon szegmensek mentén 3 μ m távolságonként boutonokat helyeztünk el, ezektől a boutonoktól eredő GABA lefedettséget térképeztük fel (**15. B ábra**). A szómák közötti legkisebb távolságot és annak eloszlását megvizsgáltuk az agyszövetben, ehhez hasonlítva ellenőriztük a modellben található szómák közötti legkisebb térbeli távolságot, hogy kizárjuk a lehetőségét annak, hogy az esetleges abnormális aggregáció befolyásolja a NGF kimenetek vizsgálatát ($p=0.51$, kétmintás K-S teszt, $n=152$ α -actinin2+ szóma, 374 modell szóma; **15. C ábra**). Az összes NGF sejt axon boutonjaiból felszabaduló GABA feltérképezése arra utal, hogy az agyszövet egyes egységnyi térfogata maximálisan kevesebb, mint nyolc különböző NGF sejt által elérhető. Ezenfelül az adatok alapján az is megállapítható, hogy extrém körülmények között, ha minden egyes NGF sejt aktív, akkor legfeljebb kettő NGF sejt reprezentált az agyszövet $83,04\pm 5,56\%$ -ban, illetve az agyszövet $32,29\pm 5,01\%$ -ban legalább kettő NGF sejt kimenet konvergálhat (**15. D ábra**).

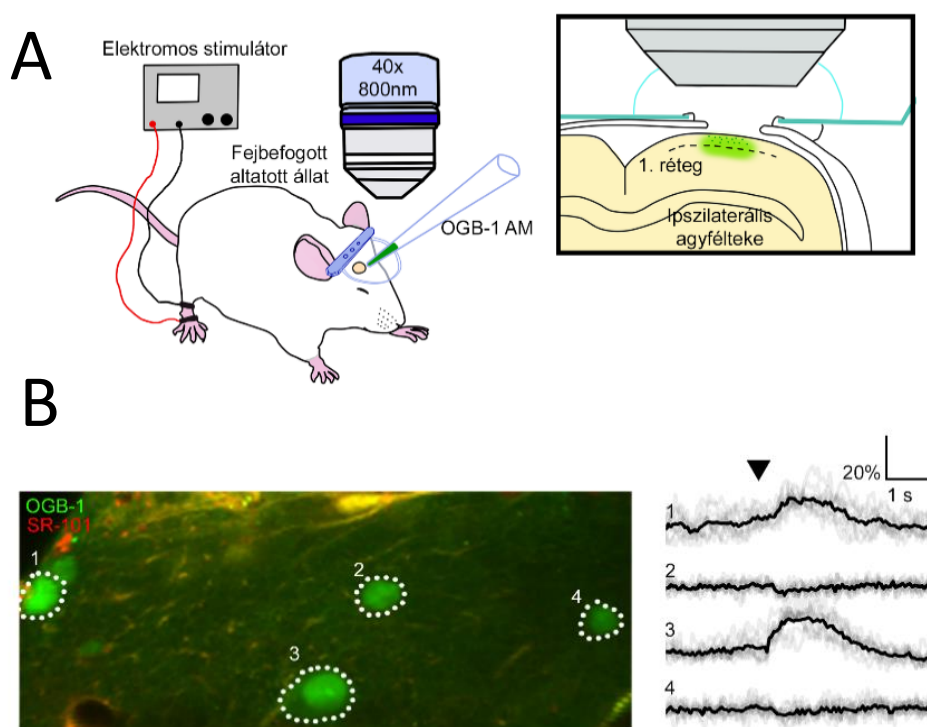


15. ábra: Első rétegi neurogliaform sejthálózat kimenetének térbeli modellje

(A) Balra, konfokális mikroszkópos felvétel az immunohisztokémiailag pozitív α -aktinin2 sejtekről. Jobbra, relatív eloszlása az α -aktinin2+ sejteknek az egyes agykérgi rétegekben. (B) Térbeli elhelyezkedése a modell NGF sejtek Szómájának, axonjának és bouton terminálisainak. Legalul a hőterkép mutatja a NGF sejtek konvergáló bouton terminálisait a bouton terminálisokat bemutató ábra piros téglalappal jelölt térfogatán belül. Szinkódok az azonos pontokon való átfedő bouton terminálisok mennyiségét jelzi, amennyiben az effektív távolsága a térfogati transzmisszióknak $1,6 \mu\text{m}$. (C) Hisztogram és kumulatív előfordulása a szómák között mérhető legkisebb távolságról kísérletes megfigyelés során agykéregben (kék) és a modellben (burgundi). (D) Egy posztszinaptikus egységnyi térfogatra érkező konvergáló NGF kimenetek százalékos mennyisége.

5.2.3. Az első rétegi neurogliaform sejt populáció összehangolt aktivációja szomatoszenzoros agykéregben *in vivo*

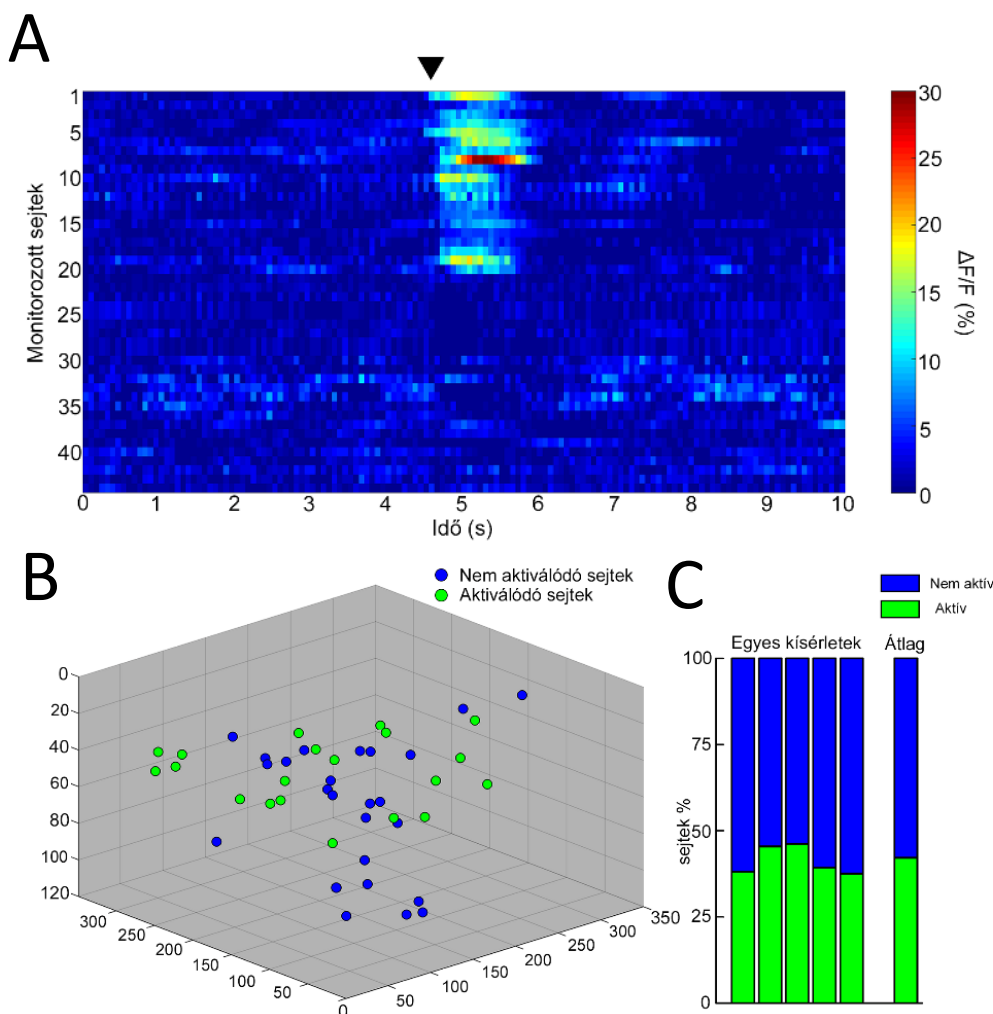
Az első rétegi NGF sejt hálózat által alkotott kimenetek térbeli modellje alapján feltérképeztük a lehetséges egységnyi térfogatra eső konvergáló gátló bemenetek mennyiségét. Azonban az nem ismert, hogy az agykéreg felsőbb rétegeiben milyen arányban fordul elő összehangolt NGF sejt aktiváció, ami az alapját biztosítja a konvergáló bemeneteknek *in vivo* fiziológiás körülmények között. Palmer és munkatársai által korábban bemutatott tanulmányban az agyféltekék között leírt kapcsolat, az interhemiszfériális gátlás során a transzkallozális nyúlványok aktivációjakor GABA_B receptor aktivációt mutattak ki az V. rétegi piramissejtek apikális dendritjén (Palmer et al. 2012). Ahhoz, hogy meghatározzuk az egységesen összehangolt működésű NGF sejtek arányát az agykéreg felsőbb rétegeiben fiziológiás körülmények között, *in vivo* két foton Ca^{2+} képalkotó kísérleteket végeztünk, hogy az első rétegi interneuronok aktivitását nyomon kövessük a transzkallozális bemenetek aktivációja során.



16. ábra: Első rétegi interneuronok aktivitásának a vizsgálata *in vivo*

(A) Kísérleti felállás: fejrögzített, altatott patkányt a mikroszkóp alatt helyeztük el. Kraniális ablakot fűrtünk az állat hátsó végtagi reprezentációért felelős szomatoszenzoros agykérgi területénél. OGB-1-AM és SR 101 festéket juttatunk be az agykérgi első rétegbe. Ca^{2+} -jeleket rögzítettünk az agyterületről, ipsilaterális hátsóvégtagi elektromos stimuláció során. (B) Két-foton mikroszkóppal készült felvétel az OGB-1 festékkel töltött idegesetekről. SR 101 festékkel kizárólag az asztrociták lettek megjelölve. Jobbra: A számokkal jelölt idegsejteken mért $\Delta F/F$ változása a fluoreszcens Ca^{2+} -jeleknek (szürke: egyes Ca^{2+} -jelek; fekete: tíz egymást követő jel átlaga) ipsilaterális végtag stimuláció hatására.

A kísérletek alatt fiatal patkányokon végzett műtét során a hátsó végtagi reprezentációért felelős szomatoszenzoros agyterülete felett koponya ablakot készítettünk. A műtétet követően urethánnal altatott állatokat két-foton mikroszkóp alá, egy fejbefogó keretbe helyeztük az optikai képalkotás mechanikai stabilitásának biztosítása érdekében. A koponyaablakon keresztül Oregon Green BAPTA-1-AM (OGB-1-AM) Ca^{2+} -érzékeny fluoreszcens festéket injektálunk az agykéregi szomatoszenzoros régió első rétegébe (**16. A ábra**). Az oldat a Ca^{2+} -festék mellett szulforhodamin 101 (SR101) strukturális festéket is tartalmazott, amit kizárólag az asztrociták vesznek fel passzívan, így elkülöníthetővé válnak az interneuronok a gliális sejtektől a két-foton mikroszkóp felvételén.

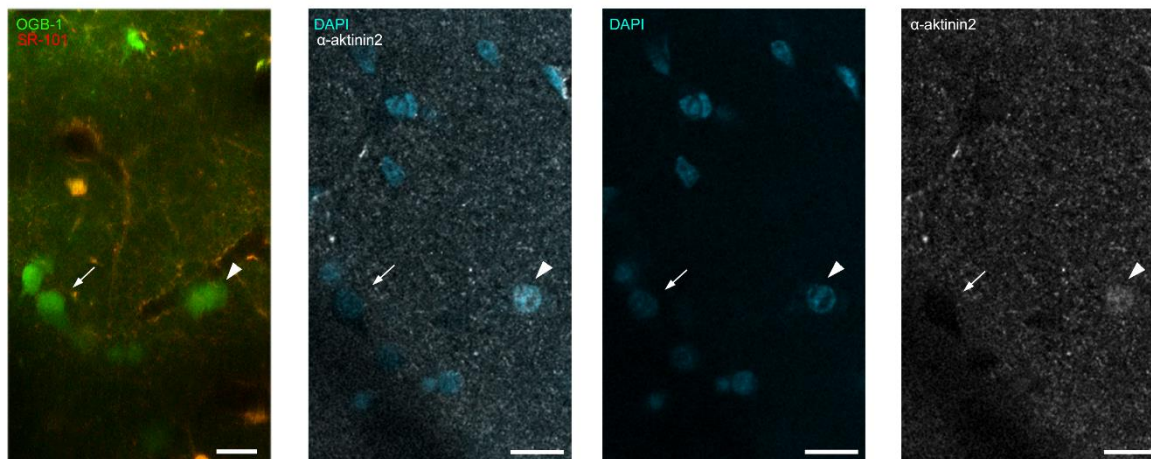


17. ábra: Az első rétegi interneuron populáció összehangolt aktivációja szomatoszenzoros agykéregben *in vivo*

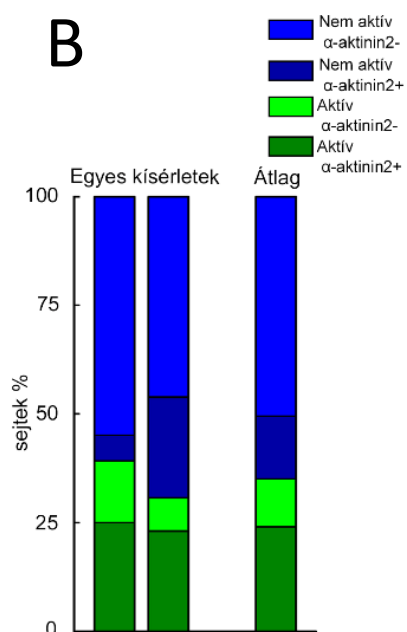
(A) Ipszilaterális stimuláció hatására, egyetlen állatban felvett 44 elsőrétegi idegsejten mért fluoreszcens Ca^{2+} -jel $\Delta F/F$ változás átlagának a hő térképe (sejtenként egymást követő 10 átfutás, stimuláció: fekete nyíl). (B) Térbeli elhelyezkedése a monitorozott első rétegben elhelyezkedő interneuronoknak. A stimuláció hatására aktív sejteket zölddel, a stimuláció hatására nem reagáló sejteket kézzel jelöltük. (C) Halmozott oszlopdiagram mutatja az aktivált/nem aktivált interneuronok arányát különböző kísérletekben ($n = 5$ állat), jobb oldalt az átlag arány figyelhető meg.

Az ipszilaterális hátsó végtag stimulációját követően (200mA áramerősség, 10 ms hosszú áramlépcső) az első rétegi interneuronok szubpopulációján detektáltunk Ca^{2+} -jelek fluoreszcenciaváltozását (**16. B, 17. A ábra**). Összesen 114 idegsejtet vizsgáltunk 6 állatban, ezek közül 46 idegsejt esetében tapasztaltunk aktivációt hátsó végtagi stimuláció során, 68 sejt esetében nem detektáltunk változást a fluoreszcenciában. Összeségében az első rétegi interneuronok $38,22 \pm 5,232\%$ -a reagált az ipszilaterális hátsóvégtag stimulációra, amely jó hasonlóságot mutat Palmer és munkatársai által 2012-ben bemutatott aránnyal (Palmer et al. 2012) (**17. C ábra**). Annak érdekében, hogy a stimulációra aktiválódó sejteket molekulárisan azonosítsuk, immunhisztokémiai jelölést végeztünk α -aktinin2-re. Azokon az agyterületeken, ahol a Ca^{2+} két-foton képalkotó kísérleteket végeztük, immunhisztokémiai jelölést is végrehajtottunk. Az *in vivo* kísérletek során a monitorozott interneuronok pontos koordinátáit rögzítettünk (**17. B ábra**), így lehetőségünk volt az immunhisztokémiai jelölést követően a visszatérképezésre (**18. A ábra**). A hátsó ipszilaterális végtagi stimulációra aktív/inaktív sejteket immunreakcióját megvizsgáltuk a α -aktinin2-re. Az adatok alapján az aktív sejtek többsége α -aktinin2 pozitív (10-ből 15 interneuron, 67%, $n = 2$ állatból), és az inaktív sejtek többsége α -aktinin2 negatív (22-ből 26 interneuron, 85%)(**18. B ábra**). Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy fiziológiás körülmények között, - mint például a szomatoszenzoros információ feldolgozás – populáció szintű NGF sejt aktiváció végbemehet.

A



B



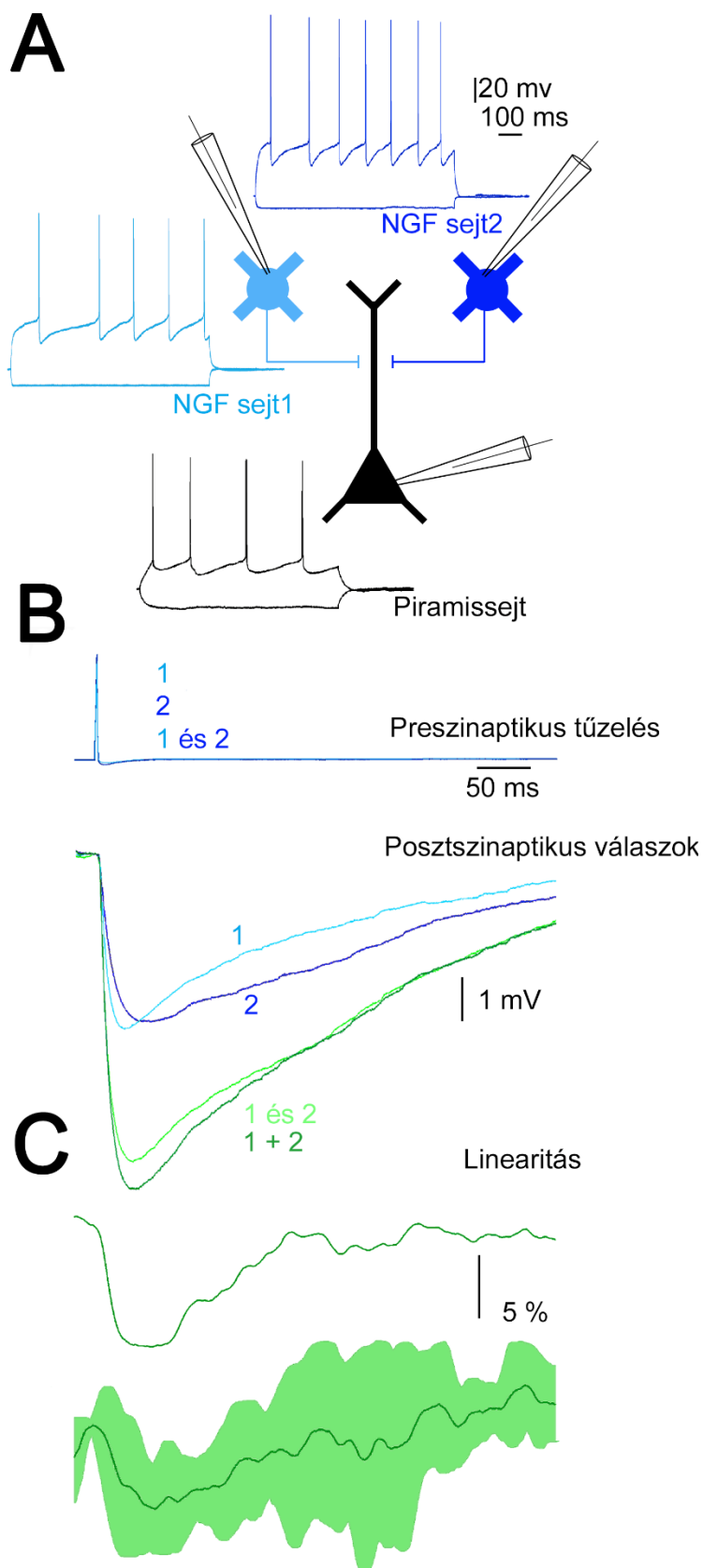
18. ábra: Első rétegi neurogliaform sejtek visszatérképezése

(A) Balról jobbra: *In vivo* két-foton felvétel a mért idegsejtekről. Idegsejtek α -aktinin2 pozitivitásának meghatározása (nyílhegygel jelölve) ugyanarról a területről, immunhisztokémiai festést követően konfokális mikroszkópos felvételen. Kizárólagos DAPI jelöléssel (nyíllal jelölve) az α -aktinin2 negatív idegsejteket azonosítottuk. (B) Halmazott oszlopdiagram mutatja az α -aktinin2 immunoreaktivitás arányát az aktív és nem aktív interneuronok között.

5.2.4. Neurogliaform sejtek által kiváltott konvergens IPSP-k összegződése

Az eddigi eredményeink rávilágítottak arra, hogy a neurogliaform sejtek populáció szintű összehangolt aktivitása *in vivo* körülmények között is lejátszódhat. Az összehangolt működésük révén egyes egységnyi térfogatban többségében 1-3 NGF gátló bemenetek konvergálódhatnak. Ezen gátló bemenetek által ionotróp és metabotróp GABA receptorok merőben különböző lefolyású aktivációja játszódik le. Felmerül a kérdés, hogy milyen lehetséges következményei lehetnek a konvergáló bemeneteknek, milyen törvényszerűségek által összegződnek az ionotróp illetve a metabotróp receptor által közvetített hatások?

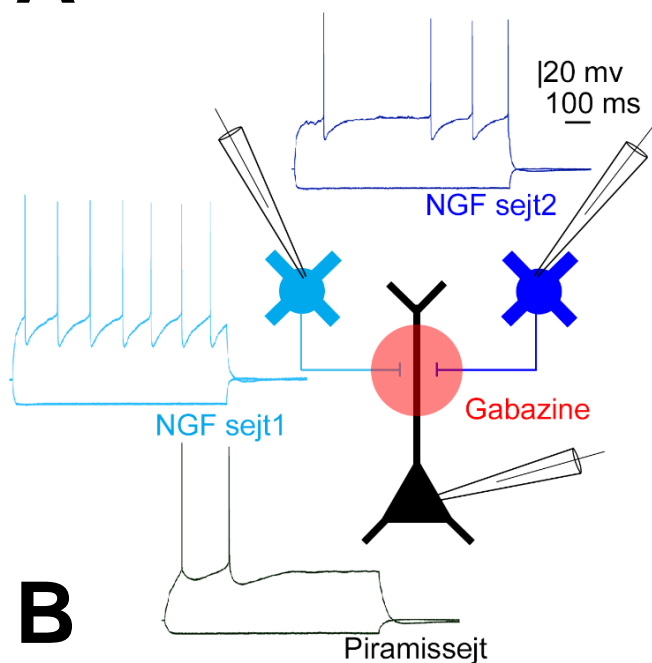
A konvergáló bemenetek integrációjának közvetlen vizsgálatához whole-cell patch clamp méréseket végeztünk *in vitro*, szomatoszenzoros agyszeletből kettő elsőrégi preszinaptikus NGF és egy 2/3-as régei piramissejtről (**19. A ábra**). A szimultán hármas elektrofiziológiai elvezetések során a két preszinaptikus NGF sejtekben rövid depolarizáló áramlépcső injektálásával akciós potenciálokat váltottunk ki külön-külön és együtt, közben a posztzinaptikus piramissejten regisztráltuk az önálló és kombinált gátló NGF bemenetek által generált IPSP-ket (**19. B ábra**). Az összes kísérlet ($n=8$) során önállóan kiváltott kisebb és nagyobb amplitúdójú GABA_A és GABA_B komponensű IPSP-k átlagosan $-1,68 \pm 1,51$ mV és $-2,19 \pm 1,33$ mV nagyságú amplitúdóval rendelkeztek. Kettő NGF sejt bemenet szinkron aktivációkor, ($0,17 \pm 0,05$ ms) kontroll körülmények között szublineáris összegződést ($-9,1 \pm 4,3\%$ -os maximális nem linearitás érték) eredményezett (**19. B ábra**), amely az egyes IPSP-k matematikai összege ($-3,81 \pm 2,76$ mV) és a kísérleti úton mért konvergáló bemenetek által generált IPSP ($-3,57 \pm 2,55$ mV) különbségéből származó érték ($n = 4$, **19. C ábra**). Ezen eredmények összhangban állnak korábbi publikációval, amelyekben azonosított interneuronok felől érkező gyors IPSP-k szublineáris interakcióját írták le (Tamás, Szabadics, and Somogyi 2002). A linearitás időbeli lefolyásának az elején kifejezett a szublinearitás, amely feltehetőleg a GABA_A receptor által közvetített komponense az IPSP-nek. Ezt követően a lineáris érték irányába tolódik el az interakció, amely alapján feltételezhető, hogy az azonos gátló bemenetből származó később aktiválódó GABA_B receptor által közvetített komponens más törvényszerűségek alapján összegeződhet. A GABA_B receptor által közvetített összegződő interakció közvetlen vizsgálatához az előző kísérleteket megismételtük GABA_A receptor antagonistá, gabazin ($10 \mu\text{M}$) jelenlétében. A farmakológiai kísérleteket másik hármas elvezetésekben végeztük ($n = 8$, **20. A ábra**). Ahogy korábbi kísérletek során bemutatták (Tamás et al. 2003), a gabazin inszenzitív, lassú IPSP-k késleltetése, emelkedési ideje és félszélessége



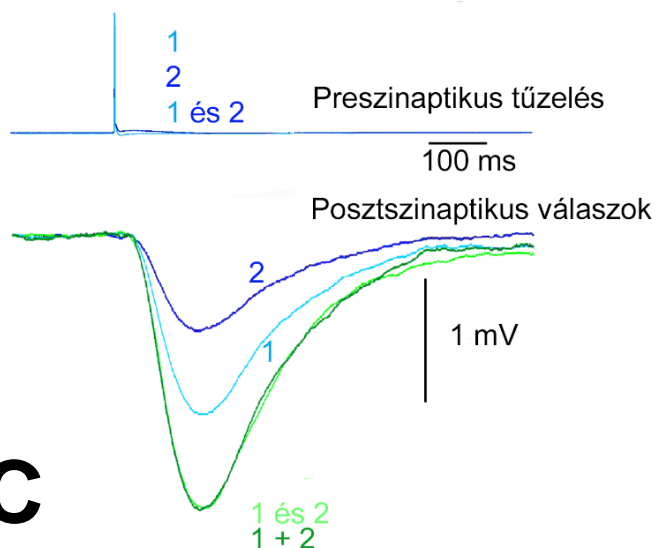
19. ábra: Neurogliaform sejtek által kiváltott konvergens bifázikus GABA_A és GABA_B komponenst tartalmazó IPSP-k összegződése

(A) Sematikus kísérleti felállás a hármass whole-cell patch clamp elvezetésről. Kettő preszinaptikus NGF sejt tűzési mintázata világos és sötét kék színnel ábrázolva, posztzinaptikus piramissejt tűzési mintázata fekete színnel jelölve. (B) Egyénileg (1,2) és szinkron (1 és 2) kiváltott akciós potenciálok hatására megjelenő egyéni (1,2) és konvergáló (1 és 2) IPSP a posztzinaptikus piramissejten. Az egyedi akciós potenciálok által kiváltott IPSP-k összeadása által határoztuk meg az aritmetikai (1+2) összegződő IPSP-t. Legalul a konvergáló (1 és 2) és az aritmetikai (1+2) összegződés időbeli lefutásának a különbsége látható. (C) Több kísérletben mért konvergáló (1 és 2) és az aritmetikai (1+2) összegződés időbeli lefutás különbségének az átlaga (n=4, sötétzöld: átlag, világoszöld: SD).

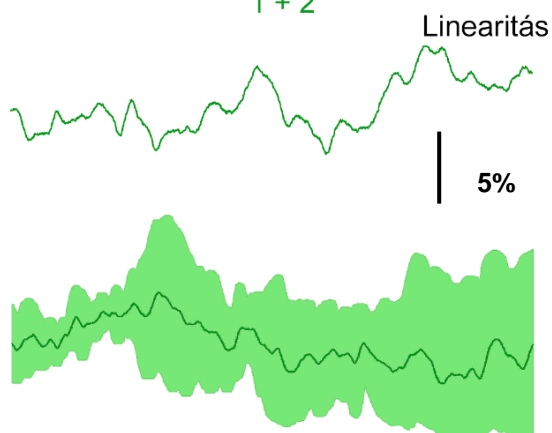
A



B



C



20. ábra Neurogliaform sejtek által kiváltott konvergens kizárólag GABA_B komponenst tartalmazó IPSP-k összegződése

(A) Hasonló kísérleti elrendezés, mint az (18. A ábra) esetében, azonban GABA_A receptor antagonist, gabazine jelenlétében. (B) Hasonló stimulációs protokoll, mint a (19. B ábra) ábrán látható, azonban gabazine jelenlétében. (C) Hasonló, mint a (19. C ábra) ábrán látható, azonban gabazine jelenlétében (n=8).

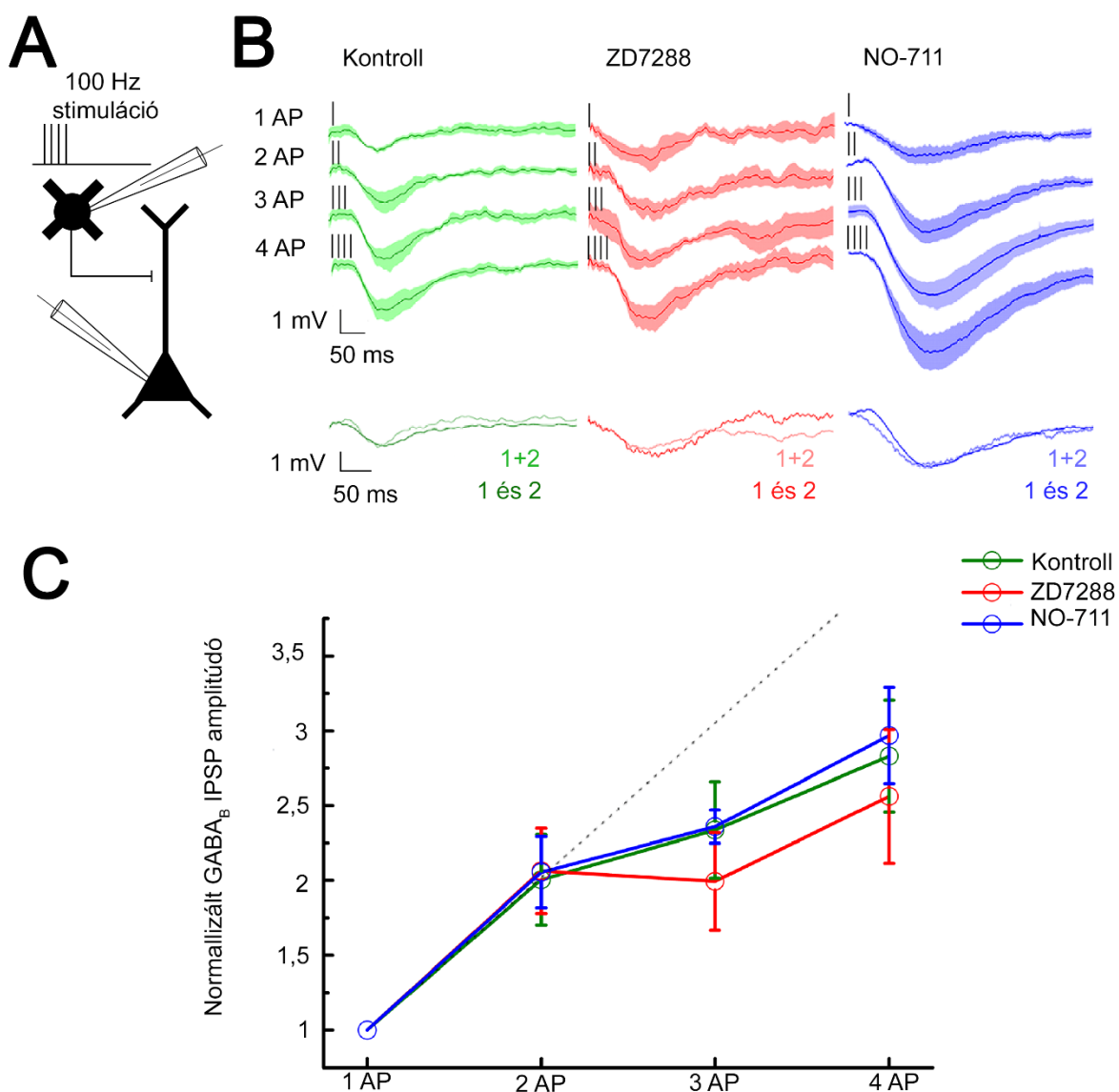
a GABA_B receptor-mediált válaszokhoz volt hasonló (49.42 ± 5.8 ms, 86.95 ± 8.82 ms, és 252.27 ± 36.92 ms, $n = 16$, (**20. B ábra**)). Az összes kísérlet során a konvergáló kisebb, illetve nagyobb önálló lassú IPSP amplitúdói -0.66 ± 0.22 mV és -0.94 ± 0.37 mV értékűek voltak. A konvergáló preszinaptikus NGF bemenetek szinkron aktiválását követően a piramissejten a bemenő posztzinaptikus jelek lineáris ($-1.6 \pm 6.6\%$) szummációját tapasztaltuk, mivel a konvergáló bemenetek amplitúdója -1.58 ± 0.53 mV, a önálló IPSPk matematikai összege pedig -1.60 ± 0.55 mV volt (**20. C ábra**). Ezen eredmények azt mutatják, hogy azonos interneuron populációtól származó lassú IPSP-k összegződése merőben különböző törvényszerűségeket követ, összehasonlítva a gyors IPSP-k szummációjával.

5.2.5. Neurogliaform sejtek által kiváltott konvergáló bemenetek kinetikájának farmakológiai vizsgálata

Annak érdekében, hogy a megvizsgáljuk a GABA_B receptor komponens által közvetített lineáris interakció határát, illetve, hogy kiderítsük milyen tényezők modulálhatják, farmakológiai kísérleteket végeztünk NGF sejt- piramissejt páros elvezetésekén.

A konvergáló GABA_B bementek mimikálásához a NGF sejtekben 100 Hz frekvencián 1 és 4 közötti akciós potenciált váltottunk ki (**21. A ábra**). Egyetlen akciós potenciál kiváltása gabazin jelenlétében ($10 \mu\text{M}$) nem telítette a GABA_B receptorokat, mivel a két akciós potenciál által kiváltott posztzinaptikus válasz amplitúdója (-1.25 mV) arányos volt az egységes posztzinaptikus válaszok átlagának kétszeresével (-1.26 mV), vagyis lineáris összegződés volt megfigyelhető, amely hasonlóságot mutatott az előző fejezetben ismertetett kísérletek eredményeivel (**20. A ábra**). 3 illetve 4 preszinaptikus akciós potenciál kiváltását követően szublineáris összegződés figyelhető meg ($n=6$, 1AP: -0.63 ± 0.50 mV, 2AP: -1.25 ± 1.06 mV, 3AP: -1.53 ± 0.84 mV, 4AP: -1.61 ± 1.09 mV (**21. B ábra**)); Normalizált értékek: 2AP: 2.00 ± 1.08 , 3AP: 2.34 ± 1.16 , 4AP: 3.17 ± 1.26 , (**21. C ábra**)). Az agykérgi felsőrétgben elhelyezkedő NGF sejt bemenetek túlnyomó többségben a piramissejtek távoli apikális dendritjére érkeznek, ahol hiperpolarizáció-aktivált ciklikus-nukleotid által kapuzott csatorna (HCN1) expresszióját már több tanulmányban is leírták. Ennek szerepe van a nyugalmi membránpotenciál fönntartásában és szabályozásában (Berger, Larkum, and Lüscher 2001; Kalmbach et al. 2018; Lörincz et al. 2002; Robinson and Siegelbaum 2003; Sheets et al. 2011). HCN1 csatorna blokkoló, ZD7288 ($10 \mu\text{M}$) jelenlétében a kontroll állapotokhoz hasonló posztzinaptikus összegződést figyeltünk meg. Kettő kiváltott preszinaptikus akciós potenciálíg lineáris, ezt követően 3. és 4. kiváltott akciós potenciál esetén már szublineáris összegződést tapasztaltunk ($n=5$, 1AP: -0.82 ± 0.63 mV, 2AP: -1.59 ± 0.76 mV, 3AP: -1.66 ± 0.72 mV, 4AP: -

1,90±1,07 mV, **(21. B ábra)**; Normalizált értékek és a kontroll értékekhez történő viszonyításuk: 2AP: 2,06±1,06, p= 0,983; 3AP: 1,99±1,17, p= 0,362; 4AP: 2,56±1,6, p= 0,336; kétoldali MW U próba, **(21. C ábra)**). Korábbi tanulmányban már utalást tettek arra, hogy a NGF sejt már egyetlen akciós potenciállal képes effektív koncentrációjú GABA neurotranszmitterrel megtölteni az extracelluláris teret (Oláh et al. 2009). A GABA_B aktivációt eredményező extracelluláris GABA koncentrációt a GABA transzporterek nagy mértékben szabályozzák (Gonzalez-Burgos et al. 2009; J. S. Isaacson, Solis, and Nicoll 1993; Szabadics, Tamas, and Soltesz 2007). Ezért következőnek a GABA transzporter 1 (GAT-1) szerepét vizsgáltuk abból a szempontból, hogy vajon a GABA visszavétel negatívan modulálja-e a GABA_B receptor által közvetített posztszinaptikus válaszok összegződését azáltal, hogy limitálja az extracelluláris térben a többlet GABA eljutását a receptorig. A GAT-1 szelektív blokkolását követően NO-711 (10 μM) gátlószerezrel a GABA_B receptor-mediált IPSP amplitúdója megnövekedett, azonban ez nem befolyásolta az összegződést (n= 6, 1AP: -1,11±0,62 mV, 2AP: -2,28±1,07 mV, 3AP: -3,1±0,40 mV, 4AP: -3,54±1,59 mV, **(21. B ábra)**; Normalizált értékek és a kontroll értékekhez történő viszonyításuk: 2AP: 2,06±1,17, p= 0,853; 3AP: 2,36±0,31, p= 0,645; 4AP: 2,97±1,54, p= 0,515; kétoldali MW U próba, **(21. C ábra)**). Ezek az eredmények szerint a HCN1-es csatornák nem befolyásolják a korlátozott mennyiségű NGF sejt bemenetek által generált posztszinaptikus válaszok metabotróp GABA_B komponensének az összegződését, valamint a bemenő jelek összegződésének linearitása megőrződik abban az esetben is, ha nagyobb mennyiségű GABA neurotranszmitter van jelen az extracelluláris térben.



21. ábra GABA_B receptor jelek összegződése nem függ a HCN1 csatorna aktivitásától és a GABA visszavételtől

(A) Sematikus kísérleti elrendezés bemutatása. 100 Hz frekvenciával 1-4 közötti akciós potenciált váltottunk ki NGF sejtekben, amelyet közben a kapcsolt piramissejtekről vezettünk el, gabazin jelenlétében. (B) NGF sejt és piramissejt páros elvezetések során kontroll körülmények között hasonló lineáris GABA_B receptor által közvetített IPSP összegződés figyelhető meg. A felső IPSP jel sorozat az AP stimulációs protokoll (függőleges vonalak jelölik a kiváltott AP mennyiségét) hatására mutatja be az összegződés kinetikáját kontroll körülmények (zöld, n=6), HCN csatorna ZD7288 általi blokkolása (piros, n=5) és GABA visszavételének NO-711-el történő gátlása során (kék, n=6). A lejjebb található IPSP jelek mutatják a mért (1 és 2) és a kiszámított (1 + 2) IPSP összegződést. (C) Összefoglaló ábra a normalizált IPSP csúcsértékekről. A kontroll körülmények alatt mérhető GABA_B receptor által közvetített IPSP-khez viszonyítva (2APs: $2,00 \pm 1,08$; 3APs: $2,34 \pm 1,16$; 4APs: $3,17 \pm 1,26$) az összegződés nem változik ZD7288 (2APs: $2,06 \pm 1,06$, $p = 0,983$; 3APs: $1,99 \pm 1,17$, $p = 0,362$; 4APs: $2,56 \pm 1,6$, $p = 0,336$; kétoldali MW U próba), sem NO-711 hatására (2APs: $2,06 \pm 1,17$, $p = 0,853$; 3APs: $2,36 \pm 0,31$, $p = 0,645$; 4APs: $2,97 \pm 1,54$, $p = 0,515$; kétoldali MW U próba). Szaggatott vonal a linearitást hivatott szemléltetni.

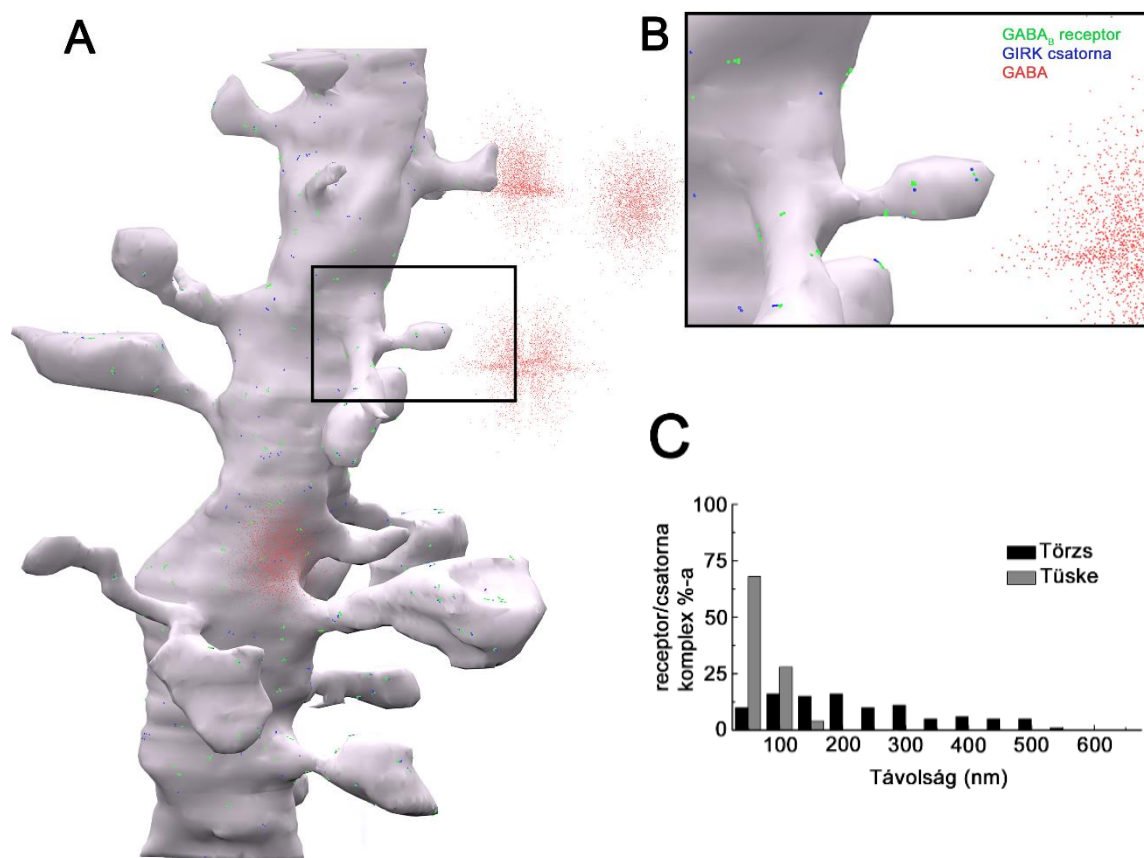
5.2.6. GABA_B receptor és GIRK csatorna komplex szubcelluláris elhelyezkedése befolyásolja a posztzinaptikus válaszok összegződését

Korábbi elektronmikroszkópos tanulmányban bemutatták a szubcelluláris kompartmentfüggő GABA_B receptor és GIRK csatorna elhelyezkedését: a dendrittüske felületén jellemzően szoros kolokalizációt mutat a receptor-csatorna komplex, míg a dendrit törzs felületén szegregáltabb elrendeződés jellemző (Kulik 2006). A receptor és a csatorna közötti jelátvitelt több tényező befolyásolja, ilyen a $\beta\gamma$ -alegység relatív lassú laterális diffúziója, illetve az α -alegység GTP-jének hidrolizációját követően a GDP- α -alegység nagy affinitású ismételt kötése a $\beta\gamma$ -alegységhez. Ezen tényezők markánsan befolyásolják az effektív jelátviteli távolságot a receptor és a csatorna között, ami alapján feltételezhető, hogy a köztük levő távolságnak relatív kicsinek kell lennie a sikeres jelátvitel érdekében (Brinkerhoff, Choi, and Linderman 2008; Kulik 2006).

Következésképpen feltettük a kérdést, miként befolyásolja a metabotróp jelek esetében receptor-csatorna elhelyezkedés a bementek integrációját?

A kérdés maradéktalan megválaszolására az elérhető kísérleti-alapú technikai lehetőségek nem elegendők, ezért számítógépes szimulációs eljárásokat használtunk a válasz kiderítésére. Komplex számítógépes szimulációs környezetet alkottunk Blender v2.7 szoftver segítségével, amely magába foglalt egy posztzinaptikus dendrit szakaszt és több lehetséges NGF sejt általi neurotransmitter felszabadulási helyet. Annak érdekében, hogy a realisztikus térbeli szimulációs közegben a jelátviteli folyamat során részecskék közötti interakciót megfelelően szimuláljuk, MCell v3.4 programot használtuk (Kerr et al. 2008). Ez a program egy sztochasztikus szimuláció, úgynevezett Monte Carlo-módszerrel szimulálja a részecskék mozgását és köztük lejátszódó kölcsönhatásokat. A dendrit szakaszcól készült ultrastrukturális rekonstrukció membrán felületére GABA_B receptor-GIRK csatorna csoportosulásokat helyeztünk kompartmentfüggő eloszlással, hasonlóan a fagyasztva töréssel történő immunjelöléses elektronmikroszkópos kísérletekhez (Kulik 2006). A GABA_B receptor és GIRK csatorna komplexek a dendrittüske felszínén szorosan helyezkedtek el, 95%-uk esetében kevesebb mint 100nm távolság mérhető a receptor és csatorna között, miközben a dendrit törzs felületén ugyanez csak a komplexek 27%-ról mondható el (**22. C ábra**). Egy szimuláció során összesen $1142,65 \pm 25,34$ GABA_B receptor és $550,28 \pm 19,57$ GIRK csatorna volt jelen. A GABA felszabadulást négy különböző pontból váltottunk ki, amelyek elhelyezkedését korábban feltérképeztünk NGF sejtek felszabadulási helyei alapján generáltuk (**12. ábra**) (dendrit

szakasz és a felszabadulási helyek közötti legkisebb távolság: 0,609, 0,648, 1,753, 1,943 μm). Két egymást követő GABA felszabadulás 10 ms késleltetéssel történ, alapul véve a korábbi szummációs kísérletek stimulációs protokollját (**21. A ábra**). A molekulák diffúzióját befolyásolja az agyszövet extracelluláris terének a kanyargóssága, úgynevezett tortuozitása és az extracelluláris tér térfogatának aránya a teljes agyszövet térfogatához viszonyítva (Sykova and Nicholson 2008). Annak érdekében, hogy realisztikus, az agyszövetre jellemző molekuláris diffúziós környezetet alakítsunk ki megfelelő tortuozitással és megfelelő arányú extracelluláris térrel, az extracelluláris mátrixot is matematikailag modelleztük. Ennek kialakításához háromdimenziós mátrixba rendezett kockákat helyeztünk el, amely magába foglalta a dendrit szakaszt. Ezen kockák mérete és formája úgy lett paraméterezve, hogy az megfelelően szimulálja az agyi extracelluláris tér/celluláris tér arányát (0,2) és tortuozitás értékét (1,5) (Tao, Tao, and Nicholson 2005) (további információkért lásd Agyagok és módszerek 4.10 c. fejezetet).



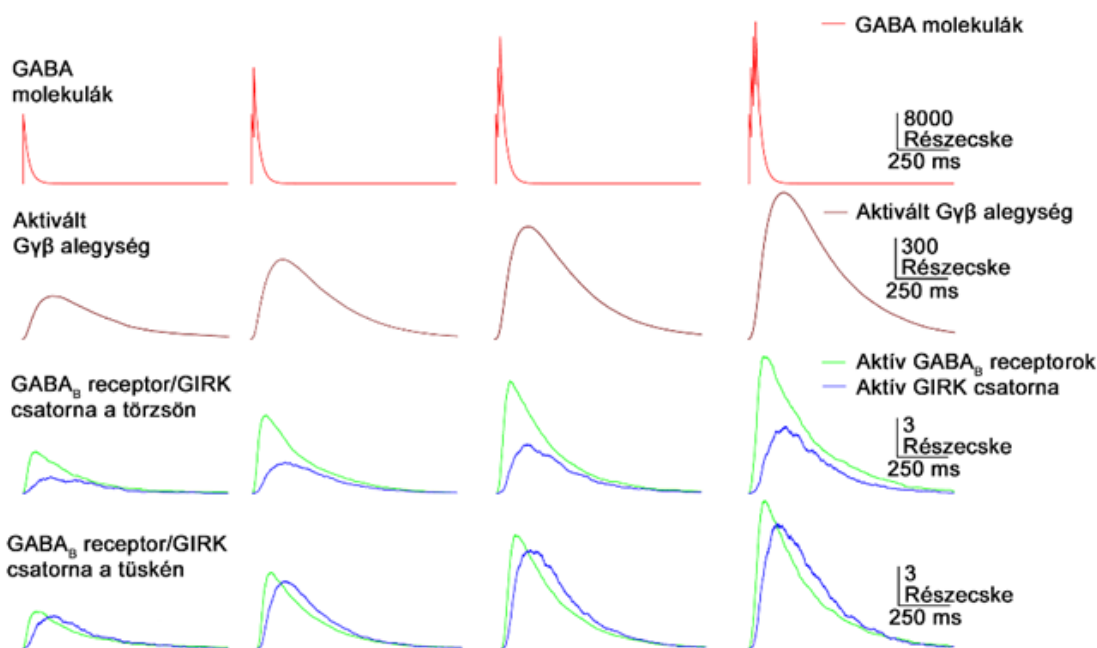
22. ábra: GABA_B receptor és GIRK csatorna komplex szubcelluláris kompozíciójának modellezése

(A) Mcell modell bemutatása az szimuláció kezdetén, GABA felszabadulást követően. (B) Kinagyított felvétel a modelltől (zöld: GABA_B receptor, kék: GIRK csatorna, piros: GABA). (C) GABA_B receptor és GIRK csatorna csoportosulások eloszlása az dendrit modell membrán felszínén (fekete: dendrit törzs, szürke: dendrittüske).

A szimulációinkban az $1,2 \pm 0,7 \mu\text{m}$ távolságban felszabadított GABA képes volt az effektív helyi koncentráció által a posztszinaptikus GABA_B receptorokat aktiválni. Egyetlen GABA felszabadítási esemény hatására összesen $5,8 \pm 2,1$ GABA_B receptor aktiválódott a dendrit teljes membránfeszínén (ebből $2,77 \pm 1,51$ a dendrittűskén, $3,13 \pm 1,83$ pedig a dendrit-törzsön aktiválódott). A GABA koncentrációnak a növelésével, amely 2 akciós potenciál által történő felszabadulást hivatott szimulálni, $11,54 \pm 3,6$ GABA_B receptor aktiválódott (ebből $5,7 \pm 2,45$ a dendrittűskén és $5,8 \pm 2,74$ a dendrit-törzsön aktiválódott). További GABA koncentráció növelése esetén telítődni kezd a közelben levő, elérhető posztszinaptikus GABA_B receptorok száma: három egymást követő GABA felszabadulás $16,97 \pm 4,17$, négy pedig $21,31 \pm 4,98$ GABA_B receptort aktivál (ebből a dendrittűskén $8,54 \pm 2,77$ és $11,09 \pm 4,07$ valamint a dendrit-törzsön $8,45 \pm 3,23$ és $11,27 \pm 2,91$ aktiválódott).

GABA_B receptoron történő GABA neurotranszmitter kötést követően intracelluláris folyamatokat indít be, a GDP/GTP csere történik a $G\alpha$ alegységen, így a heterotrimer proteinről leválik a $G\beta\gamma$ alegység. A szimuláció során nagy mennyiségű $G\beta\gamma$ alegység termelődött, ami többszörös GABA felszabadulást követően szintén telítődést mutatott, feltehetően a receptor közvetlen közelségében limitált mennyiségű szubsztrátumként funkcionáló G-fehérje mennyisége miatt (csúcs értékek: 1AP: $317,85 \pm 150,11$; 2AP: $590,22 \pm 170,85$; 3AP: $834,83 \pm 194,73$; 4AP: $1089,837 \pm 244,9$ részecske). Laterális membrán diffúzió követően a $G\beta\gamma$ alegységek a közeli GIRK csatornákhöz kötődtek. Egyetlen GABA felszabadulást követően összesen $3,66 \pm 2,59$ GIRK csatorna aktiválódott ($2,31 \pm 1,99$ a dendrittűskén és $1,24 \pm 1,52$ a dendrit-törzsön). Kettő egymást követő GABA felszabadulást követően a teljes membrán felületen $7,26 \pm 3,52$ csatorna aktiválódott, hasonló linearitást mutatva, mint a szummációs kísérletek (**20. A, 21. A ábra**). Egyes GABA felszabadulást követő aktiválódó csatornák számtani kétszerese $7,32 \pm 2,58$, így a kiszámított linearitási érték $-1,01 \pm 0,7\%$. Eloszlását tekintve a dendrit-törzsön $2,18 \pm 1,91$, a dendrittűskén $5,06 \pm 2,9$ GIRK csatorna aktiválódott. További GABA koncentráció növelése, 3 illetve 4 akciós potenciálnak megfelelően $11,04 \pm 3,92$ és $14,07 \pm 4,98$ GIRK csatorna aktivációhoz vezetett ($3,54 \pm 2,49$ és $4,56 \pm 2,51$ csatorna a dendrit-törzsön és $7,41 \pm 3,33$ és $9,4 \pm 3,78$ csatorna a dendrittűskén). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a szubcelluláris, kompartment specifikusan különböző eloszlású GABA_B receptor és GIRK csatorna komplex különböző hatékonysággal képes a jeleket integrálni. A kompakt elrendezése a receptor-csatorna komplexnek a dendrittűske membrán felületén látványosan nagyobb mennyiségű GIRK csatornához való hozzáférést biztosít, így több csatorna is aktív válik a dendrit-törzshöz viszonyítva (**23. ábra**). A vizsgált részecskék mennyiségét egy GABA

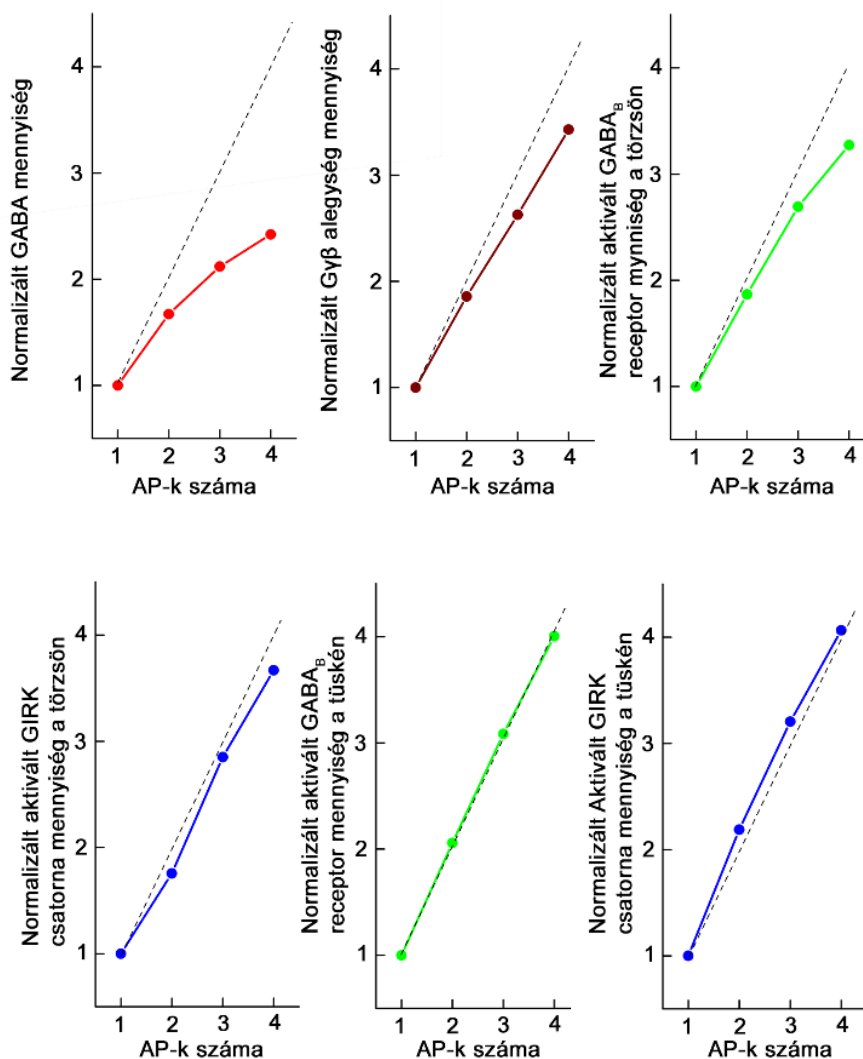
felszabadulás során mért értékre normalizáltuk (**24. A ábra**). A normalizált értékek különböző szubcelluláris kompartment függő szummációs kinetikát mutatnak: a dendrittűskén a növekvő GABA koncentráció hatására enyhén szupralineárisan összegződnek a bemenő jelek (2AP:2,18 3APs:3,2 4APs:4,06), míg a dendrit-törzsön a jelek szublineáris összegződése figyelhető meg (2APs:1.75 3APs:2.85 4APs:3.66). Ezzel szemben, a növekvő GABA koncentráció eltérő mennyiségben összegződő GABA_B receptor aktivációt váltott ki a dendrittűskén és törzsön, amely miatt kompartment-specifikus jelátviteli hatékonyságot számítottuk az aktivált GIRK csatorna és aktív GABA_B receptor hányadosaként (**24. B ábra**). A számítások alapján azok a receptor-csatorna komplexek, amelyek között jelentős távolság van, csökkenő hatékonysággal képesek integrálni a beérkező jeleket két egymást követő GABA felszabadulás követően. A további GABA koncentráció növekedés hatására az növekvő GABA_B receptorok hatékonyabban képesek megfelelő G $\beta\gamma$ alegység koncentrációt produkálni, hogy a távolabb elhelyezkedő GIRK csatornákat is effektívebben elérjék. Közeli receptor-csatorna elhelyezkedés esetében kettő egymást követő GABA felszabadulás során a jelek összegződése hatékonyabbá válik, de további GABA koncentráció növelés esetén csökkeni fog a közeli GIRK csatornák telítődése által.



23. ábra: A szimuláció során lezajló molekuláris interakciók összefoglalása növekvő GABA felszabadulás során.

Fentről lefelé: NGF sejt kimenetét több pontban történő GABA felszabadulással szimuláltuk (piros). Az extracelluláris térbe 1-től 4 egymást követő akciós potenciálnak megfelelő GABA felszabadulása történt. Lejjebb összesen termelődött G $\beta\gamma$ alegységek (barna) száma követhető figyelemmel, a dendrit törzsön illetve a tűskén elhelyezkedő GABA_B receptorok aktiválódását követően (zöld). Az G $\beta\gamma$ alegységek laterális diffúzió által a környező GIRK csatornákhöz kötnek, aktív GIRK csatorna konformációt elősegítve ezzel (kék).

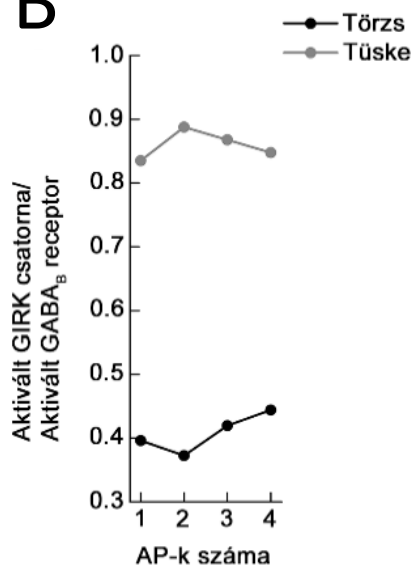
A



24. ábra Szimulációban részt vevő molekulák normalizált értékei növekvő GABA felszabadulás során

(A) Az modellben jelenlevő GABA, G γ alegység, aktív GABA_B receptor és aktív GIRK csatorna mennyisége növekvő GABA felszabadulás során, normalizálva az első GABA felszabadulás alatt mérhető maximális értékeikre. (GABA: 2AP: 1,67, 3AP: 2,11, 4AP: 2,42, G γ alegység: 2AP: 1,85, 3AP: 2,62, 4AP: 3,42; GABA_B receptor dendrit törzs: 2AP: 1,86, 3AP: 2,69 4AP: 3,27; GIRK csatorna dendrit törzs: 2AP: 1,75, 3AP: 2,85, 4AP: 3,66; GABA_B receptor dendrittüske: 2AP: 2,05, 3AP: 3,08, 4AP: 4,00; GIRK csatorna dendrittüske: 2AP: 2,18, 3AP: 3,2, 4AP: 4,06). Szaggatott vonal a linearitást hivatott szemléltetni. (B) A jelátviteli hatékonyság mértékének számszerűsítése a dendrit törzsön és a tüskén, növekvő GABA koncentráció során.

B



6. Diszkusszió

6.1. CARS-on alapuló mikroszkópiás módszer alkalmazása lipid tartalmú struktúrák vizsgálatához

SM betegség korai szakasza során lezajló folyamatokról kevés ismereteink vannak és általános vita tárgyát képezik. A betegség korai stádiumban történő diagnosztizálása meglehetősen nehéz, ebből kifolyólag a klinikai tünetek megjelenésekor a betegség már előrehaladottabb. A kutatómunkám során a különböző agyterületeken detektálható mielinhüvely károsodást vizsgáltuk *in situ* akut agyszelet preparátumokon CARS képalkotó technikával. Megvizsgáltuk az átlagos lipid tartalmat a szomatoszenzoros kéreg szürkeállományában, és a rostos fehérállományokban: a kéregtestben, a kéregtest laterális területén, az anterior kommissurában, és a kisagyban. Várható módon a kérgestest területén mértük a legmagasabb lipid tartalmat, a szürkeállomány területén pedig a legalacsonyabbat. Az oligodendrociták magas lipid tartalommal rendelkeznek (70-85%) (Hilderbrand et al. 1993), ebből kifolyólag ezeknek a sejteknek az apoptózisa során a mielinhüvely lebomlásával lipid tartalmú törmelék keletkezik.

A demielinizációs folyamatokat eddig jellemzően gliális proteinek immunhisztokémiai jelölésével vizsgálták, ezért a lipid lebomlási folyamatok direkt nyomon követhetőségének lehetősége nem került előtérbe (Clarner et al. 2012; Gudi et al. 2009; Lindner et al. 2007; Safaiyan et al. 2016; Skripuletz et al. 2013; Vogel et al. 2013). A kutatómunkánk során alkalmazott módszer előnyösebb a korábban alkalmazott módszerekhez képest, mivel a CARS mikroszkópia által detektált jelek direkt számszerűsíthető módon adnak információt a lipidtartalomról. Továbbá, a CARS jelek detektálása lehetséges élő szövetből, *in situ*. A mérés során nincs szükség immuncitokémiai és hisztokémiai eljárásokra, amelyek szövetet potenciálisan károsító kémiai folyamatokat foglalnak magukba (Sommer and Schachner 1981). A nemlineáris mikroszkópiai mérés jellegéből adódó optikai szelektálásnak köszönhetően a CARS képalkotással specifikus molekulák háromdimenziós térbeli eloszlásának a leképezése lehetséges.

A SM betegségmodell kialakításának egyik széleskörben elfogadott módja, hogy egy kémiai anyaggal, cuprizonnal, történő kezeléssel szelektív oligodendrocita pusztulást idéznek elő (Gudi et al. 2009; Kipp et al. 2009; Matsushima and Morell 2001). A modellben agyterület függő demielinizációs folyamatok mennek végbe (Goldberg et al. 2015; Gudi et al. 2009; Maña et al. 2009; Matsushima and Morell 2001; Silvestroff et al. 2012; Skripuletz et al. 2013),

amelyek mikroglia és asztroglia történő immunhisztokémiai jelöléssel nyomon követhető (Goldberg et al. 2015). A cuprizon elsődlegesen a gazdagon mielinizált struktúrákat károsítja, mint a kergestest, de a többi agyterületen is detektálható demielinizációt okoz: pl. a kisagyi magvakban, látópályán, hippokampuszban, putamenben és a szürkeállományban. A kisagyi cuprizon kezelés hatására a kisagyi mélymagvak erősen károsodnak, azonban a fehérállomány kevésbé van kitéve a demielinizációnak (Groebe et al. 2009; Lampron et al. 2015). A kísérleteink során bemutattuk, hogy a cuprizon által kiváltott oligodendrocita, illetve mielin károsodás nem invazív módon detektálható *in situ*. Egyes mielinizált rostok vastagságának a vizsgálatával és ez alapján a G-arány kiszámításával igazoltuk a mielinhüvely vastagságának csökkenését (Lindner et al. 2007; Silvestroff et al. 2012). Ugyan a cuprizon kezelés által kiváltott modell sok tekintetben eltér a tényleges SM betegségtől, a kezelés hasznos a korai demielinizációs folyamatok tanulmányozására. Ezen folyamatok során leírták a gyulladásos citokinek és neurotrófikus faktoroknak megnövekedett mennyiségét (Gudi et al. 2009; Matsushima and Morell 2001; Tanaka et al. 2013), és asztroglizis és mikroglia aktivitást (Clarner et al. 2012; Goldberg et al. 2015; Hiremath et al. 1998; Li, Wang, and Lou 2016; Remington et al. 2007). A mielin károsodás pathomechanizmusában a mikroglia aktiváció fontos szerepet játszik, mivel a citotoxicitást az általuk termelt nitrogén-monoxid, reaktív oxigéngyökök és glutamát váltja ki (Neumann, Kotter, and Franklin 2008; Peferoen et al. 2014). Továbbá, a mikroglia fontos szerepük van a károsodott vagy programozott sejthalál által elpusztult sejtek eltakarításában (Neumann, Kotter, and Franklin 2008; Nimmerjahn 2005).

A munkánkban bemutatott módszer használatával képesek voltunk számszerűsíteni a lipid törmelék mennyiségét és eloszlását. Kéthetes kezelést követően mérhetően kevesebb törmelék van jelen, összehasonlítva a négyhetes kezelésben részesült csoporttal, ahol masszív mennyiségű törmelék akkumuláció volt megfigyelhető. Az akkumulált lipid hasonlóságot mutat a korábbi előrehaladott SM betegekben származó elektromikroszkópos felvételeken bemutatott fagocitált lipid törmelékekkel (Prineas and Graham 1981). Továbbá, emberi szövetbiopszián végzett immunhisztokémiai eljárással is hasonló struktúrák figyelhetők meg. (Huizinga et al. 2012). Ezekkel az eredményekkel összhangban neutrális lipidet tartalmazó aktivált makrofágok (Peferoen et al. 2014; Smith 1999) jelenléte szintén kimutatható emberi SM betegből származó szövetmintából (Boven et al. 2006; Vogel et al. 2013). Egy nemrég közölt kutatás pedig kimutatta, hogy a cuprizon kezelés hatására, a degradálódott mielinből származó lipid a mikrogliaiban jelenik meg (Safaiyan et al. 2016). A mielin törmelék eltakarítás és az oligodendrocita pusztulás egy eltérő időskálán történő összetett folyamat. A

fehérjék lebomlása napok alatt megy végbe, pl. a mielin-oligodendrocyta-glikoprotein és a mielin-asszociált glikoprotein 3 nap alatt lebomlik, míg más fehérjék, mint a mielin basic fehérje és a proteolipid fehérje lebomlásához 10 napra is szükség lehet (Bruck et al. 1995). A lipid degradáció viszont ettől eltérően sokkal hosszabb időt vesz igénybe, akár egy évet is (Adams 1989). Ilyen lipid tartamú granulátumok jelenléte cuprizon kezelést követően 9 hónappal később is kimutatható (Safaiyan et al. 2016).

A lipid törmelék megjelenése mellett rendszerünkkel a mielin vastagságát is vizsgáltuk. Ezen mérések során feltételeztük, hogy lipid törmelék megjelenésével összhangban, a demielinizációs folyamatok a mielinhüvely vastagságának változásán is nyomon követhetőek. A munkában bemutattuk, hogy a kontroll csoporthoz viszonyítva a korai szakaszban szignifikáns különbség nem detektálható a kergestest területén mielin vastagság változásban, azonban a lipid törmelék jelenléte már kimutatható.

A legutóbbi megfigyelések, azt mutatják, hogy 40 héttel az oligodendrociták elvesztése és a demielinizáció hatására kialakuló lassan lebomló mielin ellen az immunizálódás hiányzik (Traka et al. 2016), ez azt sugallja, hogy az oligodendrociták pusztulásának kezdete független lehet a komplementrendszerrel. A lipid törmelék akkumuláció összhangban van a makrofág aktivációval és a gyulladás kialakulásával (X. Wang et al. 2015). Ismert, hogy a mielinhüvely egyik fő alkotóeleme szulfatid gyulladást képes kialakítani a központi idegrendszerben (Jeon et al. 2008), a lipidet felhalmozott makrofágok pedig krónikus gyulladásos folyamatokat alakíthatnak ki a gerincvelőben (X. Wang et al. 2015). További kutatások kimutatták, hogy pusztán lipid homogenizátum agyba történő injektálásával nagy mértékű mikroglia aktivációt és gyulladásos választ lehet kiváltani (Clarner et al. 2012; X. Sun et al. 2010). A degradálódott mielinből származó lipid a kiváltott gyulladásos folyamatok által, a demielinizáció folyamatát tovább súlyosbítja, és akadályozza a remielinizációt (Kotter 2006; Lampron et al. 2015). Ezért eredményeink azt a nézetet erősítik meg, miszerint az oligodendrocyta pusztulást követően a növekvő mennyiségű lipid akkumulációja történik, ami a későbbi gyulladásos folyamatok kiváltásában játszhat szerepet.

6.2. NGF sejthálózat által kialakított konvergáló gátló ionotróp és metabotróp jelek eltérő összegződése

A NGF sejt az evolúciós fejlődés során egy erősen konzerválódott sejttípus, markáns génexpressziós mintázata, morfológiai-, fiziológiai tulajdonságai és kapcsolatrendszerének együttese alapján egyértelműen azonosítható idegsejttípus a rágcsálóktól egészen az emberig (Hodge et al. 2019). A NGF sejt a többi interneuronnal ellentétben a posztszinaptikus célsejten

nagy hatásfokkal képes metabotróp GABA receptorokon is hatást kifejteni az ionotróp GABA receptorok mellett. A kettő receptor típus merőben különböző mechanizmus alapján működik, ami alapján eltérő gátló hatás megy végbe a célsejten. Az egyedi gátló hatás kifejtése a térfogati transzmisszió által valósul meg. Laborunk által korábban publikált munkában a szinaptikus és extraszinaptikus GABA receptoron kifejtett hatása, a relatív magas funkcionális kimeneti kapcsolatok száma, és a környező preszinaptikus receptorokra gyakorolt gátló hatása a térfogati transzmisszió jelenlétére utal (Oláh et al. 2009). Ezeken az eredményeken túl kutatómunkánk során a NGF sejtről piramissejtre érkező gátló kapcsolatokat funkcionálisan és strukturálisan karakterizáltuk, amelynek eredményeként meghatároztuk a jelátvitel lehetséges effektív távolságát az egyes preszinaptikus terminálison történő kvantális neurotranszmitter felszabadulásokkor. Ezt követően, háromdimenziós térbeli modellt fejlesztve az egyes NGF sejtekre jellemző effektív jelátviteli távolság hatását vizsgáltuk, milyen mértékben befolyásolja a globális, teljes felsőrétegi NGF sejtpopuláció konvergáló kimeneteinek az előfordulását. A modellezés során figyelembe vettük a jellemző extrém sűrű axonfelhő és a frekventáltan előforduló bouton terminálisok jelenlétét. Az eredményeink arra világítanak rá, hogy annak ellenére, hogy a NGF sejt hatékonyan képes a térfogati transzmisszió által távolra eljuttatni a GABA neurotranszmittert, az egységnyi extracelluláris tér nagy része ($83,04 \pm 5,56\%$) kizárólag egy vagy kettő NGF sejt számára hozzáférhető. Továbbá az extracelluláris tér kisebb részében ($16,95 \pm 5,56\%$) található olyan pont, amely hozzáférhető több mint kettő NGF sejt számára, még abban az esetben is, ha a teljes NGF sejtpopuláció aktív. Ezzel kapcsolatban kevés információnk van arról, hogy *in vivo* körülmények között milyen aktivitás jellemző erre a sejt típusra az agykéreg felsőbb rétegeiben.

Az utóbbi időben a neokortexben leírták a neuron-derived neurotrophic factor (NDNF) marker gént expresszáló interneuronok csoportját, amelyekről úgy gondolják, hogy azonos a NGF sejtekkel (Tasic et al. 2016). Nemrég publikált eredmények alapján, ezek az NDNF markert expresszáló interneuronok részt vesznek az asszociatív memória során a plaszticitási folyamatokban (Abs et al. 2018), míg más publikációkban csak feltételezhető a NGF sejtek részvétele az egyes folyamatok során, mint pl. a GABA_B aktivációt igénylő perzisztens aktivitás terminálása (Craig et al. 2013) vagy a dendritikus Ca²⁺ jelek kialakulásának gátlása 2/3. és 5. rétegi piramissejtek apikális dendritjén (Palmer et al. 2012; Wozny and Williams 2011). Abból a célból, hogy kiderítsük *in vivo* körülmények között a neurogliaform sejtpopuláció képes-e összehangolt működésre, az első rétegi interneuronok aktivitását két-foton Ca²⁺ képalkotással kísértük figyelemmel szomatosenzoros agykéregben ipszilaterális végtag stimuláció közben.

Eredményeink igazolták, hogy a α -aktinin2 pozitív sejtek, ami NGF sejteknek tekintendők (Uematsu et al. 2008), részt vesznek az interhemiszfériális gátlás folyamatában. Szenzoros stimulálás hatására a két agyfélteke közötti kommunikációt biztosító kallózális bemenetek által a teljes NGF sejtpopuláció ~70%-ánál figyeltünk meg összehangolt aktivációt. Mivel a NGF sejtek gyakran egymás között is gátló kapcsolatot létesítenek (Jiang et al. 2015; Lee et al. 2015; Oláh et al. 2009), ezért feltételezhető hogy a NGF populáció maradék ~30%-a a lehetséges populáción belüli gátló hatás vagy a serkentő bemenetek hiánya, illetve nem megfelelő hatékonysága miatt marad inaktív. Az ismert, hogy homogén molekuláris expressziós profillal rendelkező interneuronok feladatfüggő módon összehangoltan is működhetnek: például a PV-expresszáló interneuron populáció munkamemória kialakulása során heterogén módon aktív (Lagler et al. 2016), azonban az éleshullám kialakítása (Stark et al. 2014), illetve különböző magatartási folyamatok során már összehangoltan, szinkron aktiválódnak (Constantinidis and Goldman-Rakic 2002; Insel and Barnes 2015; Kvitsiani et al. 2013). Ehhez hasonlóan a VIP- és SOM-expresszáló interneuron populáció estében is megfigyeltek kooperatív összehangolt együttműködést az elsődleges látókéregben (Karnani et al. 2016). Munkámban először kerül bemutatásra, hogy a több interneuron típus mellett a NGF sejtek is képesek összehangolt módon működni szomatoszenzoros agykérgi területen, keretet biztosítva a konvergáló bemenetek integrációjához fiziológiás körülmények között. A NGF sejhálózat működésének szinkronizálásában valószínűleg nagy szerepet játszhat az erőteljes kolinerg neuromoduláció (Poorthuis et al. 2018), illetve a NGF populáción belül gyakorta kialakított réskapcsolat (Simon et al. 2005), amely az akciós potenciál egyidejű generálódását segíti elő (Yao et al. 2016). Azonban az akciós potenciál szinkron kialakulásának igazolásához további kísérletek elvégzésére van szükség, mivel a két-foton Ca^{2+} képalkotás időbeli felbontása nem elégséges ennek igazolására.

A konvergáló bemeneteken végzett közvetlen elektrofiziológiai méréseink megmutatták, hogy a gyors, ionotróp GABA_A komponens szublineárisan összegződik. Az összegződés hátterében feltételezhetően az áll, hogy a GABA_A receptor aktivációt követően elsődlegesen a Cl^- ion számára válik permeabilissá a membrán, intenzív GABA_A receptor aktivációt követően pedig intracelluláris Cl^- ion felhalmozódás következtében a Cl^- ion egyensúlyi potenciálja pozitívabb tartományba tolódik. Ezen folyamat végbemenetele ismert a GABA_A g potenciálok rövidtávú szinaptikus depressziója során (Huguenard and Alger 1986; McCarren and Alger 1985; Staley and Proctor 1999). Érdekes módon viszont a metabotróp GABA_B receptor által közvetített válaszok merőben más, lineáris összegződést mutatnak. Eddig kizárólag

számítógépes szimulációkkal vizsgálták a GABA_B receptor által közvetített jelek integrációját, amelyekben nagyfokú szupralineáris összegződést feltételeztek a G-fehérjék által történő jelamplifikáció hatására (Destexhe 1995). Annak érdekében, hogy megértsük milyen lehetséges moduláló hatások befolyásolhatják a korábbi számítógépes szimulációs tanulmány által megjósolt szupralineáris összegződést farmakológiai kísérleteket végeztünk, ahol a HCN1-es csatornát, illetve a GAT-1 transzportert gátoltuk. A távoli apikális dendriteken elhelyezkedő HCN1 csatornák -50mV-tól negatívabb membránpotenciál esetén nyitnak, aminek hatására Na⁺ és K⁺ kationok számára átjárhatóvá válik, így depolarizáló áramot generál hiperpolarizáció hatására (Lörincz et al. 2002; Robinson and Siegelbaum 2003). HCN1 csatornák farmakológiai gátlását követően, ZD7288-al nem mutatott különbséget a GABA_B komponens szummációjának kinetikája. Továbbá a szinaptikusan és extraszinaptikusan található nagy affinitású plazmamembrán kötött GABA transzporterek kedvező pozícióban vannak, hogy modulálják a GABA_A jeleket az extracelluláris GABA koncentráció szabályozása által. Ezért kísérleteket végeztünk GAT-1 gátlása alatt, hogy megbizonyosodjunk róla, hogy a GABA visszavétel nem limitálja a többlet GABA koncentrációt az extracelluláris térben megszabva ezzel a NGF sejt bemenetek számára potenciálisan aktiválható posztzinaptikus GABA_B receptorok számát. A kiváltott lassú IPSP-k amplitúdója növekedett, azonban szignifikáns változást nem detektáltunk az összegződés kinetikájában.

Annak érdekében, hogy a metabotróp receptorok által közvetített hatások összegződését molekuláris szinten vizsgáljuk, realisztikus háromdimenziós modellkörnyezetet alkottunk. Eredményeink alapján a szupralineáris integrációnak kedvez a közeli receptor-csatorna elhelyezkedés, azonban a szegregáltabb eloszlás esetén szublineáris irányba tolódik el az összegződés, mivel a GABA_B receptortól távolabb elhelyezkedő GIRK csatornák aktiválásához szükséges kritikus $\beta\gamma$ -alegység koncentráció nehezen alakul ki. Következésképpen a modellünk alapján megállapítható, hogy a receptor és effektor csatorna közötti távolság esszenciális hatással van a metabotróp receptorok által közvetített konvergáló bemenetek összegződésére. Ezek alapján lehetséges, hogy a szubcelluláris alegységfüggő receptor-csatorna eloszlásból adódó diverz integrációja a lassú IPSP-knek eltérő módon befolyásolja a szinaptikus plaszticitási folyamatokat az által, hogy például a visszaterjedő akcióspotenciál betérjedése hatékonyabban gátlódik a dendrittüskékben. Továbbá a modellünkben törekedtünk a mesterséges extracelluláris tér minél realisztikusabb kialakítására a megfelelő térfogati arányok és tortuozitás értékek szem előtt tartásával. Azonban nem zárható ki a preszinaptikus NGF sejt axon boutonja és a posztzinaptikus dendrit között az extracelluláris tér specializálódott

ultrastrukturális elrendeződésének jelenléte, ami eltérő diffúziót biztosít. Ennek a kérdésnek a megválaszolására nagyságrendekkel bonyolultabb modell környezet szükséges, ami az agykéreg első rétegének teljes elektromikroszkópos rekonstrukcióján szükséges, széleskörű receptor és transzporter eloszlásokkal együtt, mindeközben kiemelt figyelmet szükséges fordítani az extracelluláris tér megfelelő konzerválásra. Mindemellett révén, hogy az extracelluláris tér dinamikus változását figyelték meg alvás (Xie et al. 2013) illetve születést követő fejlődés során (Lehmenkühler et al. 1993),- ami következésképpen változást okozhat az extracelluláris neurotranszmitter koncentráció mennyiségében – érdekes lehet megvizsgálni miként befolyásolhatja az extracelluláris tér a NGF sejt által közvetített gátlási folyamatokat.

7. Összefoglalás

7.1. Mielindegradációt követő lipid törmelék eloszlásának a vizsgálata a központi idegrendszerben

A központi idegrendszerben az idegsejtek axonját mielinhüvely borítja. A mielinhüvelyt az oligodendrociták alakítják ki, azzal, hogy a csupasz axon szakaszokat spirálisan körbe ölelik finom nyúlványaikkal. Az így kialakított mielinhüvely szakaszosan előforduló elektromos szigetelőréteget alkot az axon mentén, amit csupasz axonszakaszok, az ún. Ravier-befűződések szakítanak meg. Az elektromos ingerületvezetés ez által a nem-mielinizált rostokhoz képes nagy mértékben gyorsabbá válik. Egyes neurodegeneratív betegségek, mint a SM során a mielinhüvely károsodása megy végbe. Patomechanizmusát tekintve demielinizációs és gyulladásos folyamatok mennek végbe a mielinizált területeken. Mivel a mielinhüvely elektromos szigetelőként működik az axon mentén, a betegség korai szakaszában a mielin károsodás hatására az elektromos ingerületvezetés jelentősen romlik. A betegség későbbi szakaszában a mielindegradáció következményeként a neurodegenerációs folyamatok mennek végbe. Jelenleg nem ismert a kiváltó tényezői a betegségnek, azonban feltételezhető bizonyos környezeti és genetikai tényezők. A kiváltó okokhoz hasonlóan a betegség pontos patomechanizmusa sem ismert. A legelfogadottabb nézet szerint a SM egy autoimmun eredetű betegség, amely során autoreaktív T-sejtek jutnak az központi idegrendszerbe, ezt követően pedig mikroglia és makrofágok támadják meg a mielinhüvelyt, ezzel szelektív oligodendrocita pusztulást váltanak ki. Ezzel szemben alternatív elmélet is létezik a betegség kialakulásával kapcsolatban, mivel egyes esetekben a betegség korai stádiumában a lézió megfigyelhető volt limfociták jelenléte nélkül. Ennek alapján feltételezhető hogy az oligodendrocita pusztulás az elsődleges probléma, ezt követően az elpusztult oligodendrocitákból származó mielin törmelék vált ki immunválaszt, ami a gyulladásos folyamatokat váltja ki. Ezen elmélet alapján a mielin törmelék megjelenése és eloszlása az központi idegrendszerben nagy jelentőségű a későbbi gyulladásos folyamatok kialakításában. Napjainkban azonban konkrét adatokkal nem rendelkezünk a mielin törmelék előfordulásáról.

Disszertációmban egy újonnan fejlesztett képalkotó mikroszkóprendszert használtam a demielinizációs folyamatok vizsgálatára. A mikroszkóprendszer egy nemlineáris optikai módszer, a koherens anti-Stokes Raman szóródás (CARS) elvén működik. A CARS mikroszkópiával a molekulákat a saját rezgési spektrumuk alapján azonosíthatóak. Ez a módszer kémiai szelektivitást biztosít bizonyos molekulák vizsgálatára. Ebben a munkában a mikroszkóprendszerünk lipidekben előforduló CH_2 -es molekulakötés vibrációjának

gerjesztésével a lipidtartalmú struktúrákat vizsgálatuk. A módszer előnye a többi ismert eljáráshoz képest, hogy a biológiai struktúrák vizsgálata így nem igényel sem természetes fluoreszcenciát, sem fluoreszcens jelölést. A méréseket élő szöveten lehet elvégezni, az nélkül, hogy kémiai eljárásokkal módosítanánk/károsítanánk a biológiai szerkezetet. Munkám során cuprizonnal váltottunk ki demielinizációt C57BL/6 egerekben, és a mielinhüvely károsodásának folyamatát követtük nyomon CARS módszerrel. Eredményeink alapján a CARS módszer alkalmas arra, hogy élő szöveten lipid tartalmú struktúrákat vizsgáljunk. A kezelés hatására a mielinhüvely vékonyodását képesek voltunk detektálni. Ezzel összhangban a degradálódó mielinből lipidtartalmú törmelék jelenlétét detektáltuk a mielinizált rostok mentén. A háromdimenziós térbeli eloszlását vizsgáltuk a mielin törmeléknek és elsőként kvantifikáltuk a mielin degradációból származó lipid maradványokat. Kimutattuk, hogy a kezdeti stádiumban a demielinizációból keletkező lipid maradványok cseppek formájában jelennek meg, még a kimutatható mielin vastagság csökkenése előtt. Eredményeink alapján krónikus demielinizáció esetén a lipid rendkívül lassú lebonthatósága miatt jelentős lipid maradvány halmozódik föl, ami kiválthatja/súlyosbíthatja az autoimmun reakciót.

7.2. Agykérgi neurogliaform sejthálózat által kiváltott ionotróp és metabotróp gátló posztszinaptikus válaszok eltérő összegződése

A központi idegrendszerben egyetlen idegsejtre több ezer serkentő szinaptikus bement érkezik. Ezeknek a serkentő bemeneteknek a változatos összegződése határozza meg az idegsejt kimenetét, ugyanis amennyiben a serkentés hatására keletkezett depolarizáció eléri a küszöbpotenciál értéket, akciós potenciál keletkezik. A megfelelő működés érdekében a serkentő bementek szabályzására van szükség, ami a gátló szinaptikus bemenetek által valósul meg. A gátlás két jelátviteli folyamat által mehet végbe: (1) az ionotróp GABA_A receptoron keresztül GABA neurotransmitter bekötést követően Cl⁻ ionok áramlanak be a sejtbe, ezzel a sejt membránpotenciál értékét hiperpolarizáltabb érték felé tolják. Ezzel szemben a (2) metabotróp GABA_B receptorok aktivációját indirekt jelátviteli folyamatok jellemzik. GABA neurotransmitter bekötés hatására az $\alpha\beta$ komplexből felépülő G-fehérje konformáció változást szenved el és az α -alegységen a GDP GTP-re cserélődik. Az így aktivált $\beta\gamma$ -alegység disszociál és a plazmamembránhoz kötötten laterális diffúzió által divergens jelátviteli folyamatokban vesz részt, többek között beköthet a közeli G-fehérjéhez kapcsolt befelé egyenirányító káliumcsatornához (GIRK), aminek hatására a K⁺ konduktancia megnövekszik, így a K⁺ ionok kiáramlásával az idegsejt membránpotenciálja hiperpolarizálódik. Az ionotróp jelek integrációja kulcsfontosságú a neuronális információ feldolgozás megfelelő térbeli és időbeli szabályzásában. Az agykéregben lejátszódó ionotróp receptorok által végbemenő

integrációs folyamatok jellemzése, illetve annak megértése, hogyan dolgozzák fel az idegsejtek bementi információt kimenetként mindig is központi kérdés volt az agykutatásban az agy működésének megértése szempontjából. Azonban ismereteink szerint kísérletes adat nem áll rendelkezésre azzal kapcsolatban, miként integrálódnak a gátló metabotróp receptorok által generált elektromos jelek. Az agykérgi interneuronok között egyetlen sejtípus, a neurogliaform sejt képes egyetlen akciós potenciáljával ionotróp GABA_A receptorok aktiválása mellett, az extraszinaptikus metabotróp GABA_B receptorok aktiválására is. A hatékony GABA_B receptor aktivációt az ún. térfogati jelátviteli mechanizmus biztosítja, amely során a neurogliaform sejt a többi interneuron típussal ellentétben GABA neurotranszmittert az extracelluláris térbe szabadítja fel.

Disszertációm a NGF sejtek által alkotott hálózat strukturális és funkcionális jellemzői révén biztosított konvergáló heterogén bemenetek, metabotróp és ionotróp komponensének az összegződését vizsgálja posztzinaptikus piramissejteken. Elsőként az egyes NGF sejtek által alkotott gátló kapcsolatok strukturális és funkcionális jellemzését végeztük. E célból *in vitro* két csatornás whole-cell patch clamp elvezetésekét végeztünk 1. rétegi NGF sejten és 2./3. rétegi piramissejten patkány szomatoszenzoros agykérgi preparátumokon. Funkcionális vizsgálataink által megbecsültük a NGF sejt által alkotott gátló kapcsolat kvantális paramétereit. A funkcionális tulajdonságokon túl fénymikroszkópos háromdimenziós anatómiai vizsgálatokat végeztünk a gátló kapcsolatok strukturális feltérképezéséhez. A korrelált funkcionális és strukturális vizsgálatok eredményei megerősítették a korábbi elméleteket a térfogati jelátviteli folyamatok meglétéről, mi több kísérletes vizsgálataink alapján úgy állapítottuk meg, hogy a NGF sejt preszinaptikus terminálisából felszabaduló GABA effektív hatótávolságának becsült értéke legfeljebb $\sim 2\mu\text{m}$. Az egyes NGF sejtek gátló kapcsolatának jellemzését követően az agykérgi felsőrétegi NGF sejtek által alkotott hálózatot tanulmányoztuk. Anatómiai vizsgálatokkal definiáltuk a rendkívül sűrű NGF sejtekre jellemző axonhálózat és az axon mentén elhelyezkedő frekvenciált bouton eloszlást, illetve a felsőbb rétegi agykéregben elhelyezkedő NGF sejtek eloszlását. Ezen adatok birtokában a teljes felsőrétegi NGF sejtpopuláció lehetséges posztzinaptikus egységnyi térfogatára konvergáló bemeneteit számszerűsítettük. Eredményeink arra utalnak, hogy az agykérgi felsőbb rétegekben a térfogait transzmisszió által biztosított relatív nagy effektív jelátviteli távolság figyelembe vételével, az extracelluláris tér jelentős részén ($83,04 \pm 5,56\%$) legfeljebb kettő NGF sejt bemenet konvergálhat. Továbbá az extracelluláris tér kisebb részében ($16,95 \pm 5,56\%$) található olyan egységnyi térfogat, ami hozzáférhető több mint kettő NGF sejt számára, még ha a teljes

NGF sejtpopuláció is aktív egyidőben. A NGF sejtpopuláció *in vivo* aktivitásával kapcsolatban jelenleg ismereteink hiányosak, nem ismert hogy az általunk alkotott modell alapján konvergáló bementeknek lehetőséget biztosító összehangolt aktivitás előfordul-e az agykéregben. Ennek kiderítése érdekében *in vivo* kétfoton Ca^{2+} képalkotó kísérleteket végeztünk, ahol a szomatoszenzoros agyterületen követtük nyomon a felsőbb rétegi NGF sejtpopuláció aktivitását ipszilaterális végtag stimuláció alatt. Kísérleteink igazolták a NGF sejtek aktív részvételét az interhemiszfériális gátlási folyamatban. Szenzoros stimulálás hatására a két agyfélteke közötti kommunikációt biztosító kallózális bemenetek által a teljes NGF sejtpopuláció ~70%-ánál figyeltünk meg összehangolt aktivációt. Eddigi eredményeink arra utalnak, hogy az első rétegi NGF sejtpopuláció képes egységesen, kooperatív módon ionotróp és metabotróp GABA receptorokon keresztül gátlást kifejteni a posztszinaptikus célsejteken fiziológias körülmények között. Ezért az ionotróp és metabotróp receptorok által kiváltott válaszok összegződésének vizsgálatához közvetlen elektrofiziológiai vizsgálatot, szimultán három csatornás whole-cell patch méréseket végeztünk kettő 1. rétegi preszinaptikus NGF sejtről és egy 2./3. rétegi posztszinaptikus piramissejtről, amire a konvergens bemenetek érkeztek. Méréseink a gyors, ionotróp GABA_A receptorok által közvetített posztszinaptikus potenciálok szublineáris összegződését mutatta. A lassú, metabotróp GABA_B receptorok által közvetített válaszok azonban eltérő, lineáris összegződést mutattak. Korábbi számítógépes szimulációs módszeren alapuló tanulmány a metabotróp receptorok összegződése esetén erőteljes szupralineáris kölcsönhatást jósolt a G-fehérje rendszeren történő jelamplifikációs hatás miatt. Annak érdekében, hogy megértsük milyen lehetséges mechanizmusok befolyásolják a prediktált szupralineáris összegződést farmakológiai kísérleteket végeztünk. Eredményeink arra utalnak, hogy az esetleges HCN1 csatorna aktivitás, illetve az extracelluláris GABA visszavételi mechanizmus nem befolyásolja a posztszinaptikus sejten a GABA_B jelek integrációját. A posztszinaptikus sejten a GABA_B receptor és a GIRK csatorna szubcelluláris kompartment függő eloszlást mutat, a dendrittüske felületén jellemzően szoros receptor-csatorna komplex kolokalizációt, míg a dendrit törzs felületén szegregáltabb elrendeződés jellemző. Következésképp további vizsgálataink arra irányultak, hogy kiderítsük a receptor-csatorna komplex elhelyezkedés hatással van-e a metabotróp jelek integrációjára. Komplex számítógépes szimulációs környezetet alkottunk, ami magába foglalt egy ultrastrukturálisan rekonstruált dendrit szakaszt, lehetséges NGF sejt általi neurotranszmitter felszabadulási helyeket és megfelelően paraméterezett extracelluláris teret. A dendritszakasz membránfelületére GABA_B receptor-GIRK csatorna csoportosulásokat helyeztünk kompartment-függő eloszlással. A realisztikus térbeli szimulációs közegben a részecskék

sztochasztikus mozgását és köztük lejátszódó kölcsönhatásokat MCell v3.4 programmal szimuláltuk. Eredményeink arra utalnak, hogy a receptor-csatorna komplex eloszlása önmagában hatással van a jelek integrációjára: szorosan elhelyezkedés esetében szupralineáris irányba eltolódott összegződés tapasztalható, míg a távolabbi elhelyezkedés során szublineáris eltolódás figyelhető meg.

8. Summary

8.1 Quantitative analysis of lipid debris accumulation caused by cuprizone induced myelin degradation in different CNS areas

Multiple sclerosis (MS) is a disease of the oligodendrocyte and the myelin sheath, affecting both the white and gray matter. The disease has diverse symptoms such as tremor, fatigue, and paralysis. In most cases the symptoms occur in a relapsing-remitting manner, which after a decade devolve into a persistent progressive state. MS is caused by the demyelination and inflammation of axonal tracts. Since myelin acts as an insulator, the injury of myelin sheaths around axons causes malfunction in the CNS by impairing conduction of electric signals. Moreover, the loss of myelin causes axonal and finally neuronal degeneration. The precise pathological mechanisms involved in MS are subject to considerable debate. Commonly MS is defined as an autoimmune disease initiated by an immune system dysregulation. The dysregulation prompts autoreactive T-cells to enter the brain, where they induce microglia and macrophages to attack and erode myelin, which finally causes the injury of oligodendrocytes. This theory is corroborated by the fact that current effective treatments of MS are based on anti-inflammatory and immunomodulatory agents. Immune dysregulation is also supported by the results of genome-wide association (GWAS) studies showing an excessive number of genes influencing T-cell differentiation. However, mechanisms of MS initiation are still hypothetical and multiple factors such as gender, viral infection, genetic predisposition, environmental and living circumstances were suggested as potential contributors. An alternative hypothesis for the etiology has been proposed due to lack of lymphocytic infiltrates in early lesions. It was suggested that the death of the oligodendrocyte may be the primary problem of the disease and the autoreactivity to the release of myelin debris causes more inflammation and further demyelination. Modelling of human demyelination disease includes genetically modified animals, virus and toxin-induced demyelination and the most frequent rodent model of MS, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). The latter is in agreement with the autoimmune initiating theory by using an oligodendrocyte specific protein as an antigenic component to generate autoreaction against myelin. The present study induces demyelination initiated by the loss of oligodendrocytes by using cuprizone. This substance is an effective apoptotic agent, that disrupts the energy metabolism of oligodendrocytes through copper depletion leading to the disintegration of myelin sheath forming processes. Once oligodendrocytes and myelin sheaths had been degraded, lipid-rich debris must remain. To date, there is no specific data about the distribution and amount of myelin debris during the initiation

of MS, although it might be a significant risk factor in launching inflammatory processes. To preserve the chemical composition of myelin debris, we used the non-destructive coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscopy, a label-free imaging method capable of detecting specific molecules in living tissues by exciting the characteristic intrinsic vibrational frequency of its molecular bond. We focused femtosecond pulsed laser beams combining 796 nm “pump” and 1028 nm “Stokes” beams to acquire an excitation pulse with a frequency of vibration resonance of CH₂ bonds of lipid molecules. Based on CARS imaging, we quantitatively analyzed lipid distribution in different areas of acute brain slices of untreated animals, then we induced myelin degradation in C57BL/6 mice using cuprizone to induce demyelination. Lipid imaging with CARS microscopy on living *in vitro* brain slice preparations shows that mild demyelination causes a decrease in the lipid content of white matter, which leads to the emergence of lipid droplets in the extracellular space. Thus, progression in oligodendrocyte death can cause extensive myelin degradation coupled to the formation of an abundant mass of phagocytosed lipid residue.

8.2 Superficial neurogliaform cells activation leads to different summation of ionotropic and metabotropic GABA receptor mediated postsynaptic responses

Neurons in the cerebral cortex receive thousands of excitatory synaptic inputs that drive their spike outputs. Regulation and efficacy of arriving excitatory inputs are effectively governed by the GABAergic inhibitory inputs. This signaling mechanism involves a transmembrane ion channel the GABA_A receptor that allows Cl⁻ ions to pass rapidly through the membrane in response to the binding of GABA neurotransmitter. In contrast, GABA binding to metabotropic GABA_B receptors catalyzes GDP/GTP exchange at the Gα subunit and the dissociation of Gβγ. The Gβγ subunits - as membrane-anchored proteins - locally diffuse in the plasma membrane and up to four Gβγ subunits directly bind cooperatively to G-protein gated inward rectifier (GIRK) channels and trigger a channel opening that drives the membrane potential towards the K⁺ reverse potential. The integration of ionotropic inhibitory signals on the surface of pyramidal cell dendrites plays a large role in a temporally precise and spatially segregated mode of shaping the neuronal computation. Summation of ionotropic receptor-mediated responses is extensively studied in the neocortex. However, to date, there has been no experimental analysis of how neurons integrate electrical signals that are linked to inhibitory metabotropic receptors. Among the cortical interneurons, neurogliaform (NGF) cells are especially effective in recruiting metabotropic GABA_B receptors in addition to ionotropic GABA_A receptors using non-

discriminatory volume transmission to cover extrasynaptic and synaptic locations of the neuronal microcircuitry.

In my doctoral thesis, we characterized the functional and structural features of the inhibitory connections established by superficial NGF cell population, moreover, we described the integration properties of the ionotropic and metabotropic components of converging heterogenic NGF cells' inhibitory inputs'. First, we focused on defining the functional and structural features of the inhibitory connections established by individual NGF cells. *In vitro* simultaneous dual whole-cell patch clamp recordings were carried out on synaptically connected L1 NGFC to L2/3 PC pairs in brain slices from the somatosensory cortex of juvenile male Wistar rats. With these experiments we managed to yield the quantal parameters of the inhibitory connection established by individual NGF cells. Combining this data with the mapped putative release sites made by three-dimensional light microscopic reconstructions, we confirmed previous observations about the existence of volume transmission; furthermore, we were able to reveal the possible effective distance for GABA receptor activation after quantal release at a single release site of NGFC being between 0.95 up to 1.92 μm . After characterizing individual NGF cells inhibitory connection, we shifted our focus to examine the output of superficial NGF cell population's. The construction of a three-dimensional spatial model was aimed to investigate the impact of individual NGF cells effective signaling distance, while also taking into account the extremely dense axonal arborization and the frequent axonal boutons to determinate the properties of global output of the entire superficial NGF cell network. This allowed the mapping of the possible coverage of the surrounding tissue by GABA simultaneously originating from all NGF cell terminals. This framework indicates that despite the widened signaling mode by volume transmission most of the extracellular space ($83.04 \pm 5.56\%$) is only accessible for single or two NGFCs. Moreover, a smaller fraction ($16.95 \pm 5.56\%$) of the extracellular space is reachable for more than two NGFC with GABA if the entire NGFC population is active simultaneously. However, NGF cell population activity under *in vivo* condition is still unexplored; therefore, it is still unknown that the contingency for converging outputs suggested by the model is feasible. Thus, *in vivo* two-photon Ca^{2+} imaging was carried out to monitor superficial NGF cell population activity in the somatosensory cortex during ipsilateral hind limb stimulation. Our results confirmed that NGF cells are recruited during interhemispheric inhibition. Upon sensory stimulus, communication between the two hemispheres through callosal input mediates a substantial portion of L1 interneurons simultaneous coactivation, which $\approx 70\%$ of the neurons were positive for α -actinin2 indicating

high coactivation of the NGF cell population providing a contingency for converging input in particular physiological condition. Together these approaches suggest that superficial NGF cell population manage to operate together, and cooperatively recruits divergent ionotropic and metabotropic GABA receptor-mediated inhibition on its postsynaptic targets. Direct measurements of two converging NGFC inputs on L2/3 PC from triplet whole-cell patch clamp recordings revealed sublinear summation properties for the ionotropic GABA_A mediated responses. However, metabotropic GABA_B mediated responses show disparate linear summation. This data combined with the NGF cell population spatial model, and the *in vivo* observed co-activation, suggests that converging afferents that act on inhibitory metabotropic receptors on the same postsynaptic voxel show linear or slightly sublinear summation, conserving the impact of individual inputs. So far solely computational model studies were aimed to explore the integration properties of GABA_B receptor-mediated responses, and they predicted a highly supralinear interaction through the amplification effect of G-protein cooperativity. To further our knowledge regarding the possible modulatory mechanism influence on the predicted supralinear interaction on metabotropic receptors, we tested the functional role of voltage-dependent inward rectifier K⁺ channels and GABA reuptake. Our results show that both HCN1 channel activity and GABA scavenging mechanisms do not influence the integration properties of GABA_B signals. An electron-microscopy study previously showed that the GABA_B receptor-GIRK channel complex distribution differs in subcellular level: the dendritic spines appear to have a strong co-localization, while receptor-channel complexes on the shaft are preferentially segregated. Thus, we further investigated the possible influence of the receptor-channel complexes spatial distribution on the integration properties of inhibitory metabotropic receptor-mediated responses. We attempted to construct a realistic model containing three-dimensional ultrastructural reconstructions of a dendritic segment populated with GABA_B receptors, downstream G-protein signaling and GIRK channels. In this form of signaling stimulated GABA_B receptors release G-proteins, which diffuse on the cytosolic surface of the membrane. $\beta\gamma$ subunit of G-protein binds to the GIRK channel that leads to open conformation, and drives the membrane potential towards the K⁺ reverse potential. Our results indicate that the spatial distribution itself has an effect on the integration properties: tight localization of the receptor-channel favors to the supralinear molecular interaction, while, segregated placement likely shift the interaction towards sublinear.

9. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Tamás Gábornak, hogy lehetőséget nyújtott, hogy a kutatócsoportjában dolgozzak. Hálás vagyok, hogy általa az elmúlt években magas színvonalú kutatói képzésben részesülhettem. Továbbá szeretném megköszönni Dr. Molnár Gábornak az évek során nyújtott segítségét valamint szakmai iránymutatását.

Köszönettel tartozom a labor munkatársainak, akik részt vettek a disszertációm alapjául szolgáló kísérletek kivitelezésében: Dr. Komlósi Gergelynek és Oláh Gáspárnak az elektrofiziológiai kísérletekhez nyújtott nélkülözhetetlen hozzájárulásukért, Dr. Baka Judithnak a kitűnő anatómiai munkáért, Dr. Szipőcs Róbertnek a CARS rendszer fejlesztésért, és folyamatos karbantartásáért, Ozsvár Zoltánnak programozásért. Dr. Barzó Pálnak köszönöm, hogy biztosította az emberi agyszövet mintákat. Továbbá köszönettel tartozom a precíz anatómiai rekonstrukciók elkészítéséért Ábrahám-Tóth Nellinek, illetve köszönöm Tóth Évának a töretlen technikai támogatást. Dr. Rózsa Mártonnak hálás vagyok az inspiráló beszélgetésekért illetve a technikai segítségeiért. A labor többi jelenlegi és volt munkatársainak: Averkin Róbertnek, Bakos Emőkének, Boldog Eszternek, Bordé Sándornak, Furdan Szabinának, Horváth Jánosnak, Dr. Kocsis Katalinnak, Kovács Balázsnak, Lákovics Rajmundnak, Lehoczki Bettinának, Lovas Sándornak, Mezei Leonának, Mihut Norbertnek, Szemenyei Viktornak, Tóth Martinnak, Törteli Annának és Piszár Ildikónak, köszönöm a baráti és motiváló légkört. Váradi Margónak köszönöm, hogy az évek alatt hozzáfordulhattam adminisztratív segítségért, valamint az Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék dolgozóinak köszönöm a barátságos légkört.

Köszönöm a családomnak a támogatást, ami nélkülözhetetlen volt a tanulmányaim során.

Köszönöm Krekic Szilviának a disszertáció elkészítéséhez során nyújtott segítséget és támogatást.

10. Irodalomjegyzék

- Abs, Elisabeth et al. 2018. "Learning-Related Plasticity in Dendrite-Targeting Layer 1 Interneurons." *Neuron* 100(3): 684–699.e6.
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627318307748>.
- Acs, Péter, and Bernadette Kalman. 2012. *Autoimmunity, Methods in Molecular Biology*.
- Adams, Colin. 1989. "A Colour Atlas of Multiple Sclerosis and Other Myelin Disorders." *Trends in Neurosciences* 12(7): 272.
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0166223689900301>.
- Ali, Afia B, and Alex M Thomson. 2008. "Synaptic A5 Subunit-Containing GABAA Receptors Mediate Ipsps Elicited by Dendrite-Preferring Cells in Rat Neocortex." *Cerebral Cortex* 18(6): 1260–71.
- Ariav, Gal, Alon Polsky, and Jackie Schiller. 2003. "Submillisecond Precision of the Input-Output Transformation Function Mediated by Fast Sodium Dendritic Spikes in Basal Dendrites of CA1 Pyramidal Neurons." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23(21): 7750–58.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12944503>.
- Ascoli, Giorgio A. et al. 2008. "Petilla Terminology: Nomenclature of Features of GABAergic Interneurons of the Cerebral Cortex." *Nature Reviews Neuroscience* 9(7): 557–68. <https://www.nature.com/nrn/journal/v9/n7/pdf/nrn2402.pdf>.
- Azevedo, Frederico A.C. et al. 2009. "Equal Numbers of Neuronal and Nonneuronal Cells Make the Human Brain an Isometrically Scaled-up Primate Brain." *Journal of Comparative Neurology* 513(5): 532–41.
- Bando, Yoshio et al. 2008. "Differential Changes in Axonal Conduction Following CNS Demyelination in Two Mouse Models." *European Journal of Neuroscience* 28(9): 1731–42.
- Barker, B Y J L, B R Ransom, and Developmental Neurobiology. 2009. "AMINO ACID PHARMACOLOGY OF MAMMALIAN CENTRAL From the Laboratory of Neurophysiology , NINCDS ,." *Journal of Physiology* (1978): 331–54.
- Barnett, Michael H., and John W. Prineas. 2004. "Relapsing and Remitting Multiple

- Sclerosis: Pathology of the Newly Forming Lesion.” *Annals of Neurology* 55(4): 458–68.
<http://doi.wiley.com/10.1002/ana.20016>.
- Beenhakker, M. P., and J. R. Huguenard. 2010. “Astrocytes as Gatekeepers of GABAB Receptor Function.” *Journal of Neuroscience* 30(45): 15262–76.
- Bekkers, John M. 1994. “Quantal Analysis of Synaptic Transmission in the Central Nervous System.” *Current Opinion in Neurobiology* 4(3): 360–65.
- Benardo, L. S. 1994. “Separate Activation of Fast and Slow Inhibitory Postsynaptic Potentials in Rat Neocortex in Vitro.” *The Journal of Physiology* 476(2): 203–15.
- Berger, Thomas, Matthew E Larkum, and H R Lüscher. 2001. “High I(h) Channel Density in the Distal Apical Dendrite of Layer V Pyramidal Cells Increases Bidirectional Attenuation of EPSPs.” *Journal of neurophysiology* 85(2): 855–68.
www.jn.physiology.org.
- Bhumbra, G. S., and M. Beato. 2013. “Reliable Evaluation of the Quantal Determinants of Synaptic Efficacy Using Bayesian Analysis.” *Journal of Neurophysiology* 109(2): 603–20. <http://www.physiology.org/doi/10.1152/jn.00528.2012>.
- Biro, A. A. 2005. “Quantal Size Is Independent of the Release Probability at Hippocampal Excitatory Synapses.” *Journal of Neuroscience* 25(1): 223–32.
- Blakemore, W.F. 1973. “Demyelination of the Superior Cerebellar Peduncle in the Mouse Induced by Cuprizone.” *Journal of the Neurological Sciences* 20(1): 63–72.
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0022510X73901184>.
- Bohannon, Andrew S., and John J. Hablitz. 2018. “Optogenetic Dissection of Roles of Specific Cortical Interneuron Subtypes in GABAergic Network Synchronization.” *Journal of Physiology* 596(5): 901–19.
- Boven, Leonie A. et al. 2006. “Myelin-Laden Macrophages Are Anti-Inflammatory, Consistent with Foam Cells in Multiple Sclerosis.” *Brain* 129(2): 517–26.
<http://academic.oup.com/brain/article/129/2/517/292243/Myelinladen-macrophages-are-antiinflammatory>.
- Branco, Tiago, Beverley A. Clark, and Michael Häusser. 2010. “Dendritic Discrimination of Temporal.” *Science* 329(September): 1671–75.

- Breitwieser, G. E. 1988. "Mechanism of Muscarinic Receptor-Induced K⁺ Channel Activation as Revealed by Hydrolysis-Resistant GTP Analogues." *The Journal of General Physiology* 91(4): 469–93. <http://www.jgp.org/cgi/doi/10.1085/jgp.91.4.469>.
- Brinkerhoff, Christopher J., Ji Sun Choi, and Jennifer J. Linderman. 2008. "Diffusion-Limited Reactions in G-Protein Activation: Unexpected Consequences of Antagonist and Agonist Competition." *Journal of Theoretical Biology* 251(4): 561–69.
- Bruck, Wolfgang et al. 1995. "Monocyte/Macrophage Differentiation in Early Multiple Sclerosis Lesions Materials and Methods Biopsy Material and Clinical Data." *Ann Neurol* 38: 788–96.
- Buzsaki, Gyorgy. 2002. "Theta Oscillations in the Hippocampus." *Neuron* 33(3): 1–20. <http://www.buzsakilab.com/content/PDFs/BuzsakiTheta.pdf>.
- Cajal, Ramón y. 1899. "Comparative Study of the Sensory Areas of the Human Cortex."
- Capogna, Marco, and Robert A. Pearce. 2011. "GABAA, Slow: Causes and Consequences." *Trends in Neurosciences* 34(2): 101–12.
- Carboni, A A, W. G. Lavelle, C L Barnes, and P. B. Cipolloni. 1990. "Neurons of the Lateral Entorhinal Cortex of the Rhesus Monkey: A Golgi, Histochemical, and Immunocytochemical Characterization." *Journal of Comparative Neurology* 291(4): 583–608.
- Cash, Sydney, and Rafael Yuste. 1998. "Input Summation by Cultured Pyramidal Neurons Is Linear and Position-Independent." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18(1): 10–15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9412481>.
- . 1999. "Linear Summation of Excitatory Inputs by CA1 Pyramidal Neurons." *Neuron* 22(2): 383–94.
- del Castillo, J., and B. Katz. 1954. "Quantal Components of the End-Plate Potential." *The Journal of Physiology* 124(3): 560–73. <http://doi.wiley.com/10.1113/jphysiol.1954.sp005129>.
- Chen, Gong, and Anthony N. van den Pol. 2018. "Presynaptic GABA B Autoreceptor Modulation of P/Q-Type Calcium Channels and GABA Release in Rat Suprachiasmatic Nucleus Neurons ." *The Journal of Neuroscience* 18(5): 1913–22.

- Clarner, Tim et al. 2012. "Myelin Debris Regulates Inflammatory Responses in an Experimental Demyelination Animal Model and Multiple Sclerosis Lesions." *Glia* 60(10): 1468–80.
- Constantinidis, Christos, and Patricia S Goldman-Rakic. 2002. "Correlated Discharges among Putative Pyramidal Neurons and Interneurons in the Primate Prefrontal Cortex." *Journal of neurophysiology* 88(6): 3487–97. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12466463>.
- Cossart, Rosa, Christophe Bernard, and Yehezkel Ben-Ari. 2005. "Multiple Facets of GABAergic Neurons and Synapses: Multiple Fates of GABA Signalling in Epilepsies." *Trends in Neurosciences* 28(2): 108–15.
- Craig, Michael T. et al. 2013. "Distinct Roles of GABAB1a- and GABAB1b-Containing GABABreceptors in Spontaneous and Evoked Termination of Persistent Cortical Activity." *Journal of Physiology* 591(4): 835–43.
- David, C. et al. 2009. "Classification of NPY-Expressing Neocortical Interneurons." *Journal of Neuroscience* 29(11): 3642–59.
- Defelipe, Javier, María C. González-Albo, María R. Del Río, and Guy N. Elston. 1999. "Distribution and Patterns of Connectivity of Interneurons Containing Calbindin, Calretinin, and Parvalbumin in Visual Areas of the Occipital and Temporal Lobes of the Macaque Monkey." *Journal of Comparative Neurology* 412(3): 515–26.
- Degro, Claudius E., Akos Kulik, Sam A. Booker, and Imre Vida. 2015. "Compartmental Distribution of Gabab Receptor-Mediated Currents along the Somatodendritic Axis of Hippocampal Principal Cells." *Frontiers in Synaptic Neuroscience* 7(MAR).
- Destexhe, Alain. 1995. "G Protein Activation Kinetics and Spillover of GABA May Account for Differences between Inhibitory Responses in the Hippocampus and Thalamus." *Neurobiology* 92(October): 9515–19.
- Doze, V. A., G. A. Cohen, and D. V. Madison. 2017. "Calcium Channel Involvement in GABAB Receptor-Mediated Inhibition of GABA Release in Area CA1 of the Rat Hippocampus." *Journal of Neurophysiology* 74(1): 43–53.
- Edwards, John et al. 2014. "VolRoverN: Enhancing Surface and Volumetric Reconstruction for Realistic Dynamical Simulation of Cellular and Subcellular Function." *Neuroinformatics* 12(2): 277–89.

- Eric R. Kandel, James H. Schwartz, Thomas M. Jessell, Steven A. Siegelbaum, A. J. Hudspeth. 2013. *Principles of Neural Science, Fifth Edition*. McGraw-Hill Professional.
- Fejtova, Anna et al. 2010. “Bassoon Speeds Vesicle Reloading at a Central Excitatory Synapse.” *Neuron* 68(4): 710–23.
- Ferrer, I, I Fabregues, and E Condom. 1986. “A Golgi Study of the Sixth Layer of the Cerebral Cortex. II. The Gyrencephalic Brain of Carnivora, Artiodactyla and Primates.” *J. Anat* 146: 87–104.
- Freund, Tamás F. 2003. “Interneuron Diversity Series: Rhythm and Mood in Perisomatic Inhibition.” *Trends in Neurosciences* 26(9): 489–95.
- Freund, Tamás F., and György Buzsáki. 1996. “Interneurons of the Hippocampus.” *Hippocampus* 6(4): 347–470. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8915675>.
- Frohman, Elliot M., Michael K. Racke, and Cedric S. Raine. 2006. “Multiple Sclerosis — The Plaque and Its Pathogenesis.” *New England Journal of Medicine* 354(9): 942–55. <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra052130>.
- Fu, Yan et al. 2011. “Paranodal Myelin Retraction in Relapsing Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Visualized by Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy.” *Journal of Biomedical Optics* 16(10): 106006. <http://biomedicaloptics.spiedigitallibrary.org/article.aspx?doi=10.1117/1.3638180>.
- Gabbott, Paul L A et al. 1997. 377 J. Comp. Neurol *Local-Circuit Neurones in the Medial Prefrontal Cortex (Areas 25, 32 and 24b) in the Rat: Morphology and Quantitative Distribution Indexing Terms: Calcium-Binding Proteins; GABA; NADPH Diaphorase; Cortical Modules; Limbic System*.
- Gasparini, Sonia. 2004. “On the Initiation and Propagation of Dendritic Spikes in CA1 Pyramidal Neurons.” *Journal of Neuroscience* 24(49): 11046–56.
- Goldberg, Johannes, Tim Clarner, Cordian Beyer, and Markus Kipp. 2015. “Anatomical Distribution of Cuprizone-Induced Lesions in C57BL6 Mice.” *Journal of Molecular Neuroscience* 57(2): 166–75. <http://link.springer.com/10.1007/s12031-015-0595-5>.
- Gonzalez-Burgos, Guillermo et al. 2009. “GABA Transporter GAT1 Prevents Spillover at Proximal and Distal GABA Synapses Onto Primate Prefrontal Cortex Neurons.” *Journal of Neurophysiology* 101(2): 533–47.

- <http://www.physiology.org/doi/10.1152/jn.91161.2008>.
- Groebe, Angela et al. 2009. "Cuprizone Treatment Induces Distinct Demyelination, Astrocytosis, and Microglia Cell Invasion or Proliferation in the Mouse Cerebellum." *The Cerebellum* 8(3): 163–74. <http://link.springer.com/10.1007/s12311-009-0099-3>.
- Gudi, Viktoria et al. 2009. "Regional Differences between Grey and White Matter in Cuprizone Induced Demyelination." *Brain Research* 1283: 127–38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2009.06.005>.
- Guyon, A., and N. Leresche. 1995. "Modulation by Different GABAB Receptor Types of Voltage-activated Calcium Currents in Rat Thalamocortical Neurones." *The Journal of Physiology* 485(1): 29–42.
- Haluszka, Dóra et al. 2015. "In Vivo Second-Harmonic Generation and Ex Vivo Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy to Study the Effect of Obesity to Fibroblast Cell Function Using an Yb-Fiber Laser-Based CARS Extension Unit." *Microscopy Research and Technique* 78(9): 823–30.
- Hamada, M. S., and M. H. P. Kole. 2015. "Myelin Loss and Axonal Ion Channel Adaptations Associated with Gray Matter Neuronal Hyperexcitability." *Journal of Neuroscience* 35(18): 7272–86. <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.4747-14.2015>.
- Harayama, Nobuya et al. 1998. "Inhibition of N- and P/Q-Type Calcium Channels by Postsynaptic GABA(B) Receptor Activation in Rat Supraoptic Neurones." *Journal of Physiology* 509(2): 371–83.
- Hemmer, Bernhard, Juan J. Archelos, and Hans-Peter Hartung. 2002. "New Concepts in the Immunopathogenesis of Multiple Sclerosis." *Nature Reviews Neuroscience* 3(4): 291–301. <http://www.nature.com/articles/nrn784>.
- Hilderbrand, C, S Remahl, H Persson, and C Bjartmar. 1993. "Myelinated Nerve Fibres in the CNS." *Progress in Neurobiology* 40(3): 319–84. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/030100829390015K>.
- Hiremath, M.M. et al. 1998. "Microglial/Macrophage Accumulation during Cuprizone-Induced Demyelination in C57BL/6 Mice." *Journal of Neuroimmunology* 92(1–2): 38–49. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165572898001684>.
- Hodge, Rebecca D et al. 2019. "Conserved Cell Types with Divergent Features in Human

- versus Mouse Cortex.” *Nature* 573(7772): 61–68. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1506-7>.
- Hu, Hua, Jian Gan, and Peter Jonas. 2014. “Fast-Spiking, Parvalbumin+ GABAergic Interneurons: From Cellular Design to Microcircuit Function.” *Science* 345(6196).
- Huguenard, J R, and B E Alger. 1986. “Whole-Cell Voltage-Clamp Study of the Fading of GABA-Activated Currents in Acutely Dissociated Hippocampal Neurons.” *J.Neurophysiol.* 56(1): 1–18.
- Huizinga, Ruth et al. 2012. “Phagocytosis of Neuronal Debris by Microglia Is Associated with Neuronal Damage in Multiple Sclerosis.” *Glia* 60(3): 422–31.
- Huston, E., G. P. Cullen, J. R. Burley, and A. C. Dolphin. 1995. “The Involvement of Multiple Calcium Channels Sub-Types in Glutamate Release from Cerebellar Granule Cells and Its Modulation by GABAB Receptor Activation.” 68(2).
- Imitola, Jaime et al. 2011. “Multimodal Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy Reveals Microglia-Associated Myelin and Axonal Dysfunction in Multiple Sclerosis-like Lesions in Mice.” *Journal of Biomedical Optics* 16(2): 021109. <http://biomedicaloptics.spiedigitallibrary.org/article.aspx?doi=10.1117/1.3533312>.
- Inda, M. C., J. DeFelipe, and A. Muñoz. 2009. “Morphology and Distribution of Chandelier Cell Axon Terminals in the Mouse Cerebral Cortex and Claustramygdaloid Complex.” *Cerebral Cortex* 19(1): 41–54.
- Insel, Nathan, and Carol A. Barnes. 2015. “Differential Activation of Fast-Spiking and Regular-Firing Neuron Populations during Movement and Reward in the Dorsal Medial Frontal Cortex.” *Cerebral Cortex* 25(9): 2631–47.
- Isaacson, J. S., J. M. Solis, and R. A. Nicoll. 1993. “Local and Diffuse Synaptic Actions of GABA in the Hippocampus.” *Neuron* 10(2): 165–75.
- Isaacson, Jeffrey S., and Bruce Walmsley. 1995. “Counting Quanta: Direct Measurements of Transmitter Release at a Central Synapse.” *Neuron* 15(4): 875–84.
- Jackson, Jesse et al. 2018. “Inhibitory Control of Prefrontal Cortex by the Claustrum.” *Neuron* 99(5): 1029–1039.e4. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627318306299>.
- Jeon, Sae-Bom et al. 2008. “Sulfatide, A Major Lipid Component of Myelin Sheath, Activates

- Inflammatory Responses As an Endogenous Stimulator in Brain-Resident Immune Cells.” *The Journal of Immunology* 181(11): 8077–87.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19018000>.
- Jiang, Xiaolong et al. 2013. “The Organization of Two New Cortical Interneuronal Circuits.” *Nature Neuroscience* 16(2): 210–18.
- . 2015. “Principles of Connectivity among Morphologically Defined Cell Types in Adult Neocortex.” *Science* 350(6264): aac9462-aac9462.
<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.aac9462>.
- Julia, Veit et al. 2012. “Cortical Gamma Band Synchronization through Somatostatin Interneurons.” 17(10): 1310–14.
- Kalinichenko, S G, I I Pushchin, and I V Dyuzhen. 2006. “Neurochemical Diversity of Neurogliaform Cells in the Human Primary Motor Cortex.” *Journal of Chemical Neuroanatomy* 31(4): 304–10.
- Kalmbach, Brian E. et al. 2018. “H-Channels Contribute to Divergent Intrinsic Membrane Properties of Supragranular Pyramidal Neurons in Human versus Mouse Cerebral Cortex.” *Neuron* 100(5): 1194–1208.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.10.012>.
- Karayannis, Theofanis et al. 2010. “Slow GABA Transient and Receptor Desensitization Shape Synaptic Responses Evoked by Hippocampal Neurogliaform Cells.” *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30(29): 9898–9909.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20660272>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3377669>.
- Karnani, Mahesh M M. et al. 2016. “Cooperative Subnetworks of Molecularly Similar Interneurons in Mouse Neocortex.” *Neuron* 90(1): 86–100.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2016.02.037>.
- Kawaguchi, Y, and Y Kubota. 1998. “Neurochemical Features and Synaptic Connections of Large Physiologically-Identified GABAergic Cells in the Rat Frontal Cortex.” *Neuroscience* 85(3): 677–701.
- Kawaguchi, Yasuo, and Yoshiyuki Kubota. 1997. “GABAergic Cell Subtypes and Their Synaptic Connections in Rat Frontal Cortex.” *Cerebral Cortex* 7(6): 476–86.
- Kemper, Thomas L., Daniel A. Pasquier, and Shelley Drazen. 1978. “Effect of a Low Protein

- Diet on the Anatomical Development of Subcortical Formations.” *Brain Research Bulletin* 3(5): 443–50.
- Kerr, Rex A. et al. 2008. “Fast Monte Carlo Simulation Methods for Biological Reaction-Diffusion Systems in Solution and on Surfaces.” *SIAM Journal on Scientific Computing* 30(6): 3126–49. <http://epubs.siam.org/doi/10.1137/070692017>.
- Kipp, Markus et al. 2009. “The Cuprizone Animal Model: New Insights into an Old Story.” *Acta Neuropathologica* 118(6): 723–36. <http://link.springer.com/10.1007/s00401-009-0591-3>.
- Kisvárdy, Z. F. et al. 1990. “Synapses, Axonal and Dendritic Patterns of Gaba-Immunoreactive Neurons in Human Cerebral Cortex.” *Brain* 113(3): 793–812.
- Korn, Henri, and Donald S. Faber. 1991. “Quantal Analysis and Synaptic Efficacy in the CNS.” *Trends in Neurosciences* 14(10): 439–45.
- Kornek, Barbara, and Hans Lassmann. 2003. “Neuropathology of Multiple Sclerosis-New Concepts.” *Brain research bulletin* 61(3): 321–26. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12909302>.
- Kotter, M. R. 2006. “Myelin Impairs CNS Remyelination by Inhibiting Oligodendrocyte Precursor Cell Differentiation.” *Journal of Neuroscience* 26(1): 328–32. <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.2615-05.2006>.
- Koutsoudaki, Paraskevi N. et al. 2009. “Demyelination of the Hippocampus Is Prominent in the Cuprizone Model.” *Neuroscience Letters* 451(1): 83–88.
- Kuhlmann, Tanja et al. 2002. “Acute Axonal Damage in Multiple Sclerosis Is Most Extensive in Early Disease Stages and Decreases over Time.” *Brain : a journal of neurology* 125(Pt 10): 2202–12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12244078>.
- Kulik, A. 2006. “Compartment-Dependent Colocalization of Kir3.2-Containing K⁺ Channels and GABAB Receptors in Hippocampal Pyramidal Cells.” *Journal of Neuroscience* 26(16): 4289–97. <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.4178-05.2006>.
- Kvitsiani, D. et al. 2013. “Distinct Behavioural and Network Correlates of Two Interneuron Types in Prefrontal Cortex.” *Nature* 498(7454): 363–66.
- Lagler, Michael et al. 2016. “Divisions of Identified Parvalbumin-Expressing Basket Cells

- during Working Memory-Guided Decision Making.” *Neuron* 91(6): 1390–1401.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2016.08.010>.
- Lampron, Antoine et al. 2015. “Inefficient Clearance of Myelin Debris by Microglia Impairs Remyelinating Processes.” *The Journal of Experimental Medicine* 212(4): 481–95.
<http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20141656>.
- Lanore, F. et al. 2012. “Deficits in Morphofunctional Maturation of Hippocampal Mossy Fiber Synapses in a Mouse Model of Intellectual Disability.” *Journal of Neuroscience* 32(49): 17882–93.
- Larkum, M. E., K. M. M. Kaiser, and B. Sakmann. 2002. “Calcium Electrogenesis in Distal Apical Dendrites of Layer 5 Pyramidal Cells at a Critical Frequency of Back-Propagating Action Potentials.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96(25): 14600–604.
- Larkum, Matthew et al. 2009. “Synaptic Integration in Tuft Dendrites of Layer 5 Pyramidal Neurons: A New Unifying Principle.” *Science* 325(5941): 756–60.
- . 2019. “A Cellular Mechanism for Cortical Associations : An Organizing Principle for the Cerebral Cortex.” *Trends in Neurosciences* 36(3): 141–51.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2012.11.006>.
- Larkum, Matthew E., J. Julius Zhu, and Bert Sakmann. 1999. “A New Cellular Mechanism for Coupling Inputs Arriving at Different Cortical Layers.” *Nature* 398(6725): 338–41.
- Larkum, Matthew E, and J Julius Zhu. 2002. “Signaling of Layer 1 and Whisker-Evoked Ca²⁺ and Na⁺ Action Potentials in Distal and Terminal Dendrites of Rat Neocortical Pyramidal Neurons In Vitro and In Vivo.” 22(16): 6991–7005.
- Lee, Alice J. et al. 2015. “Canonical Organization of Layer 1 Neuron-Led Cortical Inhibitory and Disinhibitory Interneuronal Circuits.” *Cerebral Cortex* 25(8): 2114–26.
<https://academic.oup.com/cercor/article-lookup/doi/10.1093/cercor/bhu020>.
- Lehmenkühler, A. et al. 1993. “Space Parameters in the Rat During Postnatal Development Determined By.” *Neuroscience* 55(2): 339–51.
- Li, Joshua Qiang, Kelvin C.P. Wang, and Junxiang Lou. 2016. “Impact of Time Coverage of Traffic Data Collection on Pavement ME Design.” *International Journal of Pavement Research and Technology* 9(1): 1–13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijprt.2015.12.001>.

- Lindner, M. et al. 2007. "Sequential Myelin Protein Expression during Remyelination Reveals Fast and Efficient Repair after Central Nervous System Demyelination." *Neuropathology and Applied Neurobiology* 34(1): 071026235340007-???.
<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2990.2007.00879.x>.
- Longordo, Fabio, Minh Son To, Kaori Ikeda, and Greg J Stuart. 2013. "Sublinear Integration Underlies Binocular Processing in Primary Visual Cortex." *Nature Neuroscience* 16(6): 714–23. <http://dx.doi.org/10.1038/nn.3394>.
- Longworth, L. G. 1952. "Diffusion Measurements, at 1°, of Aqueous Solutions of Amino Acids, Peptides and Sugars." *L Journal of the American Chemical Society* 649(1950): 1–2.
- Lörincz, Andrea et al. 2002. "Polarized and Compartment-Dependent Distribution of HCN1 in Pyramidal Cell Dendrites." *Nature Neuroscience* 5(11): 1185–93.
- Losonczy, Attila, and Jeffrey C Magee. 2006. "Integrative Properties of Radial Oblique Dendrites in Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons." *Neuron* 50(2): 291–307.
- Losonczy, Attila, Judit K Makara, and Jeffrey C Magee. 2008. "Compartmentalized Dendritic Plasticity and Input Feature Storage in Neurons." *Nature* 452(7186): 436–41.
- Lund, Jennifer S, and David A Lewis. 1993. "Local Circuit Neurons of Developing and Mature Macaque Prefrontal Cortex: Golgi and Immunocytochemical Characteristics." *Journal of Comparative Neurology* 328(2): 282–312.
- M. Kuno R. Llinás. 1962. "ENHANCEMENT OF SYNAPTIC TRANSMISSION BY DENDRITIC POTENTIALS IN CHROMATOLYSED MOTONEURONES OF THE CAT By." *J. Physiol.*: 311–33.
- Major, Guy et al. 2008. "Spatiotemporally Graded NMDA Spike/Plateau Potentials in Basal Dendrites of Neocortical Pyramidal Neurons." *Journal of Neurophysiology* 99(5): 2584–2601. <http://www.physiology.org/doi/10.1152/jn.00011.2008>.
- Maña, Paula et al. 2009. "Demyelination Caused by the Copper Chelator Cuprizone Halts T Cell Mediated Autoimmune Neuroinflammation." *Journal of Neuroimmunology* 210(1–2): 13–21. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2009.02.013>.
- De Marco García, Natalia V et al. 2015. "Sensory Inputs Control the Integration of Neurogliaform Interneurons into Cortical Circuits." *Nature Neuroscience* 18(3): 393–

- Markram, Henry et al. 2004. "Interneurons of the Neocortical Inhibitory System." *Nature Reviews Neuroscience* 5(10): 793–807.
- Matsushima, G K, and P Morell. 2001. "The Neurotoxicant, Cuprizone, as a Model to Study Demyelination and Remyelination in the Central Nervous System." *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 11(1): 107–16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11145196>.
- McCarren, M, and B E Alger. 1985. "Use-Dependent Depression of IPSPs in Rat Hippocampal Pyramidal Cells in Vitro." *J Neurophysiol* 53(2): 557–71.
- McDonald, Alexander J. 1983. "Cytoarchitecture of the Nucleus of the Lateral Olfactory Tract: A Golgi Study in the Rat." *Brain Research Bulletin* 10(4): 497–503.
- McDonald, Alexander J., and James L Culberson. 1981. "Neurons of the Basolateral Amygdala: A Golgi Study in the Opossum (*Didelphis Virginiana*)." *American Journal of Anatomy* 162(4): 327–42.
- Merrill, Jean E. 2009. "In Vitro and in Vivo Pharmacological Models to Assess Demyelination and Remyelination." *Neuropsychopharmacology* 34(1): 55–73.
- Meyer, Hanno S et al. 2011. "Inhibitory Interneurons in a Cortical Column Form Hot Zones of Inhibition in Layers 2 and 5A." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(40): 16807–12.
- Mody, I., Y. De Koninck, T. S. Otis, and I. Soltesz. 1994. "Bridging the Cleft at GABA Synapses in the Brain." *Trends in Neurosciences* 17(12): 517–25.
- Morell, Pierre, and Quarles Richard H. 1999. "Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects."
- Neumann, H., M. R. Kotter, and R. J. M. Franklin. 2008. "Debris Clearance by Microglia: An Essential Link between Degeneration and Regeneration." *Brain* 132(2): 288–95. <https://academic.oup.com/brain/article-lookup/doi/10.1093/brain/awn109>.
- Nimmerjahn, Axel. 2005. "Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo." *Science* 308(5726): 1314–18. <http://www.sciencemag.org/content/suppl/2005/05/26/1110647.DC1>.
- Oláh, Szabolcs et al. 2009. "Regulation of Cortical Microcircuits by Unitary GABA-Mediated

- Volume Transmission.” *Nature* 461(7268): 1278–81.
- Oleskevich, Sharon, John Clements, and Bruce Walmsley. 2000. “Release Probability Modulates Short-Term Plasticity at a Rat Giant Terminal.” *Journal of Physiology* 524(2): 513–23.
- Palmer, Lucy M. et al. 2012. “Interhemispheric Inhibition.” *Science* 335(February): 989–93.
- Palmer, Lucy M et al. 2014. “NMDA Spikes Enhance Action Potential Generation during Sensory Input.” *Nature Neuroscience* 17(3): 383–90. <http://dx.doi.org/10.1038/nn.3646>.
- Peferoen, Laura et al. 2014. “Oligodendrocyte-Microglia Cross-Talk in the Central Nervous System.” *Immunology* 141(3): 302–13.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23981039><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3930369>.
- Perez, Jean Baptiste et al. 2006. “Monitoring the Diffusion of Single Heterotrimeric G Proteins in Supported Cell-Membrane Sheets Reveals Their Partitioning into Microdomains.” *Journal of Molecular Biology* 363(5): 918–30.
- Polsky, Alon, Bartlett W Mel, and Jackie Schiller. 2004. “Computational Subunits in Thin Dendrites of Pyramidal Cells.” *Nature Neuroscience* 7(6): 621–27.
- Poorthuis, Rogier B. et al. 2018. “Rapid Neuromodulation of Layer 1 Interneurons in Human Neocortex.” *Cell Reports* 23(4): 951–58. [http://www.cell.com/cell-reports/fulltext/S2211-1247\(18\)30487-X#](http://www.cell.com/cell-reports/fulltext/S2211-1247(18)30487-X#).Wt_4AAusXAg.mendeley.
- Poorthuis, Rogier B, Leona Enke, and Johannes J Letzkus. 2014. “Cholinergic Circuit Modulation through Differential Recruitment of Neocortical Interneuron Types during Behaviour.” *Journal of Physiology* 592(19): 4155–64.
- Pouille, Frederic, and Massimo Scanziani. 2002. “Enforcement of Temporal Fidelity in Pyramidal Cells by Somatic Feed-Forward Inhibition.” *Science* 293(5532): 1159–63.
- Prineas, J. W., and J. S. Graham. 1981. “Multiple Sclerosis: Capping of Surface Immunoglobulin G on Macrophages Engaged in Myelin Breakdown.” *Annals of Neurology* 10(2): 149–58. <http://doi.wiley.com/10.1002/ana.410100205>.
- Rall, Wilfrid et al. 1967. “Dendritic Location of Synapses and Possible Mechanisms for the Monosynaptic EPSP in Motoneurons.” *Journal of Neurophysiology* 30(5): 1169–93.

- <http://www.physiology.org/doi/10.1152/jn.1967.30.5.1169>.
- Ransohoff, Richard M. 2012. "Animal Models of Multiple Sclerosis: The Good, the Bad and the Bottom Line." *Nature Neuroscience* 15(8): 1074–77.
<http://dx.doi.org/10.1038/nn.3168>.
- Reid, Christopher A., and John D. Clements. 1999. "Postsynaptic Expression of Long-Term Potentiation in the Rat Dentate Gyrus Demonstrated by Variance-Mean Analysis." *Journal of Physiology* 518(1): 121–30.
- Remington, Leah T., Alicia A. Babcock, Simone P. Zehntner, and Trevor Owens. 2007. "Microglial Recruitment, Activation, and Proliferation in Response to Primary Demyelination." *The American Journal of Pathology* 170(5): 1713–24.
<http://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2007.060783>.
- Robinson, Richard B., and Steven A. Siegelbaum. 2003. "Hyperpolarization-Activated Cation Currents: From Molecules to Physiological Function." *Annual Review of Physiology* 65(1): 453–80.
<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.physiol.65.092101.142734>.
- Rózsa, Márton et al. 2015. "Unitary GABAergic Volume Transmission from Individual Interneurons to Astrocytes in the Cerebral Cortex." *Brain Structure and Function* 222(1): 651–59.
- Rudy, Bernardo, Fishell Gordon, Lee SooHyun, and Jens Hjerling-Leffler. 2011. "Three Groups of Interneurons Account for Nearly 100% of Neocortical GABAergic Neurons." *Journal of Neuroscience* 31(1): 45–61.
- Safaiyan, Shima et al. 2016. "Age-Related Myelin Degradation Burdens the Clearance Function of Microglia during Aging." *Nature Neuroscience* 19(8): 995–98.
<http://www.nature.com/articles/nn.4325>.
- Sahara, Yoshinori, and Tomoyuki Takahashi. 2001. "Quantal Components of the Excitatory Postsynaptic." *Journal of physiology* (2001): 189–97.
- Sargent, P. B. 2005. "Rapid Vesicular Release, Quantal Variability, and Spillover Contribute to the Precision and Reliability of Transmission at a Glomerular Synapse." *Journal of Neuroscience* 25(36): 8173–87.
- Saviane, Chiara, and R. Angus Silver. 2006. "Fast Vesicle Reloading and a Large Pool

- Sustain High Bandwidth Transmission at a Central Synapse.” *Nature* 439(7079): 983–87.
- Sawcer, Stephen et al. 2011. “Genetic Risk and a Primary Role for Cell-Mediated Immune Mechanisms in Multiple Sclerosis.” *Nature* 476(7359): 214–19.
<http://www.nature.com/articles/nature10251>.
- Scanziani, Massimo. 2000. “GABA Spillover Activates Postsynaptic GABA(B) Receptors to Control Rhythmic Hippocampal Activity.” *Neuron* 25(3): 673–81.
- Schiller, Jackie et al. 1997. “Calcium Action Potentials Restricted to Distal Apical Dendrites of Rat Neocortical Pyramidal Neurons.” : 605–16.
- Schuman, Benjamin et al. 2018. “Four Unique Interneuron Populations Reside in Neocortical Layer 1.” *The Journal of Neuroscience* 39(1): 125–39.
- Sheets, Patrick L. et al. 2011. “Corticospinal-Specific HCN Expression in Mouse Motor Cortex: Ih -Dependent Synaptic Integration as a Candidate Microcircuit Mechanism Involved in Motor Control.” *Journal of Neurophysiology* 106(5): 2216–31.
- Silver, R. Angus, Akiko Momiyama, and Stuart G. Cull-Candy. 1998. “Locus of Frequency-Dependent Depression Identified with Multiple-Probability Fluctuation Analysis at Rat Climbing Fibre - Purkinje Cell Synapses.” *Journal of Physiology* 510(3): 881–902.
- Silvestroff, Lucas, Sandra Bartucci, Juana Pasquini, and Paula Franco. 2012. “Cuprizone-Induced Demyelination in the Rat Cerebral Cortex and Thyroid Hormone Effects on Cortical Remyelination.” *Experimental Neurology* 235(1): 357–67.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.02.018>.
- Simon, Anna et al. 2005. “Gap-Junctional Coupling between Neurogliaform Cells and Various Interneuron Types in the Neocortex.” *Journal of Neuroscience* 25(27): 6278–85.
- Skipuletz, Thomas et al. 2008. “Cortical Demyelination Is Prominent in the Murine Cuprizone Model and Is Strain-Dependent.” *American Journal of Pathology* 172(4): 1053–61. <http://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2008.070850>.
- . 2013. “Astrocytes Regulate Myelin Clearance through Recruitment of Microglia during Cuprizone-Induced Demyelination.” *Brain* 136(1): 147–67.
<https://academic.oup.com/brain/article-lookup/doi/10.1093/brain/aws262>.

- Smith, Marion E. 1999. "Phagocytosis of Myelin in Demyelinative Disease: A Review." *Neurochemical Research* 24(2): 261–68.
- Sodickson, Deborah L, and Bruce P Bean. 1996. "GABAB Receptor-Activated Inwardly Rectifying Potassium Current in Dissociated Hippocampal CA3 Neurons." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16(20): 6374–85. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8815916>.
- Sola, Elisabetta et al. 2004. "Increased Neurotransmitter Release during Long-Term Potentiation at Mossy Fibre-Granule Cell Synapses in Rat Cerebellum." *Journal of Physiology* 557(3): 843–61.
- Sommer, I, and M Schachner. 1981. "Monoclonal Antibodies (O1 to O4) to Oligodendrocyte Cell Surfaces: An Immunocytological Study in the Central Nervous System." *Developmental Biology* 83(2): 311–27. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0012160681904772>.
- Somogyi, Peter, Gábor Tamás, Rafael Lujan, and Eberhard H. Buhl. 1998. "Salient Features of Synaptic Organisation in the Cerebral Cortex." *Brain Research Reviews* 26(2–3): 113–35.
- Stadelmann, Christine, Christiane Wegner, and Wolfgang Brück. 2011. "Inflammation, Demyelination, and Degeneration — Recent Insights from MS Pathology." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1812(2): 275–82. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.07.007>.
- Staley, Kevin J., and William R. Proctor. 1999. "Modulation of Mammalian Dendritic GABA A Receptor Function by the Kinetics of Cl[−] and HCO₃[−] Transport." *The Journal of Physiology* 519(3): 693–712. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1469-7793.1999.0693n.x>.
- Stark, Eran et al. 2014. "Pyramidal Cell-Interneuron Interactions Underlie Hippocampal Ripple Oscillations." *Neuron* 83(2): 467–80.
- Stefanelli, Thomas et al. 2016. "Hippocampal Somatostatin Interneurons Control the Size of Neuronal Memory Ensembles." *Neuron* 89(5): 1074–85.
- Stuart, G. J., H. U. Dodt, and B. Sakmann. 1993. "Patch-Clamp Recordings from the Soma and Dendrites of Neurons in Brain Slices Using Infrared Video Microscopy." *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 423(5–6): 511–18.

- Stys, Peter K., Gerald W. Zamponi, Jan van Minnen, and Jeroen J. G. Geurts. 2012. "Erratum: Will the Real Multiple Sclerosis Please Stand Up?" *Nature Reviews Neuroscience* 13(8): 597–597. <http://www.nature.com/articles/nrn3300>.
- Sun, Qian, Kalyan V Srinivas, Alaba Sotayo, and Steven A Siegelbaum. 2014. "Dendritic Na⁺ Spikes Enable Cortical Input to Drive Action Potential Output from Hippocampal CA2 Pyramidal Neurons." *eLife* 3(November): 1–24.
- Sun, Xin et al. 2010. "Myelin Activates FAK/Akt/NF-KB Pathways and Provokes CR3-Dependent Inflammatory Response in Murine System" ed. Fabrizio Gelain. *PLoS ONE* 5(2): e9380. <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0009380>.
- Sykova, E., and C. Nicholson. 2008. "Diffusion in Brain Extracellular Space." *Physiological Reviews* 88(4): 1277–1340.
<http://physrev.physiology.org/cgi/doi/10.1152/physrev.00027.2007>.
- Szabadics, J., G. Tamas, and I. Soltesz. 2007. "Different Transmitter Transients Underlie Presynaptic Cell Type Specificity of GABAA,Slow and GABAA,Fast." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(37): 14831–36.
<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0707204104>.
- Tamas, G, E H Buhl, A Lorincz, and P Somogyi. 2000. "Co-Targeted Gap Junctions and GABAergic Synapses Synchronise Cortical Interneurons." *Magyar Idegtudományi Társaság 6. Kongresszusa* CD(4): 1–6.
- Tamás, Gábor, Andrea Lörincz, Anna Simon, and János Szabadics. 2003. "Identified Sources and Targets of Slow Inhibition in the Neocortex." *Science* 299(5614): 1902–5.
- Tamás, Gábor, János Szabadics, and Peter Somogyi. 2002. 22 *The Journal of Neuroscience* *Cell Type-and Subcellular Position-Dependent Summation of Unitary Postsynaptic Potentials in Neocortical Neurons*.
- Tanaka, Tatsuhide, Koichi Murakami, Yoshio Bando, and Shigetaka Yoshida. 2013. "Minocycline Reduces Remyelination by Suppressing Ciliary Neurotrophic Factor Expression after Cuprizone-Induced Demyelination." *Journal of Neurochemistry* 127(2): 259–70.
- Tang, Yong, Jens R. Nyengaard, Didima M.G. De Groot, and Hans Jørgen G. Gundersen. 2001. "Total Regional and Global Number of Synapses in the Human Brain Neocortex."

Synapse 41(3): 258–73.

- Tao, A., L. Tao, and C. Nicholson. 2005. “Cell Cavities Increase Tortuosity in Brain Extracellular Space.” *Journal of Theoretical Biology* 234(4): 525–36.
- Tasic, Bosiljka et al. 2016. “Adult Mouse Cortical Cell Taxonomy Revealed by Single Cell Transcriptomics.” *Nature Neuroscience* 19(2): 335–46.
- Thomson, A. M., and A. Destexhe. 1999. “Dual Intracellular Recordings and Computational Models of Slow Inhibitory Postsynaptic Potentials in Rat Neocortical and Hippocampal Slices.” *Neuroscience* 92(4): 1193–1215.
- Thomson, Alex M., David C. West, Joel Hahn, and Jim Deuchars. 1996. “Single Axon IPSPs Elicited in Pyramidal Cells by Three Classes of Interneurons in Slices of Rat Neocortex.” *Journal of Physiology* 496(1): 81–102.
- Thunell, Robert C., Sharon M. Locke, and Douglas F. Williams. 1988. “A Physiological Role for GABAB Receptors in the Central Nervous System.” *Nature* 334: 601–4.
- Towers, Stephen K, and Shaul Hestrin. 2008. “D1-Like Dopamine Receptor Activation Modulates GABAergic Inhibition But Not Electrical Coupling between Neocortical Fast-Spiking Interneurons.” *Journal of Neuroscience* 28(10): 2633–41.
- Traka, Maria et al. 2016. “Oligodendrocyte Death Results in Immune-Mediated CNS Demyelination.” *Nature Neuroscience* 19(1): 65–74.
<http://www.nature.com/articles/nn.4193>.
- Trapp, Bruce D., and Klaus-Armin Nave. 2008. “Multiple Sclerosis: An Immune or Neurodegenerative Disorder?” *Annual Review of Neuroscience* 31(1): 247–69.
- Turner, Dennis A., and Mike West. 1993. “Bayesian Analysis of Mixtures Applied to Post-Synaptic Potential Fluctuations.” *Journal of Neuroscience Methods* 47(1–2): 1–21.
- Uematsu, Masakazu et al. 2008. “Quantitative Chemical Composition of Cortical GABAergic Neurons Revealed in Transgenic Venus-Expressing Rats.” *Cerebral Cortex* 18(2): 315–30.
- Uylings, Harry B.M., and Ivana Delalle. 1997. “Morphology of Neuropeptide Y-Immunoreactive Neurons and Fibers in Human Prefrontal Cortex during Prenatal and Postnatal Development.” *Journal of Comparative Neurology* 379(4): 523–40.

- Velimirovic, Bratislav M., Eric A. Gordon, Betsy Navarro Nancy F Lim, and David E. Clapham. 1996. "The K⁺channel Inward Rectifier Subunits Form a Channel Similar to Neuronal G Protein-Gated K⁺channel." *FEBS Letters* 379(1): 31–37.
- Vigot, Réjan et al. 2006. "Differential Compartmentalization and Distinct Functions of GABA B Receptor Variants." *Neuron* 50(4): 589–601.
- Vogel, Daphne YS et al. 2013. "Macrophages in Inflammatory Multiple Sclerosis Lesions Have an Intermediate Activation Status." *Journal of Neuroinflammation* 10(1): 809. <http://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/1742-2094-10-35>.
- Wang, Weiwei et al. 2016. "Cooperative Regulation by G Proteins and Na⁺ of Neuronal GIRK2 K⁺ Channels." *eLife* 5.
- Wang, Xi et al. 2015. "Macrophages in Spinal Cord Injury: Phenotypic and Functional Change from Exposure to Myelin Debris." *Glia* 63(4): 635–51. <http://doi.wiley.com/10.1002/glia.22774>.
- Wei, Weizheng et al. 2003. "Perisynaptic Localization of α Subunit-Containing GABAA Receptors and Their Activation by GABA Spillover in the Mouse Dentate Gyrus." 23(33): 1–12. [papers2://publication/uuid/86399A39-D5CB-4D52-BFF7-B138656973BE](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12863999/).
- Werner, Lisa et al. 1989. "A Golgi Deimpregnation Study of Neurons in the Rhesus Monkey Visual Cortex (Areas 17 and 18)." *Anatomy and Embryology* 180(6): 583–97.
- Wilfrid Rall. 1967. "Distinguishing Theoretical Synaptic Potentials Computed for Different Soma-Dendritic Distributions of Synaptic." *J. Neurophysiol.*
- Wozny, Christian, and Stephen R. Williams. 2011. "Specificity of Synaptic Connectivity between Layer 1 Inhibitory Interneurons and Layer 2/3 Pyramidal Neurons in the Rat Neocortex." *Cerebral Cortex* 21(8): 1818–26.
- Xie, Lulu et al. 2013. "Sleep Drives Metabolite Clearance from the Adult Brain." *Science* 342(6156): 373–77.
- Yakubovich, Daniel et al. 2015. "A Quantitative Model of the GIRK1/2 Channel Reveals That Its Basal and Evoked Activities Are Controlled by Unequal Stoichiometry of G α and G $\beta\gamma$." *PLoS Computational Biology* 11(11): 1–38.
- Yao, Xing Hua et al. 2016. "Electrical Coupling Regulates Layer 1 Interneuron Microcircuit

Formation in the Neocortex.” *Nature Communications* 7: 1–15.
<http://dx.doi.org/10.1038/ncomms12229>.