

OTKA – ZÁRÓJELENTÉS

Magasabbrendű talamikus magvak serkentő és gátló kontrollja

2005-2008

Új talamikus gátló pálya az anterior pretektális magból

Anterográd és retrográd pályajelölési kísérletekkel igazoltuk, hogy az anterior pretektális mag (APT) gátló rostokkal szelektíven beidegzi a magasabbrendű talamikus magvakat. Az APT fokális beidegzést ad elsősorban a látó és szomatoszenzoros magasabbrendű magvakba (Bokor et al., 2005, Giber et al., 2008). Az APT terminálisok nagyméretűek és több szinapszist képeznek a relésejteken. Kollaborációs keretek között kidolgoztunk egy új, *in vitro* szelet preparátumot, melyben az APT-talamikus pálya tanulmányozható. Igazoltuk, hogy az APT-talamikus pálya GABA-A receptor mediálta gátló választ indukál a relésejteken. A gátló pálya igen hatékonynak bizonyult, egyetlen APT rost stimulálása képes volt a karakterisztikus visszacsapó tüzeléssorozat (rebound burst) kiváltására (Bokor et al., 2005).

Megvizsgáltuk a gátló pálya eredetűl szolgáló APT neuronok aktivitását és az aktivitás EEG függését *in vivo* altatott állatban. Korrelált fiziológiai és anatómiai elemzés révén háromféle sejtípust találtunk: parvalbumin-pozitív, gyors tüzelés-sorozatokkal jellemezhető sejteket, parvalbumin-negatív, lassú, ritmikus sejteket és gyengén-pozitív, tonikus sejteket. A sejtek aktivitása különböző mértékben függött az EEG-től. Az EEG-hez kapcsolt sejtek aktivitása érzékenyen reagált a spontán vagy farok csípéssel kiváltott EEG változásokra (Bokor et al. 2005).

Igazoltuk tehát egy új, szelektív, rendkívül hatékony gátló pálya létét a magasabbrendű talamikus magvakban. A pálya eredetűl szolgáló sejtek aktivitása arra utal, hogy a pálya sokféle, magas frekvenciás, gátló szignál révén fejt ki hatását. Eredményinket első szerzős cikkben publikáltuk a Neuron-ban.

Az új talamikus gátló pálya és a jól ismert nucleus reticularis thalami (nRT) eredetű gátló pálya összehasonlító elemzése.

Elvégeztük az APT eredetű és a jól ismert nRT eredetű GABAerg talamikus terminálisok szisztematikus, 3D, elektronmikroszkópos összehasonlítását (Wanaberbecq, Bodor et al., 2008) a magasabbrendű szomatoszenzoros magban, a n. posterior-ban. A két terminális típus ultrastrukturális szerveződése alapvető különbségeket mutatott. Minden APT terminális többszörös szinaptikus kapcsolatot létesített. Egyetlen buton szinapszisainak száma 4 és 16 között változott (átlag 7). Minden APT terminális egyetlen posztszinaptikus elemmel rendelkezett, melyek 90% 1 mikronos vagy annál vastagabb (proximális) dendritnek bizonyult. Ezzel szemben a retikuláris terminálisok nagy része több célelemmel rendelkezett, ezeket pedig egyetlen szinapszison keresztül innerválta. A célelemek zöme vékony dendrit, eloszlásuk megfelelt a véletlenszerű eloszlásnak. Egyetlen APT eredetű terminális tehát hétszer annyi szinapszissal idegzi be célelemét, mint az nRT eredetű. A fiziológia vizsgálatok szerint azonban egy nRT eredetű rost több (átlag 7) ilyen egyszeres szinapszis alkotó terminálissal lép kapcsolatba a posztszinaptikus elemével. Tehát mindkét pálya többszörös kapcsolatokat alkot, a különbség a szinapszisok térbeli elrendeződésében van. Míg az nRT 7-8 egyetlen szinapszist alkotó butonnal teremt kapcsolatot a relésejttel, az APT ugyanennyi szinapszisa egyetlen terminálison helyezkedik el.

In vitro szelet preparátumban átlag-varianca analízis segítségével összehasonlítottuk az APT-talamikus és az nRT-talamikus pálya GABAerg transzmissziójának kvantális paramétereit. Eredményeink szerint a két különböző morfológiájú pálya nem a kiváltott válasz nagyságában, illetve a kvantális paraméterekben, hanem a rövid távú plaszticitásban különbözött. A szinapszisok térbeli elhelyezkedéséből adódó különbség magas frekvenciás ingerlés esetében mutatkozik meg. Ötven Hz-es stimuláció esetében az nRT jelentős szinaptikus depressziót mutatott, míg az APT által kiváltott IPSC-k alig csökkennek (Wanaberbecq, Bodor et al., 2008).

Igazoltuk tehát, hogy az újonnan felfedezett gátló pálya morfológiai és fiziológia tulajdonságai alapvetően eltérnek az eddig ismert talamikus gátló pályáétól. Az eredmények szerint az új pálya szelektíven a magas frekvenciás jelek hűsége

továbbítására alkalmas, ami összecseng az in vivo sejtaktivitásról nyert eredményeinkkel (lásd feljebb). Eredményinket megosztott elő szerzős cikkben publikáltuk a J. Neurosci.-ben.

Az új gátló pálya általánosíthatósága, motoros talamikus magvak, rágszáló-főemlős összehasonlítás.

Felmerült a kérdés mennyiben egyedi az APT-talamikus pálya szerveződése és mennyiben hasonlítható össze más az nRT-n kívülről eredő (extraretikuláris, extratalamikus) gátlópályákkal. Kérdés volt, vajon az új terminális típus csak rágszálókban fordul-e elő. Ezért összehasonlító morfológia elemzést végeztünk az APT talamikus és a Parkinson-kór szempontjából fontos nigrotalamikus pálya között (Bodor et al., 2008). A nigrotalamikus pálya kvantitatív elemzését patkányban és majomban is elvégeztük. Megállapítottuk, hogy a két fajnál a nigrotalamikus terminálisok mérete, a szinapszisok száma és eloszlása rendkívül nagy hasonlóságot mutat egymáshoz és a patkány APT-talamikus terminálisaihoz. Egy terminális esetében az átlagos szinapszis szám 8,5 volt mindkét faj esetében. Csakúgy, mint az APT esetében a terminálisok összes szinapszisa, minden esetben egyetlen posztszinaptikus relésejtre konvergált. A legközelebbi szinapszis átlagos távolsága patkányban 169 majomban 178 nm volt. A szinapszisok közötti távolságok eloszlás függvénye igen nagy hasonlóságot mutatott a három pálya esetében. A terminálisokat mindenesetben külső glia burok borította.

Eredményeink igazolták, hogy a sokszoros szinapszissal rendelkező terminális több talamikus magban is előfordul és jellemző rágszálókra és főemlősökre is. A megdöbbentő hasonlóság a terminálisok között arra, utal, hogy egy evolúciósan konzervatív, egy adott funkcióra specializálódott szerkezettel állunk szemben. Feltételezéseink szerint a sok szinapszissal rendelkező GABAerg terminális hatékonyságának egyik oka az egy terminálishoz tartozó nagyszámú, közel elhelyezkedő szinapszis. A sok szinapszis között nagy valószínűséggel következhet be a „spill-over” jelensége, ami fokozza a posztszinaptikus válasz erősségét, különösen magas frekvenciás impulzusok esetében. Az eredményekből születet kézirat első szerzős közleményként a J. of Neurosci.-ban, került publikálásra

A zona incerta (ZI) kapcsolatai, sejtaktivitása és funkciója

Korábbi eredményeink szerint (Barthó et al., 2002) a zona incerta is az extraretikuláris gátló rendszer részét képezi. Kísérleteink során megvizsgáltuk a zona incerta kapcsolatait a felszálló szenzoros információt hordozó rostokkal, továbbá az agykérgi illetve az APT eredetű bementeket. Ezen kívül tanulmányoztuk az agykérgi aktivitás hatását a sejtek működésére, illetve kollaborációs munkában a szenzoros kiváltott válasz tulajdonságait a ZI-ben, valamint a ZI lézió hatását a talamikus információ átvitelre.

A szomatoszenzoros információt hordozó trigeminális eredetű felszálló afferensek nagy terminálisai többszörös aszimmetrikus szinapszisokat képeztek a GABAerg ZI sejtek nagy átmérőjű proximális dendritjein. Ennek megfelelően bajusz ingerlésre a ZI sejtek igen rövid latenciával és nagy hatékonysággal válaszoltak (Lavallée et al., 2005).

A szomatoszenzoros kéregből érkező, leszálló, agykérgi bememet a proximális dendritek mellett, különös, nagy méretű tüskéket is beidegzett a ZI-ben. A kérgi serkentő butonok egyszeres szinapszist alkottak, de a postszinaptikus denzitás mérete igen nagy volt, ami hatékony kapcsolatra utal (Barthó et al., 2007). Ezt igazolta, hogy *in vivo* kísérleteink szerint a zona incerta ritmikus sejtjei pontosabban szinkronizálódtak a kérgi lassú oszcillációhoz, mint maguk a talamokortikális sejtek, amelyekről ismert erős kérgi meghatározottságuk. A zona incerta agykérgi kontrollját lassú EEG oszcilláció (1-3 Hz), epileptikus orsó aktivitás (HVS) illetve 5-9 Hz oszcilláció alatt vizsgáltuk. Minden vizsgált ritmikus EEG mintázat során a zona incerta sejtek tüzelési mintázata jelentősen megváltozott. Lassú hullámú aktivitás illetve HVS során a legtöbb sejt szinkronizálta aktivitását az EEG hullám aktív fázisához („up state”). Az 5-9 Hz oszcilláció során megváltozott a sejtek akciós potenciáljainak eloszlása és megnőtt a „wavalet” analízis segítségével megállapított spektrális sűrűség az 5-9 Hz tartományban (Barthó et al., 2007).

Az elvezetett és megjelölt zona incerta sejtek 3D morfológiai analízise kimutatta, hogy e neuronok polarizált dendritfával rendelkeznek, mediolaterális irányban. Egy sejt átéri a zona incerta jelentős részét, míg a másik két irányban a dendritfa kiterjedése jelentősen kisebb. A sejteket nagyon hosszú dendritszegmensek jellemezték. Ez a

dendritfa szerkezet segítheti távoli kéregterületek konvergenciáját egy ZI sejtre (Barthó et al., 2007).

Anterograd és retrograd pályajelölési kísérletek segítségével vizsgáltuk az anterior pretektális mag (APT) és a zona incerta (ZI) összeköttetéseit fény és elektronmikroszkópos (EM) szinten. Az APT rostok döntő többsége szelektíven a ZI azon részében végződött, amelyről ismert, hogy a talamuszba vetít. Az APT-ZI pálya nagyobb részben GABA-negatív, kisebb részben GABAerg komponenseket tartalmazott. Heterogenitás jellemezte a ZI- és a PO-vetítő sejtek parvalbumin tartalmát is, amiről leírtuk, hogy az APT-ben a tüzelési mintázattal függ össze (lásd fentebb). Kettős retrograd kísérletekkel vizsgáltuk vetíthet-e egyetlen APT sejt a talamuszba és a ZI-be. Eredményeink szerint nagyon kevés ilyen sejt fordul elő, ami szegregált APT-talamikus és APT-ZI pályára utal (Giber et al., 2008).

Kollaborációs kísérletek keretében megvizsgáltuk a ZI lézió hatását a n. posterior relésejtjeinek bajusz ingerlésre adott válaszára. In vivo intracelluláris elvezetés során a ZI sejtek IPSP-EPSP szekvenciával válaszoltak és nagyon ritkán generáltak akciós potenciált. ZI lézió után azonban a sejtek gyors felfutású EPSP-vel, illetve akciós potenciállal reagáltak a bajuszingerlésre. Ez arra utal, hogy a perifériás input egy ZI-ben átkapcsolódó rendkívül gyors előrecsatoló gátlás révén képes megakadályozni a perifériás serkentés hatását a relésejtre (Lavallée et al. 2005)

Kísérleteinkkel tehát megállapítottuk, hogy a ZI aktivitását jelentősen befolyásolja a felszálló szenzoros és a leszálló agykérgi bemenet és rendkívül hatékony gátlást fejt ki a magasabbrendű szomatoszenzoros magban, amivel képes megakadályozni a szenzoros információ továbbítását. Eredményeinket egy első szerzős J. Neurosci. illetve JCN cikkben és egy társszerző J. Neurosci. cikkben közzé tettük.

Új bajusz mozgást érzékelő átkapcsoló állomás a talamuszban

Kanadai kollaboráló partnerünkkel elvégeztük a nemrég feltárt új bajusz mozgás érzékelő pálya jellemzését. A pálya a spinális trigeminális magból indul és a VPM ventrolaterális (VPMvl) részén kapcsolódik át. Megállapítottuk, hogy jól ismert barreloid VPM sejtekkel szemben ahol egy legnagyobb választ kiváltó „principális” bajusz mindig megfigyelhető ez a pálya több bajusz ingerlésre ad gyors, rövid latenciájú választ, ami a

prinicipális trigeminális nucleus irtása után is megmarad. Igazoltuk, hogy ilyen receptív mezővel rendelkező sejt az nRT-ben is előfordul és e sejtek axonjai a VPMvl-ben vetülnek, tehát klasszikus feed-back gátlásért felelősek, valamint, hogy a VPMvl a hagyományos VPM-el szemben reciprok kapcsolattal rendelkezik a másodlagos szomatoszenzoros agykérgi régióval. Eredményeinket első szerzős J. Neurosci. cikkben tettük közzé (Bokor et al. 2008).

További eredmények

Francia kollaborációban vizsgáltuk az absence epilepsziát jellemző tüske-hullám aktivitás (spike-and-wave discharges, SWD) és a normális körülmények között előforduló két különböző eredetű EEG mintázat az i; nRT eredetű alvási orsó (spindle) és az ii; kérgi eredetű 5-9 Hz oszcilláció celluláris hátterét a talamuszban. Kérdésünk az volt a két normális oszcilláció közül, melyik hasonlít jobban az SWD-t kísérő aktivitáshoz. Eredményeink arra utalnak, hogy a GAERS patkányokban az éber nyugalmi állapothoz köthető 5-9Hz aktivitás patológikus szinkronizációja vezet az SWD-khez, nem az orsó aktivitás. Következésképpen valószínűsíthető, hogy GAERS patkányokban a patológikus aktivitás eredete a kéregben és nem a talamuszban keresendő, ami új megvilágításba helyezi ennek az epilepszia típusnak a patomechanizmusát. Eredményeinket társzerzős cikkben a J. Physiology c.folyóiratban közöltük.

A fent említett szakmai eredmények mellett az OTKA projekt során sikeres kollaborácót folytattunk négy nagy tekintélyű külföldi laboratóriummal, melyek közül az egyik vezetője (Prof Anita Lüthi, Biozentrum Basel) az OTKA pályázat résztvevője, a másik laborvezető pedig (Prof. Martin Deschenes, University Laval, Quebec) a nemzetközi kiegészítő pályázat partnere. Eredményeinket a cikkek mellett, poszter illetve szimpózium prezentáció formájában több nemzetközi konferencián bemutattuk. Az eredményekből a projekt vezető (Acsády László) meghívott előadóként, több angol, német, francia és spanyol egyetemen tartott előadást. Ezen kívül a MITT 2007-es szegedi konferenciáján tartott megnyitó plenáris előadás témája is az OTKA pályázat eredményeire épült. A pályázat anyagából három doktori tézis készült, melyből kettő védés már sorra került (Dr Barthó Péter és Dr Bodor Ágnes) a harmadik jelenleg bírálat

alatt van (Slézia Andrea). A témavezető 2007-ben elnyert akadémiai doktori fokozatának tematikája jelentős mértékben tartalmazta az OTKA pályázat által finanszírozott kutatási eredményeket. A pályázatban három TDK-s hallgató vett részt, melyik közül egyik jelenleg PhD hallgatóként folytatja tanulmányait. A pályázatban futó egyik projekttel Dr Bokor Hajnalka 2006-ban Akadémiai Ifjúsági díjban részesült. A 2005-ös Neuron cikk után több tudomány-népszerűsítő beszélgetésre került sor a projekt vezetővel különböző rádió és TV csatornákon. A pályázat eredményei beépültek az ELTE, a Semmelweis, a Szent István és a Pázmány Péter egyetemeken tartott graduális és posztgraduális képzés tematikájába.

Összefoglalás

Az OTKA pályázat során leírtunk és karakterizáltunk egy új gátlás-típust a talamuszban. E gátlórendszer axonvégződése és az általuk közvetített gátlás különbözött a talamuszban jól ismert gátlórendszerek tulajdonságaitól. Az axonterminálisok ultrastruktúrája és az általuk beidegzett célelemek hatékony gátlásra utaltak. Élettani kísérletek igazolták az anatómiai predikciókat és kimutatták, hogy ez a gátlás típus hatékony információ átvitelre képes magas frekvenciás impulzusok esetén is, mikor az ismert gátlópálya hatékonysága jelentősen csökken. Az új gátlás típus képes megakadályozni a beidegzett talamikus sejtek működését, illetve képes kiváltani a karakterisztikus visszacsapó választ. Az új gátlástípust sikerült azonosítani több pálya esetén, köztük főleg a Parkinson-kórban érintett talamikus bemenetek esetében is. A pályázat során részletesen vizsgáltuk az új gátló pálya érdekes sejtjeinek szerkezetét és működését.