

# **Retroaxonális akciós potenciálok vizsgálata az ember és a rágcsáló agykéregben**

Doktori értekezés tézisei

**Tóth Martin**

Témavezetők:

Dr. Tamás Gábor, Ph.D., D.Sc.  
egyetemi tanár

Dr. Molnár Gábor, Ph.D.  
tudományos főmunkatárs

Biológia Doktori Iskola  
Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék  
Természettudományi és Informatikai Kar  
Szegedi Tudományegyetem



2024

Szeged

## Bevezetés

Az agykéreg a központi idegrendszer része, amely a magasabb idegi funkciókért felelős agyterület. Az agykutatás egyik fő kérdésköre az agykéreg funkcionális működése. A gátló interneuronok az agykérgi neuronok kisebb hányadát képezik, azonban rendkívül változatos morfológiai, elektrofiziológiai és funkcionális jellemzőkkel rendelkeznek. Az idegsejtek két anatómiailag jól elkülöníthető résszel rendelkeznek: szomato-dendritikus, valamint az axonális régióval, melyek különböző funkciókat látnak el. A szomato-dendritikus rész a többi idegsejttől kémiai és elektromos szinapsziszokon keresztül információt kap, depolarizálódik, majd a különböző dendrit nyúlványok membránpotenciál változása a sejttesten összegződik. Az összegződés folytán az axon iniciális szegmentum depolarizációjának hatására kialakul az akciós potenciál, mely az axonon mindkét irányba képes terjedni. Az utóbbi évtizedben hippocampális és agykérgi GABAerg interneuronokban figyeltek meg megbízhatóan kialakítható retroaxonális tüzelést (RAT), amely során az idegsejtek nagy frekvenciás akciós potenciál sorozatot adtak le a szomato-dendritikus régió depolarizációja nélkül. A retroaxonális tüzelés közben kialakult akciós potenciálok az axon disztálisabb részeiről érkeznek, anti-dromikus, retro-axonális irányba terjednek (RA-AP) a szoma irányába, ellentétben az axon iniciális szegmentumon inicializálódott akciós potenciáloktól (AIS-AP). Kutatómunkám során a retroaxonális akciós potenciálok megjelenésének formáit, mechanizmusát vizsgáltam az elsőrégi GABAerg interneuronokon az ember és a rágcsálók agykérgében.

## Célkitűzések

Jelenleg kevés információ áll rendelkezésre a retroaxonális akciós potenciálok kialakulási mechanizmusáról és előfordulásukról az agykérgi neuronhálózatokban, ezért kísérleteinkkel a következő kérdésekre kerestük a választ:

- A retroaxonális tüzelés egy evolúciósan konzervált jelenség és megjelenik több emlős fajban is?
- Milyen mintázatban jelenhet meg a retroaxonális tüzelés?

- Milyen külső és sejt-intrinzik tulajdonságok befolyásolják a retroaxonális tüzelés kialakulását?
- Előfordulnak-e retroaxonális akciós potenciálok in vivo?
- Milyen hálózati állapot során alakulhatnak ki retroaxonális akciós potenciálok?

## Módszerek

### Túlélő agyszelet preparáció

Kísérleteinket a Helsinki Nyilatkozat értelmében és a Szegedi Tudományegyetem Etikai Bizottságának engedélyével végeztük el. Aneurizma, shunt és agytumor kezeléséhez elengedhetetlen, idegsebészeti úton eltávolított agykérgi szövetblokkokat használtunk fel a betegek beleegyezésével (n =41 kaukázusi nagyrosszba tartozó nő és n =30 kaukázusi nagyrosszba tartozó férfi, életkor:  $50 \pm 20$  év). Kísérleteink egy másik részéhez fiatal (18-44,  $22 \pm 5$  napos) Wistar patkányok neokortikális agyszeleteit használtuk. Az agykérgi mintákat hűtött ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) mesterséges cerebrospinalis folyadékban (MCSF) preparáltuk. Az MCSF összetétele mM-ban kifejezve: 130 NaCl; 3,5 KCl; 1  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 24  $\text{NaHCO}_3$ ; 0,5  $\text{CaCl}_2$ ; 4  $\text{MgSO}_4$ ; 10 D(+) glükóz. A preparációt követően 350-400  $\mu\text{m}$  vastag koronális metszeteket készítettünk Microm HM650 V mikrotómmal. A túlélő agyszelet preparációkat  $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on fél óráig inkubáltuk a preparációhoz is használt oxigenált MCSF-ben, majd fél óráig  $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on csökkentett  $\text{CaCl}_2$ -ot tartalmazó folyadékban tartottuk melynek összetétele: 130 NaCl, 3,5 KCl, 1  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 24  $\text{NaHCO}_3$ , 1  $\text{CaCl}_2$ , 3  $\text{MgSO}_4$ , 10 D(+)-glükóz. Az inkubációt követően az előző oldatban  $17\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tartottuk a felhasználásig.

### In vitro elektrofiziológiai

Kísérleteinkben szomatikus whole-cell patch-clamp technikával végeztünk elvezetéseket  $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on hagyományos alámerített és kettős átfolyású in vitro elvezető kamrában. Infravörös DIC (differenciál interferencia kontraszt) videomikroszkópia segítségével vizualizáltuk az elsőrétégi interneuronokat az agyszelet felszínétől 60-130  $\mu\text{m}$  mélyen (Olympus BX61WI mikroszkóp, Olympus XLUMPlanFI objektív, Hamamatsu CCD kamera, Luigs és Neumann manipulátor rendszer). A whole-cell

patch-clamp kísérleteknél intracelluláris oldattal (pH 7,5; 300 mOsm: 126 mM K-glükonát, 4 mM KCl, 4 mM ATP-Mg, 0,3 mM GTP-Na<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 10 mM keratin-foszfát, a sejtek jelöléséhez 8 mM biocytin (N-biotinilált lizin)) töltöttük fel a mikropipettákat (3-5 MΩ). Az extracelluláris elvezetésekénél kalcium-mentes MCSF-kal töltöttük fel a mikropipettákat (1-2 MΩ). Az elektrofiziológiai elvezetésekét HEKA EPC 10 erősítővel végeztük, 10 kHz-en (Bessel szűrő) szűrtük és 50 kHz-el digitalizáltuk Patchmaster szoftverrel (HEKA Elektronik GmbH, Lambrecht).

## **Post hoc morfológiai sejtípus meghatározás**

A whole-cell patch-clamp elektrofiziológiai méréseinknél a mikropipettkébe töltött intracelluláris folyadékot biocytin-nel egészítettük ki, amely lehetővé teszi a sejtek jelölését és előhívását DAB reakcióval. Az előhívás után a sikeresen feltöltött, azonosítható elsőregegi interneuronokat hagyományos fénymikroszkóp segítségével vizualizáltuk, majd a sejteket három különböző morfológiai csoportba soroltuk: neurogliaform, nem neurogliaform, valamint csipkebogyó sejtek. A neurogliaform sejtekre jellemző a relatívan kisméretű, kerek szóma, a sűrű és lokális axonarborizáció, valamint a nagyszámban megtalálható preszinaptikus boutonok. Ezzel ellentétben a nem neurogliaform típusú elsőregegi interneuronok nagyobb számával és ritkább axon arborizációval rendelkeznek, valamint axon-nyúlványukat gyakran az elsőreget elhagyva mélyebb rétegekbe is projektálják. A csipkebogyó sejteket az axonon nagyszámban megtalálható csipkebogyó szerű bouton-ok, valamint a kompakt, bokor szerű axon-arborizáció szerint azonosítottuk.

## **In vivo elektrofiziológia**

Kísérleteinket a Helsinki Nyilatkozat értelmében és a Szegedi Tudományegyetem Etikai Bizottságának engedélyével végeztük el. In vivo méréseinkhez felnőtt nőstény és hím egereket használtunk (GAD67-GFP line G42 n=37, Ai9 n=5, C56/B6J n=3, vGAT-AI9 n=75). Az állatokat izofluránnal (2,5% altatásra, 1,5% az alvás fenntartására a műtét alatt) altattuk el, majd egy saját készítésű fejbefogó fémkeretet rögzítettünk a koponyára. Egy hét beszkotatás után az állatokat izofluránnal vagy ketamin-xylazinnal (0,1 mg ketamin és 0,008 mg xylazin, vagy 0,4 mg klorálhidrát g/testtömeg) elegyével

altattuk majd egy 2-3 mm átmérőjű kraniotómiát készítettünk. A durótómia elkészítése után a kraniotómiát feltöltöttük 1.5%-os agarózzal és egy fedőlemezt rögzítettünk, amely mérsékli az agy mozgását, valamit hozzáférést biztosít az intra- és extracelluláris elektródák bejuttatásához. A műtét után az indukált alvás közbeni elvezetésekhez az állatokat áthelyeztük a mérőhelyre. Az éber állapotban történt elvezetéseknel legalább 1-2 órával a műtét után kezdtük csak el az elvezetéseket. Az extracelluláris elektródákat (1-3 M $\Omega$ ) CaCl<sub>2</sub> mentes MCSF-fel töltöttük fel és mélyebb agykérgi rétegekbe juttattuk le. A whole-cell elvezetéshez használt mikropipettákat (3-5 M $\Omega$ ) az in vitro kísérleteknél is használt intracelluláris oldattal és fluoreszcens festékkel töltöttük fel. Az agykéreg első rétegében alakítottuk ki a whole-cell konfigurációt 20-120  $\mu$ m mélyen az agyfelszíntől. A sejtek vizualizálásához két-foton mikroszkópot használtunk (Femtonics galvo-galvo két-foton rendszer, Olympus BX61 WI upright mikroszkóp, Mai Tai DeepSee [Spectra-Physics, Santa Clara, CA] femtoszekundomos Ti:zafír lézer, 800-850 nm hullámhossz). Az elektrofiziológiai elvezetéseket HEKA EPC 10 erősítőkkel végeztük, 10 kHz-en (Bessel szűrő) szűrtük és 50 kHz-el digitalizáltuk Patchmaster szoftverrel (HEKA Elektronik GmbH, Lambrecht).

## **Adatelemzés**

Az elektrofiziológiai adatok analízisét Fitmaster (HEKA Elektronik GmbH, Lambrecht), Origin 9 (OriginLab) és MATLAB (The Math Works, Inc.) szoftver segítségével végeztük el.

## **Eredmények**

### **Retroaxonális tüzelési mintázatok az ember agykéregben**

Első kísérleteink során a szakirodalomban már ismertetett tónikus retroaxonális tüzelést vizsgáltuk az ember agykéregében. Az idegsebészeti úton eltávolított agykérgi szövetblokkokból túlélő agyszövet preparátumokat készítettünk, majd ezt követően szomatikus whole-cell patch-clamp konfigurációt alakítottunk ki elsőregegi interneuronokon. A stimulációs protokollunk során küszöbfeletti depolarizáló áramlépcsőket injektáltunk, aminek eredményeként az idegsejteken akciós potenciálok jelentek meg. A stimulációt a RAT megjelenéséig ismételtük. Ezt követően a

szomatikus stimuláció közvetlen hatására megjelenő és a stimuláció befejezése után kialakult akciós potenciálok tulajdonságait vizsgáltuk meg. A szomatikus stimuláció hatására, az axon iniciális szegmentumon kialakult akciós potenciálok elkülöníthetők a RAT alatt kialakuló, az axon távolabbi szakaszából a szómába visszaterjedő retroaxonális akciós potenciáloktól. Negatívabb küszöbpotenciál, kisebb küszöbalatti depolarizációs ráta és kétkomponensű fázisgörbe jellemző a RA-AP-okra. 385 elvezetett elsőrégi interneuronból 87-nél sikeresen ki tudtuk alakítani a RAT-t az ember agykéregében, amely összhangban van a szakirodalmi eredményekkel. Azonban az eddig ismert tónikus RAT-tól különböző, további két új tüzelési mintázatot is azonosítottunk. A tüzelési frekvencia alapján három különböző csoportot határoztunk meg: sporadikus, tónikus és a ritmikus RAT-t.

## **Ritmikus retroaxonális tüzelés a rágcsáló agykéregben**

A következő kísérleteinkben megvizsgáltuk, hogy a ritmikus RAT kialakítható-e a rágcsáló agykéregben, vagy egy fajspecifikus jelenség, ami kizárólag az emberre jellemző. Túlélő agyszelet preparációkat készítettünk fiatal Wistar patkányok szomatoszenzoros agykéregéből, majd szomatikus whole-cell patch-clamp konfigurációt alakítottunk ki elsőrégi interneuronokon. A humán agyszelet kísérleteinknél is használt stimulációs protokollt, valamint a RA-AP és az AIS-AP elkülönítésére használt módszereket alkalmaztuk a rágcsáló kísérletek esetében is. Az elsőrégi interneuronok körülbelül 40 százalékánál ki tudtuk alakítani a sporadikus, a tónikus és a ritmikus RAT-t a rágcsáló agykéregben. A humán kísérletekhez hasonlóan a ritmikus RAT alacsonyabb tüzelési frekvenciát mutatott a tónikushoz képest, valamint a RA-AP sorozatok szintén csoportokba rendeződve, periodikusan jelentek meg. Továbbá, a ritmikus bimodális membránpotenciál váltakozás nem éri el az AIS-AP ok küszöbét, kizárólag RA-AP-ok jelennek meg. Kísérleteink alapján a retroaxonális tüzelés egy evolúciósan konzervált jelenség, mivel előfordul emberben és patkányban is.

## **Retroaxonális tüzelést mutató elsőrégei interneuronok morfológiai osztályozása**

Az eddigi tanulmányok alapján a RAT több agyterületre és sejtípusra is jellemző. Annak érdekében, hogy meghatározzuk a RAT sejtípus-specifikusságát, post-hoc anatómiai módszereket alkalmaztunk és a biocitinnel feltöltött interneuronokat az axonális és dendritikus morfológiájuk alapján osztályoztuk. Három különböző csoportot határoztunk meg a humán elsőrégei interneuronok esetében: NGF (neurogliaform), nem-NGF és a csipkebogyó sejtek. A RAT előfordul a NGF és a nem-NGF sejtekben is, azonban a csipkebogyó interneuronokban nem volt megfigyelhető. A RAT mindhárom mintázata megjelenik a NGF és a nem-NGF sejteknél is, azonban gyakoribb a NGF morfológiát mutató sejtekben. A patkány elsőrégei interneuronok esetében két csoportot határoztunk meg: NGF és nem-NGF sejtek. A humán mintákhoz hasonlóan a RAT megjelent mindkét csoportban, azonban jellemzőbb volt a neurogliaform sejtekre.

## **Sejt-autonóm ritmikus retroaxonális tüzelés**

Következő kísérleteinkben a ritmikus RAT mechanizmusát vizsgáltuk meg. Elsőként arra voltunk kíváncsiak, hogy a ritmikus RAT egy hálózati vagy egy sejt-autonóm jelenség. Az előző kísérleteknél is használt stimulációs protokollt és akciós potenciál csoportosítást alkalmaztuk. GABA és glutamát receptor-blokkolókat használtunk annak tesztelésére, hogy a ritmikus RAT egy hálózat függő jelenség-e. AMPA-, NMDA-, GABA<sub>A</sub>- és GABA<sub>B</sub>- receptor-antagonistákat alkalmaztunk, azonban ezek jelenlétében is sikeresen kitudtuk alakítani a RAT-t, továbbá nem voltak hatással a RAT időtartamára sem. Eredményeink egyeznek a szakirodalomban ismertetett adatokkal, miszerint a szinaptikus transzmisszió és a vezikulák felszabadulása sem szükséges a RAT megjelenéséhez.

Ritmusgeneráló, úgynevezett pacemaker sejteket számos agyterületen azonosítottak, amelyek sejt-autonóm membránpotenciál oszcillációt képesek kialakítani a hálózat működésétől függetlenül. Ezeknél az idegsejteknél a szomatikus membránpotenciáltól függ az intrinzik oszcilláció frekvenciája, ezért következő

kísérleteinkben megvizsgáltuk a RAT szomatikus membránpotenciál függését. A RAT kialakítása után hosszantartó konstans áramokkal különböző hiperpolarizáltabb és depolarizáltabb értékeken tartottuk a sejtek szomatikus membránpotenciálját a humán és a rágsáló kísérleteink esetében is. Hasonlóan a ritmusgeneráló sejteknél leírtakhoz a RAT frekvenciája és mintázata is modulálható: a hiperpolarizáltabb membránpotenciál csökkenti, a depolarizáltabb pedig növeli a retroaxonális tüzelési frekvenciát.

## **HCN-csatornák és az extracelluláris kálium ionok szerepe a retroaxonális tüzelés kialakulásában**

Előző kísérleteink és a szakirodalmi adatok alapján a retroaxonális tüzelés nem egy hálózati, hanem sokkal inkább egy sejt-autonóm jelenség, így számos ioncsatorna hozzájárulhat a retroaxonális akciós potenciálok kialakulásához. A hiperpolarizáció-aktivált ciklikus-nukleotid által kapuzott (HCN) csatornák fontos szerepet játszanak a nyugalmi membránpotenciál kialakításában, az akciós potenciálok inicializálásában és propagációjában. Ebből adódóan arra voltunk kíváncsiak, hogy a HCN-csatornák hogyan járulhatnak hozzá a RA-AP-ok kialakulásához. Az előző kísérleteinkhez hasonlóan whole-cell patch-clamp konfigurációt alakítottunk ki elsőrégi interneuronokon humán és rágsáló agykéregben. A sikeres RAT indukció után HCN-csatornablokkolót alkalmaztunk. A HCN-csatornablokkoló hatására az elvezetett interneuronok nyugalmi membránpotenciálja hiperpolarizáltabb értéket vett fel, lecsökkent a sag arány, valamint megnőtt a bemenő ellenállás. Ezen felül a HCN-csatornablokkoló hatással volt a RAT-re is: lecsökkent a RAT időtartama és a megjelenő RA-AP-ok száma a humán és a patkány kísérleteink esetében is. Kísérleteink igazolták feltételezésünket, hiszen a HCN-csatornák aktívan részt vesznek a RAT kialakításában, valamint befolyásolhatják az axon serkenthetőségét és ezáltal a RA-AP-ok inicializálódását.

A RAT-t hosszantartó ismételt küszöbfeletti depolarizáló stimulációval lehet kialakítani, azonban a kialakulás mechanizmusa nem teljesen tisztázott. Hipotézisünk szerint az extracelluláris térben a lokális kálium-ion koncentráció változásával megváltozhat az axon serkenthetősége, depolarizálódhat az axon és ez a RA-AP-ok



megjelenéséhez vezethet. Ennek tesztelésére whole-cell konfigurációt alakítottunk ki elsőrégegi interneuronokon, majd egy másik mikropipettába megnövelt kálium ion koncentrációt tartalmazó (5 mM [KCL]) elvezető oldatot töltöttünk és a sejtek közelében pozitív nyomással az extracelluláris térbe juttattuk. Ennek hatására az ember és a patkány agykéregben is sporadikusan előforduló RA-AP-okat figyeltünk meg, melyek kinetikai paraméterei megegyeznek a stimulációs protokoll utáni RAT közben megjelenő AP-okkal. Kísérletsorozatunk alapján az elsőrégegi interneuronokon megjelenő RAT-hez hozzájárulnak a sejt intrinzik tulajdonságai, különösképp az axonális HCN-csatornák, továbbá az extracelluláris térben megnövekedett kálium ion koncentráció előidézhetheti az RA-AP-ok inicializálódását.

## **Spontán retroaxonális akciós potenciálok in vitro**

Előző kísérleteink rámutattak arra, hogy az extracelluláris kálium ion koncentráció megnövelése RA-AP-ok megjelenéséhez vezethet. Annak ismeretében, hogy a neurális aktivitás és az oszcillációk dinamikusan megváltoztatják az extracelluláris tér ionösszetételét, feltételeztük, hogy aktív agyseletekben ez retroaxonális akciós potenciálokat alakíthat ki a fentebb ismertett stimulációs protokoll nélkül. Kettős-átfolyású kamra használatával, csökkentett kalcium és magnézium koncentrációt tartalmazó in vivo-szerű elvezető oldat, valamint kolinerg agonista és dopaminerg antagonistá használatával sikeresen megnöveltük a hálózati aktivitást a humán és a patkány agyselet preparációkban. Elsőként whole-cell konfigurációt alakítottunk ki az első régegi interneuronokon, majd stimuláció nélkül nyomon követtük az idegsejtek membránpotenciálját. A megnövekedett hálózati aktivitás eredményeként membránpotenciál-oszcillációt, celluláris UP és DOWN-állapotokat, valamint akciós potenciálokat figyeltünk meg az elvezetett interneuronokon. Eddigi ismereteink szerint az aktív hálózati állapot során a szomato-dendritikus régióra érkező serkentő bemenetek depolarizálják az idegsejteket, amelyeken akciós potenciálok alakulhatnak ki, ezért az akciós potenciálok megjelenése a depolarizált membránpotenciál értékeken várható. Azonban kísérleteinkben akciós potenciálokat figyeltünk meg a hiperpolarizált állapot során is, amikor az idegsejt nyugalmi membránpotenciál értéket vesz fel. Ezért az előzőekben is használt paraméterek, a küszöbpotenciál és depolarizációs ráta alapján

csoportosítottuk az akciós potenciálokat. A hiperpolarizált állapot során megfigyelt akciós potenciálok retroaxonális akciós potenciálokra jellemző kinetikával rendelkeztek.

A következő kísérleteinkben az elsőrégi interneuronok aktivitását vizsgáltuk lassú-hullámú oszcilláció alatt túlélő patkány agyszelet preparátumokban. Az első rétegben kialakított whole-cell elvezetést kiegészítve az ötödik rétegbe LFP (lokális mezőpotenciál) elektródát helyeztünk el, annak érdekében, hogy a hálózati aktivitást is nyomon követhessük. Az LFP elvezetésen alacsony frekvenciájú negatív irányú hullámokat figyeltünk meg. Ezek az LFP események jelentették számunkra a lassú oszcilláció sikeres indukálását, tehát az aktív hálózati állapotokat (UP-állapot). A humán kísérleteinkhez hasonlóan spontán AP-ok jelentek meg a sejtek nyugalmi membránpotenciáljáról, amelyek RA-AP-ra jellemző kinetikával rendelkeztek. A következőkben megvizsgáltuk az akciós potenciálok fáziskapcsoltságát a hálózati oszcillációhoz. Az LFP elvezetést 0,5-4 Hz-es tartományra szűrtük, Hilbert transzformációval fázisokra osztottuk, majd minden akciós potenciál időzítését meghatároztuk. Az AIS-AP-ok fáziskapcsoltak a lassú oszcillációhoz, az LFP negatív csúcsokhoz időben közel alakultak ki, tehát a hálózati UP állapotok alatt. Ezzel ellentétben a RA-AP-ok nem mutattak fáziskapcsoltságot, tehát az oszcilláció bármely fázisában előfordulhatnak. Kísérleteink alapján elmondható, hogy a humán és a patkány elsőrégi interneuronok körülbelül 20 százalékánál spontán RA-AP-okat figyelhetünk meg, amelyek inicializálódása független a szomato-dendritikus régióra érkező serkentő bemenetektől.

## **Retroaxonális akciós potenciálok in vivo**

In vitro kísérleteink bemutatták, hogy a RA-AP-ok spontán megjelenhetnek stimuláció nélkül, fiziológias környezetben a humán és patkány elsőrégi interneuronokon. Azonban ismerve az in vitro agyszeletekben végzett kísérletek korlátait, megvizsgáltuk, hogy a spontán RA-AP-ok megjelennek-e normál, fiziológias környezetben is in vivo körülmények között. Whole-cell konfigurációt alakítottunk ki az első rétegben, valamint egyidejűleg LFP-t regisztráltunk az ötödik rétegben éber, altatott, valamint természetes alvásban lévő egerekben in vivo. Az elvezetett

interneuronokra az LFP-n megjelenő UP állapotokkal egyidejűleg serkentő bemenetek érkeznek, amik időnként megfelelő mértékű membránpotenciál depolarizációt okoznak, ezáltal elősegítik az AIS-AP-ok kialakulását. Az in vitro méréseinkhez hasonlóan az elvezett elsőrétegi interneuronok körülbelül 25 százalékánál spontán RA-AP-okat is megfigyeltünk, melyek hiperpolarizált membránpotenciál értéken jelentek meg. A továbbiakban megvizsgáltuk az akciós potenciálok időzítését a hálózati oszcillációhoz képest, hasonlóan az in vitro agyszelet kísérleteinkhez. Az elsőrétegi interneuronokon az AIS-AP-ok fázispreferenciát mutattak és a hálózati UP állapotok során jelentek meg. Ezzel ellentétben a RA-AP-ok a hálózati aktivitástól függetlenül, az oszcilláció bármely fázisában előfordultak. In vivo kísérleteink bemutatták, hogy a retroaxonális akciós potenciálok megjelennek az indukciós protokoll nélkül, fiziológias környezetben is. Továbbá igazolják, hogy egyes elsőrétegi interneuronok egyszerre képesek a hálózattól függő, jól időzített AIS-AP-ok leadására, valamint a hálózati aktivitástól független, spontán RA-AP-ok leadására.

## **Eredmények megbeszélése**

Kísérleteink során egy az elmúlt évtizedben felfedezett jelenséget, a retroaxonális tüzelést vizsgáltuk elsőrétegi interneuronokon a rágsáló és az ember agykérgében. A szakirodalmi eredményekhez hasonlóan szomatikus stimulációval sikeresen ki tudtuk alakítani a hosszantartó tónikus RAT-t az ember és a rágsálók agykérgében. Azonban az eddig megfigyelt tónikus mintázattól eltérően további két formáját is azonosítottuk a RAT-nek: a sporadikus és a ritmikus mintázatot.

Az elvezetett sejtek anatómiai vizsgálatával bemutattuk, hogy a retroaxonális tüzelés főleg a neurogliaform idegsejtekre jellemző a rágsáló és az ember agykérgében. A neurogliaform sejt egy konzervált sejtípus, több fajban is megtalálható, hasonló funkcionális és morfo-fiziológiai tulajdonságokkal, így a retroaxonális tüzelés is egy konzervált tulajdonság lehet, ami erre a sejtípusra jellemző és megjelenhet több fajban is.

Irodalmi adatok és saját eredményeink alapján a RAT háttérében egy sejt-intrinzik mechanizmus állhat. Kísérleteinkben a GABA és a glutamát receptor antagonisták nem voltak hatással a kialakult ritmikus RAT-re. Ez arra utal, hogy a ritmikus RAT

hátterében egy, a hálózattól független sejt-autonóm mechanizmus állhat. Ezt a feltételezést alátámasztja az a megfigyelésünk is, hogy a szomatikus membránpotenciál változtatásával modulálható a ritmikus RAT frekvenciája, hasonlóan a sejt-autonóm ritmusgeneráló thalamokortikális sejtekhez. Eredményeink alapján az első rétegi neurogliaform interneuronok intrinzik ritmusgeneráló tulajdonsággal rendelkeznek, hasonlóan más szubkortikális idegsejtekhez, amelyek hálózati oszcillációk kialakításában vesznek részt. Ezek alapján feltételezhetjük, hogy az elsőrétegi neurogliaform interneuronokon megfigyelhető ritmikus RAT fontos szerepet játszhat az agykérgi oszcillációk kialakításában vagy modulációjában.

Hipotézisünk szerint azon mechanizmusok, amely az axon membránpotenciálját depolarizálják, azok hozzájárulhatnak a retroaxonális tüzelés kialakulásához. Ennek legalább két lehetséges forgatókönyvét képzeljük el: az adott sejtípus axonjain expresszálódó transzmembrán ioncsatornák közvetlenül depolarizálhatják az axont, vagy az extracelluláris ion koncentrációk változása közvetett módon megváltoztathatja a membrán serkenthetőségét vagy a membránpotenciálját. Az előbbire példa a HCN-csatorna, amelyet a membránpotenciál és az intracelluláris jelátviteli útvonalak modulálnak. Kísérleteink bemutatták, hogy az axonális HCN-csatornák szükségesek a retroaxonális tüzelés kialakulásához és fenntartásához. A retroaxonális tüzelés kialakulásához hozzájáruló másik mechanizmusra példa lehet az extracelluláris kalcium és kálium koncentráció változás, amelyet a neurális aktivitás modulál. Bemutattuk, hogy az extracelluláris kálium ion koncentráció kismértékű növekedése valóban megnövelheti a RA-AP-ok kialakulásának valószínűségét.

Kísérleteink rámutattak arra, hogy akciós potenciálok nem csak az AIS-ban, hanem az axon disztálisabb részein is kialakulhatnak elsőrétegi interneuronokon megnövekedett hálózati aktivitás során humán és patkány túlélő agyszellet preparációkban. In vivo kísérleteinkben meggyőződünk arról, hogy a RA-AP-ok fizioiogiás környezetben is előfordulnak, valamint az AIS-AP-októl eltérő fázisban jelennek meg. Az axon iniciális szegmentumon, valamint az axon disztális részén kialakult akciós potenciál iniciáció időpontja eltérő az agykérgi lassúhullámú oszcilláció során. Az UP-állapotok alatt a membránpotenciál depolarizációja lehetővé

teszi az AIS-AP kialakulását, azonban hiperpolarizált állapotban kizárólag RA-AP alakulhat ki. Az AIS-AP-k és a RA-AP-k eltérő időbeli megjelenése gazdagítja egyes sejtek funkcionális repertoárját. A klasszikus koncepciónak megfelelően a kizárólag AIS-AP leadására képes sejtípusok szelektíven járulnak hozzá a populációs aktivitás bizonyos fázisaihoz, míg a RA-AP-ot is prezentáló sejtípusok képesek olyan kimenetet produkálni, amikor a szomato-dendritikus bemenet által indukált AIS-AP nem alakulhat ki. Ezáltal a RA-AP-okra képes GABAerg interneuronok GABA-t szabadíthatnak fel szinaptikus serkentő bemenetek nélkül. Erre jó példa az oszcillációk alatt megjelenő DOWN-állapotok, vagy a delta hullámok, amikor az agykérgi interneuronok nyugalmi állapotban vannak és nem generálnak akciós potenciálokat. A RA-AP generálásra képes interneuronok a szomato-dendritikus régiójuk bemeneteitől függetlenül is képesek lehetnek szinaptikus és nem szinaptikus GABAerg gátló visszacsatolást biztosítani az agykérgi mikrohálózat megnövekedett aktivitású régióiban, továbbá elősegíthetik az extracelluláris térben lévő tónikus GABA szint fenntartását, valamint befolyásolhatják a környező piramis sejtek aktivitását.

## Summary

In the last decade, retroaxonal firing (RAF) has been observed in hippocampal and cortical GABAergic interneurons. The action potentials generated during RAF are different from those of somatically evoked action potentials. These action potentials propagate in anti-dromic, retro-axonal manner (RA-AP) from the distal parts of the axon, in contrast to action potentials initiated at the initial segment of the axon. We performed whole cell patch clamp intracellular recordings on human and rodent cortical interneurons to investigate RA-APs. RAF is an evolutionarily conserved phenomenon that occurs in human and rodent cortical neurons. We identified three qualitatively different forms of RAF: sporadic, tonic, and rhythmic firing. Different patterns of RAF and RA-AP appear in both NGFC (neurogliaform cell) and non-NGFC but are more prevalent in cells showing NGFC morphology.

The investigation of rhythmic RAF mechanism revealed that neurogliaform interneurons may possess an intrinsic rhythm-generating property, suggesting that these cells can contribute to the initiation and modulation of cortical oscillation. Our

experiment revealed that axonal hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels can play an active role in RAF. In addition, extrinsic factors such as the dynamic change in local extracellular ionic milieu can modulate the axonal membrane potential. We found that elevated potassium ion concentration in the extracellular space can depolarize the axon and induce RA-APs both in human and rodent neocortex.

Our experiments in active brain slice preparations as well as in vivo measurements pointed out that a proportion of layer 1 interneurons are capable to fire network linked precise timed AIS-APs and network independent RA-APs, resulting that a single cell is able to contribute differently to in vivo network activity in a temporally disparate manner. Our results suggest that layer 1 neurogliaform interneurons may contribute to cortical slow-wave network oscillations in a different way compared to other types of layer 1 interneurons. An evolutionarily conserved intrinsic axonal mechanism specific to neurogliaform cells may play an important role in the generation and modulation of cortical slow oscillations.

## **Közlemények**

MTMT azonosító: 10069477

Összesített IF: 77,43

### **A doktori eljárást alapját képező közlemények:**

TEMPORAL DISPARITY OF ACTION POTENTIALS TRIGGERED IN AXON INITIAL SEGMENTS AND DISTAL AXONS IN THE NEOCORTEX

Márton Rózsa\*, **Martin Tóth**\*, Gáspár Oláh, Judith Baka, Rajmund Lákovics, Pál Barzó, Gábor Tamás

Science Advances, 9, eade4511(2023).

DOI:10.1126/sciadv.ade4511

IF: 13.6

\*társ-elsőszerző

## MORPHOELECTRIC AND TRANSCRIPTOMIC DIVERGENCE OF THE LAYER I INTERNEURON REPERTOIRE IN HUMAN VERSUS MOUSE NEOCORTEX

Thomas Chartrand, Rachel Dalley, Jennie Close, Natalia A. Goriounova, Brian R. Lee, Rusty Mann, Jeremy A. Miller, Gabor Molnar, Alice Mukora, Lauren Alfiler, Katherine Baker, Trygve E. Bakken, Jim Berg, Darren Bertagnolli, Thomas Braun, Krissy Brouner, Tamara Casper, Eva Adrienn Csajbok, Nick Dee, Tom Egdorf, Rachel Enstrom, Anna A. Galakhova, Amanda Gary, Emily Gelfand, Jeff Goldy, Kristen Hadley, Tim S. Heistek, DiJon Hill, Nik Jorstad, Lisa Kim, Agnes Katalin Kocsis, Lauren Kruse, Michael Kunst, Gabriela Leon, Brian Long, Matthew Mallory, Medea McGraw, Delissa McMillen, Erica J. Melief, Norbert Mihut, Lindsay Ng, Julie Nyhus, Gáspár Oláh, Attila Ozsvár, Victoria Omstead, Zoltan Peterfi, Alice Pom, Lydia Potekhina, Ramkumar Rajanbabu, Marton Rozsa, Augustin Ruiz, Joanna Sandle, Susan M. Sunkin, Ildiko Szots, Michael Tieu, **Martin Toth**, Jessica Trinh, Sara Vargas, David Vumbaco, Grace Williams, Julia Wilson, Zizhen Yao, Pal Barzo, Charles Cobbs, Richard G. Ellenbogen, Luke Esposito, Manuel Ferreira, Nathan W. Gouwens, Benjamin Grannan, Ryder P. Gwinn, Jason S. Hauptman, Tim Jarsky, C. Dirk Keene, Andrew L. Ko, Christof Koch, Jeffrey G. Ojemann, Anoop Patel, Jacob Ruzevick, Daniel L. Silbergeld, Kimberly Smith, Staci A. Sorensen, Bosiljka Tasic, Jonathan T. Ting, Jack Waters, Christiaan P.J. de Kock, Huib D. Mansvelder, Gabor Tamas, Hongkui Zeng, Brian Kalmbach, Ed S. Lein

SCIENCE, 382, eadf0805, 2023

DOI:10.1126/science.adf0805

IF: 63.83

### **A doktori értekezés témájához kapcsolódó szakmai**

#### **anyagok:**

Folyóiratban megjelent szócikkek:

TEMPORAL DISPARITY OF ACTION POTENTIALS TRIGGERED IN AXON INITIAL SEGMENTS AND DISTAL AXONS IN THE NEOCORTEX

Márton Rózsa, **Martin Tóth**, Gáspár Oláh, Judith Baka, Rajmund Lákovic, Pál Barzó, Gábor Tamás

Science Advances, 9, eade4511(2023).

DOI:10.1126/sciadv.ade4511

IF: 13.6

### Konferencia összefoglalók:

TEMPORAL DISPARITY OF ACTION POTENTIALS TRIGGERED IN AXON INITIAL SEGMENTS AND DISTAL AXONS IN THE NEOCORTEX

**Martin Tóth**, Márton Rózsa, Gáspár Oláh, Judith Baka, Rajmund Lákovics, Pál Barzó, Gábor Tamás

Joint Neuroscience Meeting of The Hungarian Neuroscience Society (MITT) & The Austrian Neuroscience Association (ANA), Budapest, 2023

TEMPORAL DISPARITY OF ACTION POTENTIALS TRIGGERED IN AXON INITIAL SEGMENTS AND DISTAL AXONS IN THE NEOCORTEX

**Martin Tóth**, Márton Rózsa, Gáspár Oláh, Judith Baka, Pál Barzó, Gábor Tamás

FENS Forum 2022 | International Neuroscience Conference, Paris, 2022

RETROAXONAL ACTION POTENTIALS OF LAYER 1 INTERNEURONS IN THE HUMAN AND RODENT NEOCORTEX

**Martin Tóth**, Márton Rózsa, Gáspár Oláh, Norbert Mihut, Judith Baka, Pál Barzó,

Gábor Molnár, Gábor Tamás

FENS, Virtual Forum, 2020

RHYTHMIC PERSISTENT FIRING OF NEUROGLIAFORM INTERNEURONS IN THE HUMAN AND RODENT NEOCORTEX

Rózsa M, **Tóth M**, Oláh G, Baka J, Barzó P, Tamás G

FENS Regional Meeting, Pécs, 2017

### Egyéb szakmai anyagok

### Konferencia összefoglalók:



SPATIAL PROFILE OF CALCIUM TRANSIENTS EVOKED BY  
BACKPROPAGATING ACTION POTENTIAL IN HUMAN CORTICAL  
PYRAMIDAL DENDRITES

Ildikó Szöts, **Martin Tóth**, Pál Barzó, Gábor Tamás, Gábor Molnár  
IBRO World Congress of Neuroscience, Granada, 2023

GROUP I METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR MEDIATED  
MODULATION OF EXCITATORY SYNAPTIC TRANSMISSION SHOWS  
INTERNEURON SPECIFICITY IN THE HUMAN CORTEX

Joanna Sandle, **Martin Tóth**, Gábor Molnár, Karri Lamsa, Pál Barzó, Gábor Tamás  
IBRO World Congress of Neuroscience, Granada, 2023

## Társszerzői nyilatkozat

Kijelentem, hogy **Tóth Martin** szerepe meghatározó volt az

Márton Rózsa, **Martin Tóth**, Gáspár Oláh, Judith Baka, Rajmund Lákovics, Pál Barzó, Gábor Tamás

Temporal disparity of action potentials triggered in axon initial segments and distal axons in the neocortex. Science Advances. 9, eade4511(2023) DOI:10.1126/sciadv.ade4511

és

Thomas Chartrand, Rachel Dalley, Jennie Close, Natalia A. Goriounova, Brian R. Lee, Rusty Mann, Jeremy A. Miller, Gabor Molnar, Alice Mukora, Lauren Alfiler, Katherine Baker, Trygve E. Bakken, Jim Berg, Darren Bertagnoli, Thomas Braun, Krissy Brouner, Tamara Casper, Eva Adrienn Csajbok, Nick Dec, Tom Egdorf, Rachel Enstrom, Anna A. Galakhova, Amanda Gary, Emily Gelfand, Jeff Goldy, Kristen Hadley, Tim S. Heistek, DiJon Hill, Nik Jorstad, Lisa Kim, Agnes Katalin Kocsis, Lauren Kruse, Michael Kunst, Gabriela Leon, Brian Long, Matthew Mallory, Medea McGraw, Delissa McMillen, Erica J. Melief, Norbert Mihut, Lindsay Ng, Julie Nyhus, Gáspár Oláh, Attila Ozsvár, Victoria Omstead, Zoltan Peterfi, Alice Pom, Lydia Potekhina, Ramkumar Rajanbabu, Marton Rozsa, Augustin Ruiz, Joanna Sandle, Susan M. Sunkin, Ildiko Szots, Michael Tieu, **Martin Toth**, Jessica Trinh, Sara Vargas, David Vumbaco, Grace Williams, Julia Wilson, Zizhen Yao, Pal Barzo, Charles Cobbs, Richard G. Ellenbogen, Luke Esposito, Manuel Ferreira, Nathan W. Gouwens, Benjamin Grannan, Ryder P. Gwinn, Jason S. Hauptman, Tim Jarsky, C. Dirk Keene, Andrew L. Ko, Christof Koch, Jeffrey G. Ojemann, Anoop Patel, Jacob Ruzevick, Daniel L. Silbergeld, Kimberly Smith, Staci A. Sorensen, Bosiljka Tasic, Jonathan T. Ting, Jack Waters, Christiaan P.J. de Kock, Huib D. Mansvelter, Gabor Tamas, Hongkui Zeng, Brian Kalmbach, Ed S. Lein.

Morphoelectric and transcriptomic divergence of the layer 1 interneuron repertoire in human versus mouse neocortex. Science 382, eadf0805 (2023). DOI:10.1126/science.adf0805

címmel megjelent közleményekben.

Az értekezésben közölt eredményeket tudományos fokozat (Ph.D.) megszerzésére nem használtuk fel és ezt a jövőben sem fogjuk tenni.

Szeged, 2024.04.18.

.....

Dr. Tamás Gábor  
(témavezető)

.....

Dr. Molnár Gábor  
(témavezető)