

PROJEKT BESZÁMOLÓ

A pályázat keretében elvégzett munka eredményességének érdekében fontos volt a megfelelő módszertan kidolgozása. Legfontosabb módszertani újításunk a retrográd jelölt neuronok sűrűségének Voronoi cellák segítségével történő meghatározása volt. A módszer azért fontos és előnyös, mert minden egyes idegsejt esetében számszerűsíthető a rá jellemző sűrűségérték. Továbbá kiküszöböli a bineléssel járó artefaktumokat, ami a bin méretezéséből és térbeli lokalizációból fakad. Ugyancsak sikerrel használtuk két különböző molekulásúlyú BDA keverékét kétirányú, bidirekcionális pályajelölőként, lehetővé téve ugyanazon metszeten és egyazon festéssel a be- és kimenetek meghatározását. Ez megnövelte a térképezés pontosságát. Ezen felül pedig még egy pályajelölő anyagot, PhaL-t is be tudtunk injektálni, ami növeli a GABAerg célsejtek meghatározásának hatékonyságát. Végül pedig meghatározott szempontok alapján kiválasztott területeken mintavételezéssel határoztuk meg az axon végződészerű struktúrák sűrűségét, ami fontos információ a célterületek azonosítását illetően. A mintavételezést az a tény szükségessé tette, hogy a vizsgált terület mérete miatt a teljes terület sűrűség meghatározása technikailag nem lehetséges.

A pályázati célkitűzéseknek megfelelően 3 fő pontban foglalom össze az eredményeinket.

1. Az ujjbegy reprezentációk ki- és bemeneteinek szomatotópiája és modalitás specifikus eloszlása az área 3b, 1 és 2-ben.

A kapcsolatok szomatotópiáját mókusmajomban az área 3b- és 1-ben részletesen feltérképeztük és leközlöttük (Négyessy et al., 2013, Ashaber et al., 2014). Kimutattuk, hogy áreaán belül szoros összeköttetés van a szomszédos ujjbegy reprezentációk között, míg a távolabbi reprezentációk között nincs vagy kis sűrűségű a kapcsolat. Az área 3b és área 1 kapcsolatmintázatát összehasonlítva utóbbi esetben nagyobb divergenciát tapasztaltunk, azaz az área 1 ujjbegy reprezentáció intrinzik horizontális kapcsolatai nagyobb szomatotopikus mezőt foglalnak magukba, mint área 3b esetében. Az ujjbegy reprezentációk összeköttetésekének átfedését a BDA jel eloszlást párhuzamosan beinjektált PhaL

pályajelölésből származó adatokkal kiegészítve az área 3b-ben és área 1-ben konferencia absztrakt formában leközlöttük (Pálfi et al., 2010). A feltárt kapcsolatmintázat segítségével magyarázhatók különböző fiziológiai jelenségek, mint pl. reprezentációs plaszticitás, receptív mező komplexitás, funneling illúzió stb. Eredményeink alapján elmondható, hogy a globális haptikus percepció kialakulása már primer szomatoszenzoros kérgi szinten elkezdődik.

A modalitás specifikus eloszlás kérdésére módszereinkkel nem tudtunk kielégítő választ adni. Ehhez szükséges egy olyan ingerlő/és kifejesztése, amivel a vizsgált ujjbegy reprezentációk teljes területén azonosíthatók a modalitás specifikus kolumnák. Jelenleg erre csak egy 3 mm átmérőjű probe áll rendelkezésünkre, ami az ujjbegy kis felületét ingerli. A beadási hely körüli „patchy” kapcsolateloszlás, amint azt a 6. ábrán mutatjuk a Wang et al. (2013) munkánkban, ugyanakkor erősen emlékeztet a primer látókérgi kapcsolateloszlásra, legalábbis área 3b-ben és arra utal, hogy az ott megismert (hasonló orientáció preferenciájú) kapcsolateloszlás jellemzi az intrinzik kapcsolatok szerveződését área 3b-ben is. További közvetett bizonyíték lehet a modalitás specifitásra, hogy a jelölt afferensek által létesített terminális axon arborizációk mérete megegyezik a funkcionális modulok méretével. Továbbá, a terminális axon elágazódásokban kiemelkedően nagy a bouton szerű struktúrák sűrűsége, ami az itt folyó szinaptikus integráció jelentőségére utal. Mindazonáltal a modalitás szelektív kapcsolateloszlás kérdésének a tisztázása további munkát igényel nemcsak az ingerlés, de a jelölt elemek (neuronok, bouton-szerű struktúrák) térképezésének és kiértékelésének újabb módszereivel.

Az área 2 kapcsolatainak részletes feltérképezése folyamatban van. Ennek a területnek a megléte mókusmajomban egyelőre csupán feltételezett, aminek fő oka, hogy csak éber állatban aktiválható. Az área 2 összeköttetéseit makákóban kezdtük vizsgálni. A meglevő esetben az anatómiai kapcsolateloszlást és a funkcionális térképek illesztését még nem végeztük el. Ez a nagyméretű és barázdált agykéreg miatt komoly kihívást jelent, amin a fiziológus partnerrel jelenleg is dolgozunk. Terveink szerint mókusmajmokban is végzünk kísérleteket, ahol az ismert szomatotópia alapján próbáljuk az área 2-t azonosítani. Így két főemlős fajból származó adatokat tudunk összevetni.

2. A szomatotópia és a modalitás specifikus eloszlás meghatározása az áréák közötti kapcsolatokban.

Ellentétben az intrinzik kapcsolatokkal az áréák között az összeköttetések az azonos, homotopikus ujjbegy reprezentációt preferálják área 3b- és 1-ben (Négyessy et al., 2013, Ashaber et al., 2014). Hasonló, homotopikus inter-areális kapcsolateloszlást mutattunk ki área 3a és 2-ben is az área 3b- és 1-el létesített kapcsolataikban. A szomatoszenzoros kéregben tehát az áréák közötti információáramlás javarészt ujj specifikus. Az ujjakat ért ingerek integrációjáért főként az intrinzik kapcsolatok felelősek. Ugyanakkor BDA-val korrelált PhaL jelöléssel kapott előzetes eredményeink arra utalnak, hogy a nem-szomszédos ujjbegy reprezentációk összeköttetései a köztes ujjbegy reprezentáció területén átfednek (Pálfi et al., 2010). Az área 1 inter-areális kapcsolatai, hasonlóan az áreaán belüli kapcsolateloszláshoz, nagyobb szomatotopikus területre terjedtek ki, mint az área 3b esetében. Ez jellemző a visszacsatolt, feedback kérgi kapcsolatokra és összhangban van az área 3b és 1 hierarchikus relációjával.

Az área 3b és 1 hierarchikus kapcsolatát az anterográd és retrográd jel rétegeloszlásával vizsgálva nem találtunk lényeges különbséget: mindkét áreaában a supragranuláris eloszlás dominál. Ugyanakkor előzetes eredményeink szerint área 1-ben nagyobb laterális kiterjedése van a retrográd jelölődésnek, mint área 3b-ben. Ezt azonban kompenzálja az área 3b-nél kisebb kérgi nagyítási faktor, amit számításba véve a két áreaában a retrográdan erősen jelölődött területek által reprezentált bőrfelület hasonlóan bizonyult. Ezt az eredményünket alaposabb kvantitatív mérésekkel szeretnénk alátámasztani. Ennek érdekében a lényegesen sűrűbben jelölt területek pontosabb lehatárolására különböző módszereket fejlesztünk. E módszerekkel ugyancsak megerősítést kívánunk kapni arra az előzetes eredményre, miszerint az área 3b-ban a retrográd jeleloszlás „csomósabb”, modulárisabb, mint az área 1-ben, ahol összehasonlítva diffúzabb jeleloszlást láttunk. Előzetes eredményeinket konferencia prezentációk formájában bemutattuk (Ashaber et al., 2012; Pálfi et al., 2012).

További megállapításunk, amit a kétirányú pályajelöléses technikával mutattunk ki, hogy az área 1 és 3a közötti kapcsolattól eltekintve (ahol a reciprok kapcsolateloszlás aszimmetrikus sűrűséget mutat) mind az intrinzik, mind a távoli horizontális összeköttetések kölcsönösek, reciprok jellegűek.

Ugyancsak terveztük a horizontális axon nyúlványok rekonstrukcióját. Ez azonban kivitelezhetetlen volt, mert a metszés során az axonokból csupán rövidebb, hosszabb szakaszok maradtak, másrészt a térképezés mintavételezett és nem szomszédos metszet sorozatokon történt.

Végül, hasonlóan az áréán belüli kapcsolatokhoz, az inter-árealis kapcsolatok modalitás specificitásának meghatározása további kísérleteket igényel.

Az intrinzik és áréák közötti kapcsolateloszlásra vonatkozó fenti eredményeink szolgálták alapul a Neuronban (Wang et al., 2013) közölt tanulmányunknak, amiben a témavezető megosztott első szerzőként szerepel. A neurális összeköttetés és a funkcionális kapcsoltság viszonyát vizsgáltuk elektrofiziológiai és fMRI módszerekkel kiegészítve a pályajelölést mókusmajmokban. Elsőként írtuk le, hogy nagy felbontásban, a nyugalmi állapotú idegsejt aktivitás valamint a voxel szintű BOLD jel korreláció, azaz a funkcionális kapcsoltság, térbeli mintázata megfelel az anatómiai kapcsolateloszlásnak mind az áréán belül, mind pedig azok közötti összeköttetések esetén. Eredményeink kérgi dinamika megértésében játszott fontosságát hangsúlyozta Olaf Sporns és Christopher Honey a cikkhez írt preview-ban.

3. A szinaptikus szerveződés vizsgálata: i. a lehetséges postszinaptikus idegsejtek azonosításával és ii. a jelölt afferensek elektronmikroszkópos rekonstrukciójával.

A jelölt afferensek bouton-szerű struktúráinak jelölt interneuronokkal létesített szoros kontaktusát négy mókusmajomban vizsgáljuk többszörös immunfluoreszcens festéssel és konfokális mikroszkópiával (Pálfı et al., 2014). Elsődleges vizsgálati területünk a terminális axon elágazódási foltok áréán belül valamint inter-árealis kapcsolatok esetén. A használt markereink (parvalbumin, somatostatin, calretinin) lefedik a 3 fı interneuron típus nagy részét. Előzetes eredményeink szerint a legnagyobb arányban a PV-ir interneuronok szerepelnek targetként és legkisebb arányban a CR-ir sejtek. Sem a regionális, sem a rétegeloszlást valamint a soma-dendrit megoszlást illetően egyelőre nem látunk lényeges különbségeket az egyes interneuron típusok között. Az adatok kiértékelése azonban még folyamatban van, így ez az eredmény változhat.

A jelölt bouton szerű struktúrák szinaptikus szerkezetének vizsgálatát a szemmel könnyen megkülönböztethetően nagynak azonosított elemek feltérképezésével kezdtük. Arra voltunk kíváncsiak, hogy un. meghajtó jellegű szinapszisokat találunk-e és milyen eloszlásban. E munka eredményeként megállapítottuk, hogy área 3b beadás után a beinjektált áreán kívül área 1 és 2-ben találtunk nagy bouton-szerű elemeket és ezek döntően a supragranuláris rétegekre lokalizálódtak. Área 1 beadást követően az említett áreákban infragranuláris dominancia mutatkozott valamint área 3a-ban azonos supra- és infragranulárisan lokalizációt találtunk. Következő lépésként a kiválasztott struktúrákat elektronmikroszkópos vizsgálatnak vetjük alá, hogy igazoljuk a szinapszis meglétét valamint összehasonlíthassuk más, kisebb jelölt és jelöletlen terminálisok szinapszisaival. Ez a munka jelenleg folyamatban van.

További eredmények

Utánpótlás képzés

A pályázat két doktorandusz munkáját tette lehetővé. Egyikük, Ashaber Mária 2013 ősszel elindította a fokozatszerzést. Emiatt az elektronmikroszkópos rekonstrukció átmenetileg leállt. A másik hallgató Pálfi Emese első éves doktorandusz, aki már egyetemi hallgatóként bekapcsolódott a munkába, jelenleg a GABAerg célsejtek feltérképezésén dolgozik.

Eltérés a költségtervtől

A pályázati ciklus második felében utazási pénzeinket anyag, de legfőképpen eszköz beszerzésre fordítottuk. Az engedélyjel átcsoportosított pénzből fejlesztettük az „intrinsic signal optical imaging” eszközünket. Ez részben eszközbeszerzést igényelt a tandem optikai rendszer kialakításához, másrészt olyan anyagok beszerzését, ami a vibrissza ingerlő és a kamera állvány elkészítéséhez kellett. Bár további eszközök beszerzése még szükséges lesz, a támogatás segítségével elértünk oda, hogy a mérések elkezdéséhez minimálisan szükséges eszközök megvannak. Ezen felül megvásároltuk a kísérletben résztvevő kutatók munkájához nélkülözhetetlen komputereket.