

Alvási orsók vizsgálata optogenetikai és fiziológiai módszerekkel

Diplomamunka

Biológus mesterszak
Idegtudomány és Humánbiológia szakirány

készítette:

FARADZS-ZADE LEJLA

Témavezető:

DR. BARTHÓ PÉTER, tudományos főmunkatárs
Magyar Tudományos Akadémia – Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet
Thalamusz Kutatócsoport

Belső konzulens:

Dr. Tóth Attila, egyetemi tanársegéd
Élettani és Neurobiológiai Tanszék

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
BIOLÓGIAI INTÉZET



Budapest, 2014.

1 Tartalomjegyzék

2	RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK	3
3	BEVEZETÉS	4
4	A TALAMUSZ ANATÓMIÁJA	4
4.1	Talamikus magvak felosztása.....	4
4.2	Prímer és magasabbrendű magok.....	5
4.3	Talamikus afferens és efferens kapcsolatok	6
4.4	A talamusz sejtípusai.....	6
4.5	Retikuláris mag.....	7
4.6	Talamokortikális kör	7
5	A TALAMIKUS SEJTEK FIZIOLÓGIÁJA	8
5.1	Talamikus sejtek tüzelési mintázata	8
6	TALAMOKORTIKÁLIS OSZCILLÁCIÓK.....	9
6.1	Alvási orsók genezise	10
6.2	Alvási orsók szerepe.....	11
6.3	Alvási orsók terminációja.....	12
6.4	Alvási orsók hossza	12
6.5	Neuronpopulációk szelektív aktiválása - Channelrhodopszin.....	14
7	CÉLKITŰZÉSEK.....	16
8	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	18
9	EREDMÉNYEK	20
10	DISZKUSSZIÓ	28
11	ÖSSZEFOGLALÓ	31
12	SUMMARY	32
13	IRODALOM.....	33
14	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	36
15	NYILATKOZAT	37

2 RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

5-HT - szerotonin

Ach - acetilkolin

Chr - channelrhodopszin

EEG - elektroencefalogram

EPSP - excitatórikus posztzinaptikus potenciál

GABA - gamma-amino-vajsav

His - hisztamin

IPSP - inhibítórikus posztzinaptikus potenciál

NA - noradrenalin

MUA- soksejt (multiunit) aktivitás

nRT - nucleus reticularis thalami

PV – parvalbumin

PV-Chr- parvalbumin-channelrhodopszin

REM - rapid eye movement, álomlátásos, vagy paradox alvás

TC - talamokortikális

vGAT - vezikuláris-GABA-transzporter

vGAT-Chr - vezikuláris-GABA-transzporter-channelrhodopszin

VPM - ventrális poszteromediális talamikus mag

YFP - sárga fluoreszcens fehérje

3 BEVEZETÉS

Az alvási orsók a lassú hullámú alvás 2. stádiumában jelentkező, 1-3 másodperc hosszú, 7-14 Hz frekvenciájú kisüléscsomagok. Az alvási orsók keletkezéséről több elmélet született. Talamikus eredetükre utal, hogy dekortikáció után a talamikus orsók továbbra is jelen vannak (Contreras és mtsai., 1996). Steriade a nucleus reticularis thalami (nRT) orsógenerátor szerepét feltételezte, mivel annak egyoldali kiirtása az orsók eltűnéséhez vezet a talamokortikális (TC) sejtekben és az ipszilaterális kéregben egyaránt (Steriade és mtsai., 1985), ezenfelül az afferenseitől megfosztott nRT képes spontán orsó oszcillációt generálni (Steriade és mtsai., 1987). A jelenleg általánosan elfogadott elmélet szerint az alvási orsók a talamikus serkentő relésejtek, illetve az nRT GABAerg neuronjainak reciprok interakciójaként alakulnak ki (Steriade és Deschenes 1984a, von Krosigk és mtsai., 1993).

4 A TALAMUSZ ANATÓMIÁJA

Az emlős talamusz a diencephalon részét képezi, egy dorzális és egy ventrális egységből álló struktúra, ami az epitalamusz és a hypothalamusz között helyezkedik el. A perifériáról érkező szenzoros és motoros információt (a szaglás kivételével) feldolgozza, majd a már megszürt információt az agykéreg felé továbbítja. Fontos szerepet tölt be többek között a tudatosság, a figyelem és az alvás-ébrenléti állapotok szabályozásában.

4.1 Talamikus magvak felosztása

A talamuszt több, jól körülhatárolható mag alkotja. Felosztásuk korábbi nézetek alapján elsősorban a bemeneteik alapján történt, amik szenzoros, motoros és asszociációs típusúak lehetnek. Ezek alapján az egyes magok egy bizonyos funkció továbbításáért felelősek. A

szenzoros bemenetek alapján megkülönböztetünk auditórikus, vizuális, szomatoszenzoros magokat attól függően, hogy azok milyen információ relézéséért, illetve milyen funkcióért felelősek. A belső fülből érkező információ a mediális genikuláris magon (MGN) keresztül áthaladva jut a hallókérgi területekre. A látási információk elsődleges feldolgozása a laterális genikuláris magban, az LGN-ben történik, ahonnan a megszűrt információk a vizuális kéregbe továbbítódnak. A szomatoszenzoros érzékelésért a ventrális komplex felelős, ide tartozik a ventrális poszteriomedialis mag (VPM) is, ami a primer szomatoszenzoros kéreggel áll topografikus kapcsolatban.

Ezek mellett Shermann és mtsai. olyan talamikus magok létezését is leírta, melyek nem a klasszikus felosztást követik. Eszerint két féle magtípus különböztethető meg: a korábbi felfogásnak megfelelő magok, melyek funkciója a perifériáról érkező bemenetek egyszeres megszűrése és azok továbbítása az agykéreg felé, illetve azok a magok, melyek egy már megszűrt információ további feldolgozását végzik, így egy többszörösen feldolgozott információt juttatnak a kéregbe. Előbbieket elsődleges, vagy primer, míg utóbbiakat magasabbrendű talamikus magoknak nevezték (Sherman és Guillery 1996).

4.2 Primer és magasabbrendű magok

A primer és magasabbrendű magvakat eltérő kapcsolatrendszer jellemzi. Minden talamikus maghoz két típusú bemenet érkezik, ezek az elődleges (driver), valamint a modulátoros bemenetek. A driver bemenet meghatározza az adott sejtek tüzelési mintázat, míg a modulátoros bemenet azok hatékonyságát képes szabályozni. A driver és modulátoros bemeneteik alapján lehet megkülönböztetni a primer és a magasabbrendű magvakat. A primer magok driver bemenetüket a perifériáról kapják, ezt az információt relézik, és küldik a kéregbe, míg modulátoros bemenetük a kéreg VI. rétegi neuronjaitól érkezik. Ezzel szemben a magasabbrendű magvak mindkét típusú afferense az agykéreg felől érkezik. Driver bemenetüket az V. rétegi, míg modulátoros bemenetüket a VI. rétegi neuronoktól kapják. Ezek alapján az elsőrendű magok egy jelfeldolgozó és jeltovábbító funkcióval bírnak, a magasabbrendű magok pedig komplexebb feladatot látnak el, azok az érzékelésben, figyelmi, illetve memória folyamatokban játszanak fontos szerepet (Sherman és Guillery 1996).

4.3 Talamikus afferens és efferens kapcsolatok

A talamusz széleskörű kapcsolatrendszerrel bír. Afferenseit klasszikus értelemben az érzékszervek felől érkező rostok alkotják, ám ezek mellett kérgi, szubkortikális, felszálló modulátor hatású, valamint gátló bemeneteket is kap.

A kérgi afferensek azoktól a kérgi területektől érkeznek, ahová az adott mag is vetít, így egy topografikus kapcsolatot alakítanak ki egymással. Ahogy az előzőekben is említettük, kérgi afferensek főként a VI. rétegi neuronoktól érkeznek, vagyis azok modulátoros bemenetek. Ez a kérgi kapcsolat minden talamikus magra egyaránt jellemző. Emellett létezik egy V. rétegi afferens bemenet is, ami kizárólag a magasabbrendű magvakhoz érkezik, funkcióját tekintve driver bemenetek (Sherman és Guillery 1996).

A szubkortikális területek felől érkező felszálló modulátor hatású pályák közé a locus coeruleus (LC) felől érkező noradrenerg (NA-erg), a dorzális raphe hisztaminerg (5-HT-erg), az agytörzsi kolinerg (ACh-erg) és a hipotalamuszból érkező hisztaminerg (His-erg) kapcsolatok tartoznak. Ezek a sejtek tüzelési mintázatának, valamint az alvás-ébrenléti szintek szabályozását végzik (Varela és Sherman 2007, Varela és Sherman 2009).

A talamuszon belüli gátlásért elsősorban az nRT felől érkező GABA-erg hatások felelősek. Ez minden talamikus magot elér, és csakúgy, mint a korikotalamikus axonok esetében, az nRT és a beidegzett talamikus mag között is egy topografikus kapcsolat áll fenn. A retikuláris gátlás mellett létezik egy a talamuszon kívüli, ún. extraretikuláris gátló bemenet. Ezek a zona incertából, az anterior pretectumból (Bartho és mtsai., 2002, Bokor és mtsai., 2005), a substantia nigra pars reticulatából és a globus pallidusból erednek (Kultas-Ilinsky és mtsai., 1983, Kuroda és Price 1991).

Az efferens kapcsolatok közé elsősorban az agykéreg tartozik, azon belül is főleg a IV., és a VI. rétegi neuronok. Ezen felül egy diffúz projekció is létezik, ami a supragranuláris réteget célozza (Jones 1998, Jones 2001).

4.4 A talamusz sejtípusai

Két fő sejtípus különíthető el a talamuszban, a serkentő relésejtek, vagyis a talamokortikális (TC) neuronok, illetve a gátló, GABAerg neuronok. A TC sejtek transzmittere a

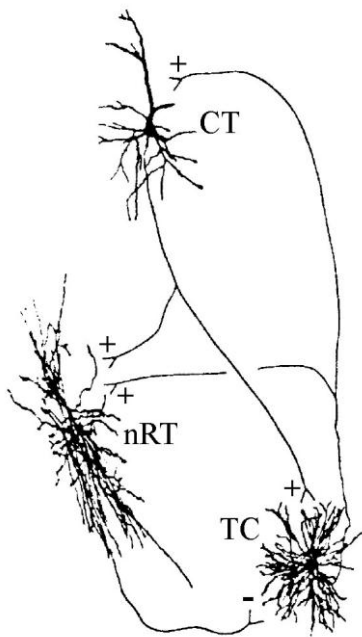
glutamát. Axonjaikat a retikuláris magon áthaladva, azok neuronjaival kollaterális kapcsolatokat kialakítva küldik a megfelelő agykérgi területek felé. A talamusz gátló sejtjei főként az nRT-ban lokalizálódnak (Steriade és Deschenes 1984b). Ezek mellett a rágcslók talamuszában elenyésző számú interneuron is található, ami az összes sejt ~1%-át teszi ki. Főemlősökben ez a szám magasabb, ott 20%-ra becsülik arányukat (Cox és mtsai., 1998).

4.5 Retikuláris mag

A talamuszon belüli gátlásért felelős mag (ahogy a fentebb említettek alapján is kiderül) az nRT. Ez a dorzális talamuszt héj szerűen körül ölelő struktúra az, amin a kortikotalamikus és talamokortikális rostok egyaránt áthaladnak, így létrehozva a mag retikulált megjelenését. Az nRT neuronok dendritjei gap junction kapcsolatokat alakítanak ki egymással (Landisman és mtsai., 2002), míg axonjaik GABAerg bemeneteket küldenek az összes talamikus mag felé. Az nRT különböző szektorokra tagolható attól függően, milyen funkcióért felelős maggal áll közvetlen kapcsolatban. Ez alapján 7 szektort különböztetünk meg: a szenzoros szektorokat, amikbe a szomatoszenzoros, vizuális, auditórikus, viscerális és gustatórikus szektorok tartoznak, a motoros, valamint a limbikus szektorokat. Ezek elkülönülése nem tökéletes, rendszerint átfednek egymással (Jones, 1985).

4.6 Talamokortikális kör

A talamokortikális kört a kortikotalamikus, a talamokortikális és az nRT axonkollaterálisai alkotják. A talamuszból a kéregbe vetítő talamokortikális, valamint a kéreg VI. rétegi sejtjei felől jövő kortikotalamikus rostok egyaránt áthaladnak az nRT-n, miközben kollaterálisai serkentő kapcsolatba lépnek annak neuronjaival (Pinault és mtsai., 1995). Az nRT emellett topografikus, reciprok kapcsolatot alakít ki azzal a maggal, ahonnan serkentő bemenetüket is kapják. Ennek a három komponensnek a kapcsolatrendszeré alkotja a talamokortikális kört, amik a talamokortikális oszcillációk, köztük az alvási orsók alapját képezik (**1. ábra**) (Bonjean és mtsai., 2011).



1. ábra: Talamokortikális kör

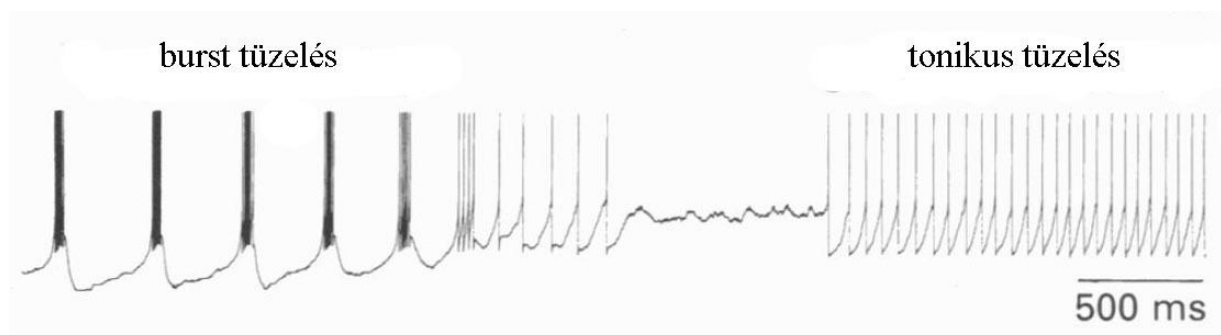
A thalamokortikális (TC) sejtek serkentő bemenetet küldenek a kéregbe, miközben kollaterálisaik az nRT-t is innerválják. A kéregből érkező kortikotalamik (CT) rostok szintén serkentő hatásúak, a TC sejteket az nRT-n áthalaladva, azok neuronjaival is kapcsolatot létesítva érik el. Az nRT, mivel GABA-erg sejtek alkotják, gátolja a TC neuronokat (Steriade és Timofeev 2003).

5 A TALAMIKUS SEJTEK FIZIOLÓGIÁJA

5.1 Talamikus sejtek tüzelési mintázata

Mind a TC, mind az nRT sejteit duális tüzelési mintázat jellemzi. Depolarizált membránpotenciálon (~ -60 mV felett) egyedi akciós potenciálokból álló, úgynevezett tonikus tüzelés, míg hiperpolarizáltabb membránpotenciálon rövid, 200-300 Hz frekvenciájú kisüléssorozatok (burst) produkálnak (**2. ábra**) (Hirsch és mtsai., 1983). A tonikus tüzelés az információ hű továbbítását teszi lehetővé, míg a burst üzemmód az információ megszűréséért, majd az így kialakult forma továbbításáért felelős (Astori és mtsai., 2013). A burst aktivitás alapja egy alacsony membránpotenciálról aktiválódó Ca^{2+} -áram, a T-áram (Jahnsen és Llinas 1984a, Jahnsen és Llinas 1984b). Ez az áram magasabb membránpotenciálon inaktív, deinaktivációjához 50-100 ms hiperpolarizáció szükséges. Aktiválódva egy alacsony küszöbű Ca^{2+} potenciált (low threshold spike, LTS) hoz létre, melyen nagy frekvenciás (200-300 Hz) Na^{+} - és K^{+} -függő akcióspotenciál sorozatok ülnek. Lassú hullámú alvás, illetve altatás alatt a burst üzemmód jellemző a thalamikus sejtekre, ébrenlét, illetve REM alvás alatt viszont főleg tonikusan tüzelnek (Steriade és Deschenes 1984a). A sejtek tüzelési mintázatát azok nyugalmi

membránpotenciál értéke szabja meg (Jahnsen és Llinas 1984a, Jahnsen és Llinas 1984b). Ez utóbbit modulátor hatású anyagok szabályozzák, a hálózat aktuális állapota alapján. Ilyen modulátorok a NA, His, 5-HT, glutamát és az Ach lehetnek, melyek koncentrációja az alvási ciklusnak megfelelően váltakozást mutat. Növelve a koncentrációjukat a “leaky” K^+ -áram zárása révén depolarizációt idéznek elő, ami burst módból a tonikus tüzelési módba állíthatja a sejtet, míg ha alacsony koncentrációban vannak jelen, burst tüzelést válthatnak ki (Lu és mtsai., 2006, McCormick és Wang 1991).



2. ábra: Talamikus sejtek tüzelési mintázata

A TC és nRT neuronokat két féle tüzelési mintázat jellemzi: az alacsonyabb membránpotenciálról aktiválódó burst aktivitás, valamint a magasabb membránpotenciálon kialakuló tonikus tüzelés (McCormick és Wang 1991).

6 TALAMOKORTIKÁLIS OSZCILLÁCIÓK

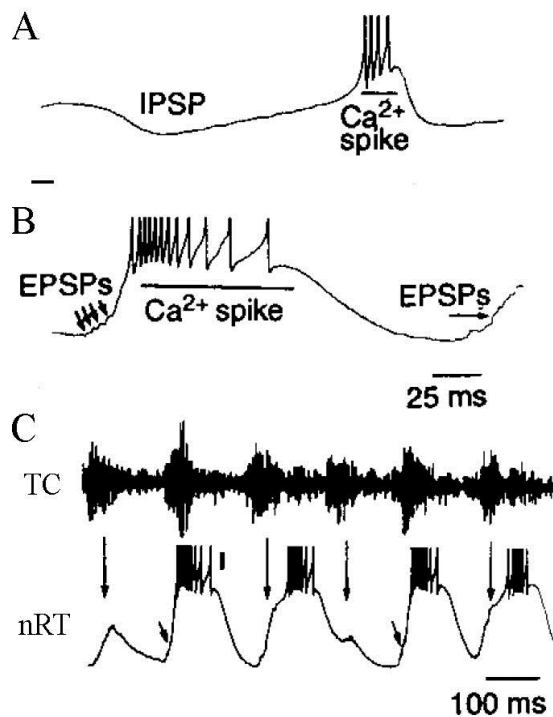
Az EEG aktivitás alapján detektálni lehet az egyes alvás-ébrenléti szinteken jellemző aktivitásokat, amiket az ébrenlét, felületes alvás, illetve mély alvás kategóriákba sorolhatunk. Ébrenlétre a kis amplitúdójú, magas frekvenciás jelek jellemzőek, melyeket az α , β , és γ oszcillációk alkotnak, az aktivitási szintnek megfelelően. Az α oszcilláció 8-12 Hz frekvenciájú aktivitás, általánosan csukott szemű állapotban jelentkezik. A β (12-20 Hz), és γ (30-70 Hz) frekvenciatartományon belüli jelek magasabb éberségi szintekre jellemzőek. Alvás során a felületestől a mély alvás felé haladva az orsó aktivitás (7-14 Hz), a theta (5-9 Hz), valamint a delta (1-4 Hz) hullámok megjelenése figyelhető meg.

6.1 Alvási orsók genezise

Az alvási orsók kialakulásának a már említett burst üzemmód az alapja. Az nRT felől érkező néhány ms-ig tartó gátlás következtében a TC neuronokban egy ún. visszacsapó kisüléssorozat, vagyis burst alakul ki. Eközben a TC sejtek serkentő bemenetet küldenek az nRT felé, aminek szintén egy burst aktivitás lesz az eredménye. Az így kialakuló ping-pong szerű kapcsolat az, ami az orsó oszcillációt kialakítja (**3. ábra**) (von Krosigk és mtsai., 1993).

A talamikus serkentő és gátlósejtekre egyaránt jellemző a T-áram megléte, ami az orsó genezisnek egy fontos komponense. A T-áram feszültség függése eltérő ezekben a sejtekben. A TC neuronok hiperpolarizált, -65 mV nyugalmi membránpotenciál étéken burst módban oszcillálnak, míg az nRT-ban lévő sejtek potenciál függése pozitívabb (>-65mV) membránpotenciál érték felé tolódik. A két sejtípusnak másik különbözősége, hogy amíg a TC sejtekben lévő T-áram aktiválásához egy hiperpolarizált membránpotenciálról aktiválódó vegyes kation áram, vagyis a H-áram szükséges, addig az nRT neuronokban azt egy serkentő bemenet is aktiválni tudja. Egy-egy ciklus terminációja a T-áram inaktivációjával, illetve a membrán

repolarizációjával valósul meg, ami egy újabb ciklus kezdetének adhat alapot (Bal és McCormick 1993, McCormick és Pape 1990).



3.ábra: Orsó oszcilláció kialakulása

Intracelluláris elvezetés a TC (A), illetve az nRT-ban (B) kialakuló burst tüzelésről. C) A TC sejtek (extracelluláris elvezetés) serkentő bementet küldenek az nRT felé, aminek neuronjaiban az így kialakuló EPSP-k hatására (ferde nyíl) szintén létrejön egy burst kisülés (intracelluláris elvezetés). Burst közben az nRT legátolja a TC neuronokat, amiben így egy rebound burst alakul ki. Ez a ping-pong szerű folyamat az, ami az alvási orsókat kialakítja (von Krosigk és mtsai., 1993).

Ezek alapján megérthető, hogy a TC és az nRT neuronok ritmikus interakciója miképpen alakítja ki az alvási orsókat. Az nRT összeköttetései révén gátló posztszinaptikus potenciálok kialakulását indukálja a TC neuronokban, 7-14 Hz frekvenciával gátolja azokat. Elegendő mértékű hiperpolarizáció megindítja a H-áramot, így a sejt depolarizálódik, eléri a T-típusú Ca^{2+} -csatornák küszöb potenciálját, ami a TC neuronokban visszacsapó kisüléssorozatot (burst) eredményez. A TC sejtek szinkron burstje szintén burst tüzelést indukál az nRT neuronokban. Ez több tíz milliszekundumra legátolja a TC sejteket, melynek végén azok egy visszacsapó (rebound) burstot tüzelnek, így újraindítva a ciklust (von Krosigk és mtsai., 1993). A TC sejtek agykérgi vetítése révén az így keletkezett ritmus klasszikus orsóként jelenik meg az agykéregben, illetve az EEG-n.

Ezeket, és más oszcillációkat többnyire tranziens előfordulás jellemez, melyek fontos részét képezik a külvilágból érkező információ feldolgozásának. Habár sok tulajdonság ismert az oszcillációk közbeni mechanizmusokról, arról, hogy mi szabályozza ezek megjelenését, hosszát, illetve mi az, ami megszakítja a folyamatot, ezidáig keveset tudunk.

6.2 Alvási orsók szerepe

Az alvási orsók pontos funkciója mindeddig nem tisztázott. Az általános megjelenéstől való elérések alapján lehet következtetéseket tenni, milyen folyamatokban játszhatnak meghatározott szerepet. Tanulási feladatokat követő éjszaka az orsók hossza és denzitása is megnövekszik, emiatt feltételezhetően jelentős funkciójuk lehet a memóriakonszolidációs folyamatokban (Morin és mtsai., 2008). Számuk szorosan korrelál emellett az általános intelligenciával, valamint összefüggésben lehet a problémamegoldó képességgel is (Bodizs és mtsai., 2005). Megjelenési formájuk a kor előrehaladtával folyamatosan változik, a gyerekek orsói hosszabbak, míg idősebb emebereknél számuk fokozatos csökkenést mutat (Fogel és Smith 2011, Nicolas és mtsai., 2001). Az orsók normálistól eltérő előfordulása különböző patológias állapotokra is jellemző. Skizofrén betegeknél az orsók rövidülnek, és gyakoriságuk is csökken. Ezzel szemben a gyerekkori mentális retardációra az átlagosnál jelentősen hosszabb orsók jellemzőek (Ferrarelli és mtsai., 2007, Gibbs és Gibbs 1962).

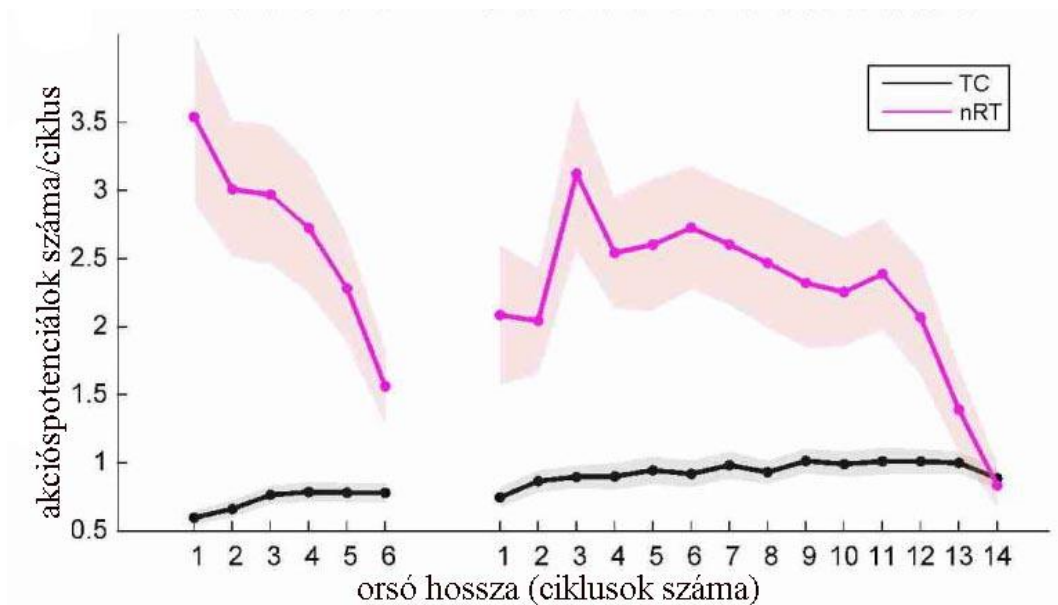
6.3 Alvási orsók terminációja

Az alvási orsók kezdetének illetve terminációjának pontos mechanizmusa, habár léteznek elképzelések, ezidáig nem ismert. Egyes elméletek szerint az orsó oszcilláció a TC, vagy az nRT neuronok intrinsic tulajdonságai miatt szakad félbe. A TC sejtek depolarizációja, illetve a nRT neuronokban a burst után kialakuló elnyújtott utóhiperpolarizáció elegendő lehetne ahhoz, hogy megakadályozza egy újabb burst ciklus létrejöttét, ami az orsók terminációjához vezet (Bal és McCormick 1996, Kim és McCormick 1998, Luthi és mtsai., 1998). Egy másik lehetséges mechanizmusnak a talamokortikális rendszer deszinkronizálódását tartják. Ez azt feltételezi, hogy a kérgi bemenet az, ami a TC és nRT neuronok egymáshoz képesti tüzelését, vagyis az oszcilláció pontosságát fenntartja, így a kérgi szinkronizálás hiánya az orsók végződéséhez vezet (Bonjean és mtsai., 2011).

Barthó és mtsai. reciprok kapcsolatban álló populációk aktivitását vizsgálta az orsó oszcilláció folyamán. Az nRT neuronok esetében eredményeik azt mutatják, hogy rövid (6 ciklus hosszú) orsók alatt az egyes ciklusokban megfigyelt akcióspotenciálok száma az orsó elején magas értékről indul, majd fokozatos csökkenést mutat. Ugyanakkor hosszú (14 ciklus hosszú) orsók kezdetén ez az érték alacsonyabb, az orsó előrehaladtával növekszik, majd az utolsó ciklusokban a kezdeti érték alá esik. Efféle változás a TC neuronok tüzelésében nem található, azok ciklusonkénti akcióspotenciáljának értéke mind rövid, mind hosszú orsók alatt fokozatos növekedést mutat (**4. ábra**). Mindebből az következik, hogy az nRT neuronok aktivitása az, ami az orsók hosszától függetlenül az utolsó ciklusokra lecsökken. Ezen eredmények alapján az orsók terminációja az nRT neuronok hiperpolarizációja végett valósul meg. Azok gátló hatása lecsökken, így nem teszik lehetővé egy újabb burst ciklus kialakulását a TC neuronokban, vagyis az oszcilláció véget ér (Bartho 2014).

6.4 Alvási orsók hossza

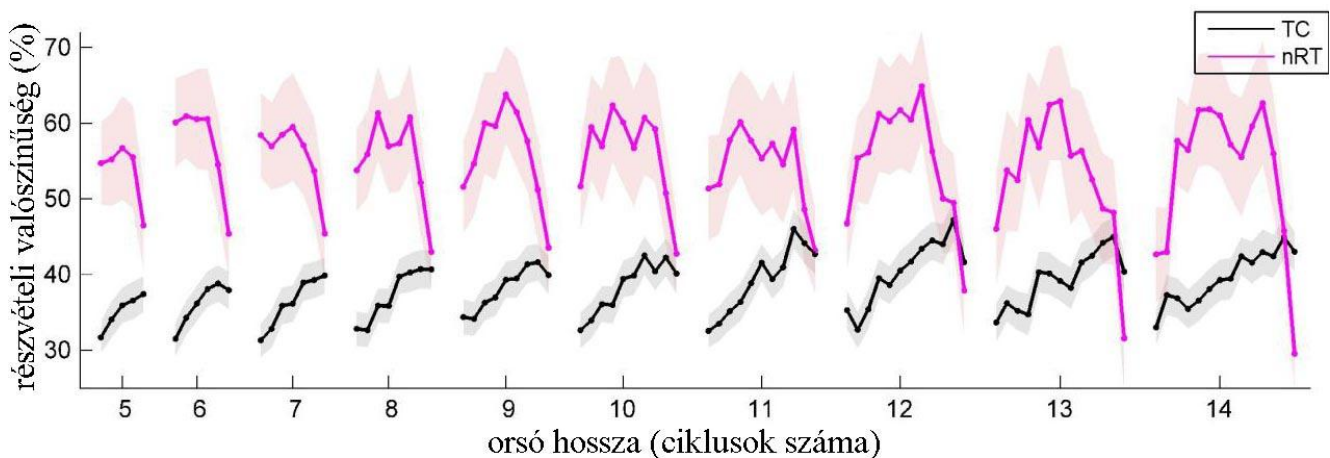
Ahhoz, hogy ezeknek az oszcillációknak a lefolyását megérthessük, az ezeket létrehozó, egymással kapcsolatban lévő populációk vizsgálata elengedhetetlen.



4. ábra: Ciklusonkénti akcióspotenciálok száma az nRT (rózsaszín) és a TC (fekete) neuronok esetében eltérést mutatott. Az egyes pontok az akcióspotenciálok számát jelöli az orsók egyes ciklusaiban, 6 és 14 ciklus hosszú orsókat vizsgálva. Rövid (6 ciklus hosszú) orsók kezdetén magasabb az akcióspotenciálok száma, majd az orsók végére lecsökken. Hosszú (14 ciklus hosszú) orsók kezdetén ez az érték alacsonyabb, majd az akciós potenciálok száma nő, elér egy plató értéket, ezt követően az orsó utolsó ciklusaira a kezdeti érték alá csökken a számuk. A TC neuronok esetében az orsó hosszától függetlenül lassú, de fokozatos növekedés található az ciklusonkénti akcióspotenciálok számában. (Bartho 2014).

Csoportunk korábbi kísérleteiben egyidejűleg elvezetett nRT, illetve az ezzel reciprok kapcsolatban álló TC neuronok aktivitását vizsgálta az orsó oszcilláció során, hogy ezek ciklusról ciklusra történő változása követhetővé váljon. Szoros összefüggést tapasztaltak az orsók hossza és az ebben részt vevő nRT populáció mérete között. Különböző lefutás mutatkozott a rövid, illetve hosszú orsók folyamán a populációk részvételi valószínűségében. Megjegyzendő, hogy egy sejt egy ciklusban csupán egy burstöt tüzel, illetve az egyes neuronok nem minden ciklus alatt tüzelnek. A részvételi valószínűség megadja azt az értéket, hogy milyen százalékban tüzelnek a sejtek az egyes ciklusokban. A rövid orsók magasabb nRT részvételi valószínűséggel indultak, míg a hosszú orsók alacsonyabbal. Az orsók utolsó ciklusaiban minden esetben a kezdeti érték alá esett az aktív populáció mérete, ami további bizonyítékul szolgál az előzőekben felvetett hipotézisnek az orsó terminációját illetően, miszerint az nRT hiperpolarizációja az, ami

az oszcillációt terminálja. Emellett az első és az utolsó ciklusban részt vevő nRT populáció mérete is szoros korrelációt mutatott (5. ábra). Mindez azt feltételezi, hogy az orsók hosszát azok kezdetén résztvevő nRT populáció mérete határozhatja meg, ami megszabja az oszcilláció előre meghatározott kezdeti és végpontja közötti lefutását. Az orsók hosszát két lehetséges mechanizmus alakíthatja ki. Egyrészt az nRT populáció mérete közvetlenül meghatározó lehet, másrészt a hálózat aktuális állapota lehet az, ami az nRT populáció méretén keresztül határozza meg az orsók hosszát (Bartho 2014).



5. ábra: Az nRT neuronok részvételi valószínűsége az orsók hosszától függően eltérést mutat.

Az nRT és a TC sejtek ciklusról-ciklusra vizsgált részvételi valószínűsége különböző hosszúságú (5-14 ciklus hosszú) orsók esetén. A TC sejtek részvételi valószínűsége (fekete) az orsó hosszától függetlenül fokozatosan növekszik. Ezzel szemben az nRT részvételi valószínűsége eltérő rövid illetve hosszú orsók folyamán. Rövid orsók magasabb részvételi valószínűséggel, míg hosszú orsók alacsonyabban indulnak, valamint az utolsó ciklusokban minden esetben a kezdeti érték alá esik ez az érték. A pontok a cilusonkénti részvételi valószínűséget jelölik (Bartho 2014).

6.5 Neuronpopulációk szelektív aktiválása - Channelrhodopszin

A neuronpopulációk mérete és a kialakult oszcillációk paraméterei közötti összefüggés vizsgálatának egyik módja a különböző méretű populációk aktiválásával lehetséges. A neuronok

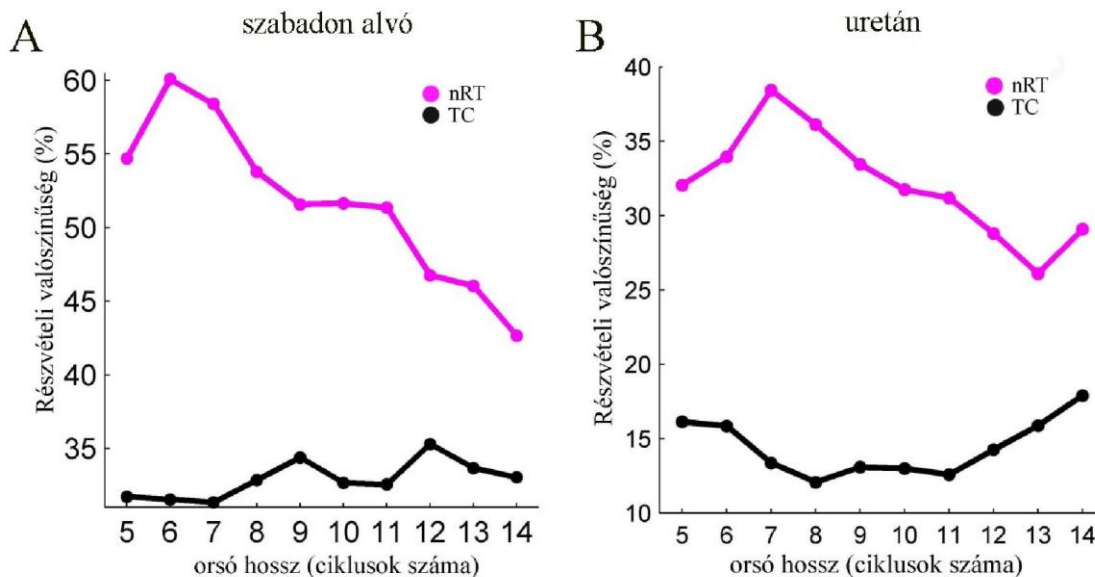
aktiválását korábban elektromos stimulálással végezték. Ez a megoldás ugyan terület szelektív, de nem specifikus adott sejtpopulációkra. A problémát egy az elmúlt 10 évben felfedezett fényérzékeny fehérje, a channelrodopszin (Chr) hidalta át, ami fény hatására konformáció változással reagál (Nagel és mtsai., 2002, Nagel és mtsai., 2003). A Chr egy nem specifikus kation csatorna, ami kék fénnel való megvilágítás hatására megnyílik, ionáteresztő képessége megnő, ami a sejtet depolarizálja. A Chr-t szelektíven expresszáltatva adott sejtpopulációkban, így az nRT neuronokban is lehetőség nyílik azok specifikus aktiválására (Williams és Deisseroth 2013).

Néhány évvel ezelőtt Halassa és Moore vGAT-Chr transzgenikus egerek nRT neuronjait stimulálva alvási orsókat váltott ki (Halassa és mtsai., 2011). Ebben az egérvonalban a Chr-eYFP a vezikuláris GABA transzporter gén promótere által meghajtva expresszálódik, lehetővé téve a GABA-erg neuronok szelektív targetálását. Ugyanilyen működési elven alapszanak a PV-Chr egérvonalak is, ahol a Chr a PV gén promótere után található. Vagyis azok kizárólag PV immunpozitív neuronokban íródnak át, ami az nRT sejteit is jellemzi (Zhao és mtsai., 2011). A Chr-hoz kötött fluoreszcens fehérje, az eYFP a sejtek anatómiai behatárolását is lehetővé teszi.

7 CÉLKITŰZÉSEK

Korábbi eredményekből kiindulva az nRT kezdeti aktivitási szintje negatívan korrelál az alvási orsók hosszával (burst ciklusok számával) a talamuszban. Vagyis hosszabb, tehát több ciklusból álló orsók esetében alacsony, míg rövidebb, kevesebb ciklusból álló orsók alatt magasabb az nRT populáció részvételi valószínűsége az orsók 1. ciklusában (Barthó és mtsai. 2014) (**6. ábra**). Azt, hogy mi okozza a hosszbeli varianciát a neuronpopulációk szintjén, ezidáig nem tudjuk. A kezdeti állapot és az orsók hossza közötti összefüggés arra enged következtetni, hogy az orsók hosszát a retikuláris és TC sejtek hálózati állapota előre meghatározza, illetve a résztvevő nRT sejtek száma is determinálhatja az oszcilláció hosszát. Abban az esetben, ha ez utóbbi hipotézis a valós, különböző méretű nRT populációk aktiválásával eltérő hosszúságú orsókat lehetne kiváltani. Azonban ha ilyen fajta összefüggés nem tapasztalható, valószínűsíthetően a hálózati állapot az, ami az aktivált nRT populáció méretének változtatásán keresztül meghatározó az oszcilláció hosszát illetően. Ahhoz, hogy erre választ kaphassunk, az alábbi célokat tűztük ki:

- Megvizsgáljuk, kiválthatóak-e alvási orsók a talamusz VPM magjában az nRT optogenetikai stimulálásának hatására, valamint azok hasonlóságát a spontán módon megjelenő orsókkal.
- Megvizsgáljuk, az orsók kiválthatósága milyen mértékben korlátozódik azokra a periódusokra, amikor a spontán orsók is megjelennek, vagyis a hálózat aktuális hatását.
- A fényimpulzus intenzitását, illetve időtartamát változtatva vizsgáljuk különböző méretű nRT populációk aktiválásának hatását az orsók hosszúságára.



6. ábra: Az nRT neuronok részvételi valószínűsége függ az orsók hosszától

Az alvási orsók első ciklusában az nRT neuronok részvételi valószínűsége negatívan korrelál az orsók hosszával. Rövid orsók esetében magas az nRT részvételi valószínűsége, míg alacsonyabb részvételi valószínűség hosszú orsóknál figyelhető meg mind szabadon alvó (A), mind uretán altatás (B) esetén, míg a talamokortikális (TC) neuronok nem mutatnak efféle összefüggést (Bartho 2014).

8 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A kísérleteket pval/IRES-cre//Gt(ROSA)26Sor/CAG/chr2(H134R)/eyfp (PV-Chr), és vGAT/IRES-cre//Gt(ROSA)26Sor/CAG/chr2(H134R)eyfp (vGAT-Chr) egér vonalakon végeztük. Minden kísérletet az Európai Unió előírása, a Magyar Tudományos Akadémia Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet etikai előírásai szerint és az Etikai Bizottság engedélyével hajtottunk végre.

A transzgenikus egereket Gt(ROSA)26Sor/CAG/chr2(H134R)/eyfp és vGat/IRES-cre és illetve pval/IRES-cre vonalak keresztezésével állították elő. Lényege ennek a keresztezésnek az, hogy a fúziós gén (chr2-eyfp) átíródását egy loxP-vel határolt stop jel gátolja meg mindaddig, amíg a Cre rekombináz hatására a stop jel deléciójának nem esik alá. Ettől kezdve a Cre expresszálnó sejtekben megindulhat a fúziós protein transzkripciója. Nevezetesen a vGAT illetve a PV pozitív sejtekben (Cre rekombinázt expresszálnak) kifejeződik a Chr2-eYFP fúziós protein, ami kívül a sejtek membránjába, majd a továbbiakban kék lézerstimulus hatására a Chr2 képes lesz konformáció változtatásra.

Az altatáshoz minden esetben uretánt használtunk (0,012g/100g testtömeg). Az elektrofiziológiai elvezetések 32 csatornás, 4 ágú oktród, vagy 2x16 csatornás lineáris szilikon alapú elektródokkal történtek (Neuronexustech, MA). Az első elektródtípusnál egyes ágak között 200 µm a távolság, valamint minden elektróda ágon 8 mérőpont található (oktród), egymástól 20-20 µm távolságra, a másodikonál a szárok közti távolság 500 µm, az elvezetési pontok közti 100 µm. Az elvezetési koordináták a VPM területén: anteroposzterior (AP) -1,7-1,8 mm, mediolaterálisan (ML) 1,2-2 mm, dorzoventrálisan (DV) 3,2-4 mm voltak. Az nRT területén (koordináták: AP -1,4-1,6 mm, ML 2,2-2,5 mm, DV 3-4 mm) a neuronok számáját optogenetikai módszerrel 100 µm vastag optikai szállal (Thorlabs, DE) 447 nm hullámhosszú kék fénnnyel stimuláltuk. A elektródot és az optikai szálat Dii membránfestékbe mártottuk, hogy az elektród és a fiber tényleges helyét a későbbiekben rekonstruálni tudjuk.

Az elvezetéseket 64 csatornás erősítőn (2000x gain 0,3 Hz felüláteresztő szűrő) végeztük, a jelet 20 kHz frekvenciával digitalizáltuk (National Instruments). Az összes analízis

MATLAB-ban (Mathworks, CA) történt. A soksejt aktivitást (MUA) 500-7000 Hz között detektáltuk.

Az alvási orsók detekciójához kontinuizált MUA-t használtuk, nevezetesen az akciós potenciálokat 11 ms hosszú Hamming ablakkal konvolváltuk, a keletkezett jelet 7-20 Hz között megszürtük, és erre burkológörbét illesztettünk. A küszöbértékeket meghaladó ($2\text{ SD} > 100\text{ ms}$ és $1\text{ SD} > 300\text{ ms}$) aktivitást orsóként detektáltuk.

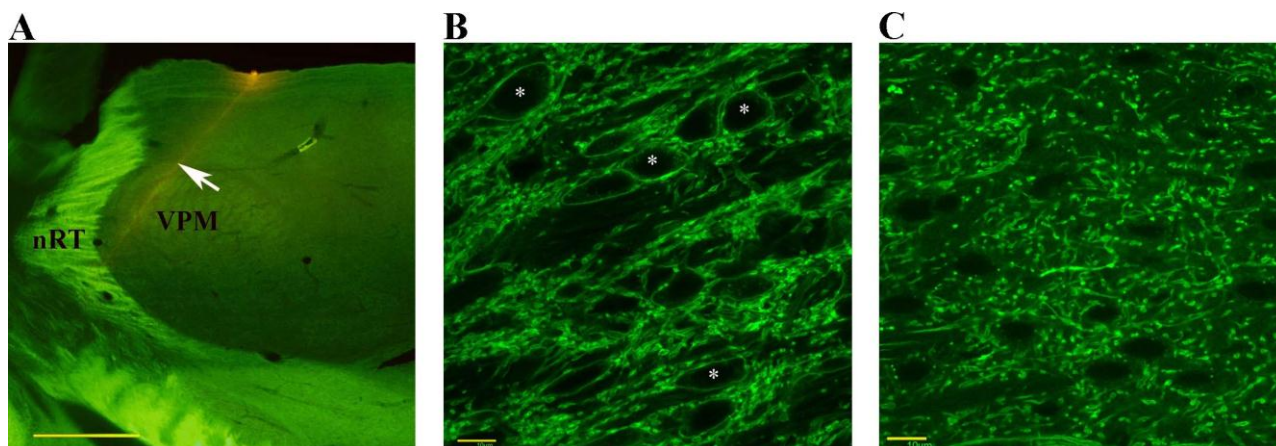
Az elvezetést követően az állatokat megperfundáltuk. A perfúziót 200 ml 4% paraformaldehidet, 0,05 % glutáraldehidet és 0,2 M foszfát puffert tartalmazó fixálóval transzkardiálisan végeztük. A perfúzió után az agyat posztfixáltuk, majd a talamuszt tartalmazó blokkból vibrotómmal 60 μm -es koronális metszeteket készítettünk. Ezt követően foszfát pufferrel többször mostuk a metszeteket, majd vectashield fedőanyagot használva felhúztuk azokat.

9 EREDMÉNYEK

Az elvezetések sok csatornás szilikon alapú elektródákkal végeztük. Ez az elvezetési mód lehetőséget ad arra, hogy sok sejt szimultán aktivitása követhetővé váljon. Mivel az elektróda egyes ágain az elvezetési pontok közel helyezkednek el egymáshoz (8,5-30 μm), az egyes sejtek tüzelési aktivitása több mérőponton megjelenik, így azok megbízhatóan szétválaszthatóvá válnak az egyedi akciós potenciál alakok következtében. Emellett az elektróda ágainak kis átmérője miatt (15 μm) minimalizálódik az agyszövetet ért károsodás is (Csicsvari és mtsai., 2003).

A kísérletek uretán altatás alatt történtek, mivel ez az altatási forma megengedi az orsók összehasonlítását a természetes alvás során kialakuló orsókkal. Az orsók átlagos hossza (10.7 ± 6.0 ciklus/orsó természetes alvás során, 9.5 ± 5.3 ciklus/orsó uretán altatás alatt), illetve azok frekvenciája (12.65 ± 1.89 Hz természetes alvás esetén, 12.91 ± 1.63 Hz uretán altatásban) hasonlóan alakul mindkét állapotban. Másik fontos tulajdonsága ennek az altatónak, hogy a kiindulási eredményekhez hasonlóan uretán altatás alatt is megfigyelhető az orsók hossza és az nRT kezdeti populációs aktivitása közötti negatív korreláció (**6.B ábra**). Ezek mellett megengedi, hogy az alvás szakaszai közötti váltakozásokat vizsgáljuk, mivel periodikusan az ébrenlétet mimikáló (deszinkronizált kérgi aktivitás) és a mély alvás (szinkronizált aktivitás) között váltakozik az altatás mélysége, hasonlóan a természetes alvás során tapasztaltakhoz. Deszinkronizált állapotban mind a kéregben, mind a talamuszban jellegzetes tonikus sejtaktivitás volt megfigyelhető, amiket kis amplitúdójú, magas frekvenciás jelek jellemeznek. Ilyenkor a talamusz sejtjei relatíve depolarizáltak (-50 mV körül), és egyedi akciós potenciálokat tüzelnek. Ezzel szemben a teljesen szinkronizált állapotra jellemző lassú hullámú aktivitás alatt nagy amplitúdójú, alacsony frekvenciás jelek keletkeznek. Ekkor a talamikus sejtek hiperpolarizáltak (-60 mV alatt), és visszacsapó kisüléssorozatok (burst) produkálnak. A spontán orsók megjelenése az enyhén szinkronizált szakaszokra jellemző, ami a természetes alvás 2. stádiumával analóg, vagyis ebben a szakaszban jelentkeznek az alvási orsók.

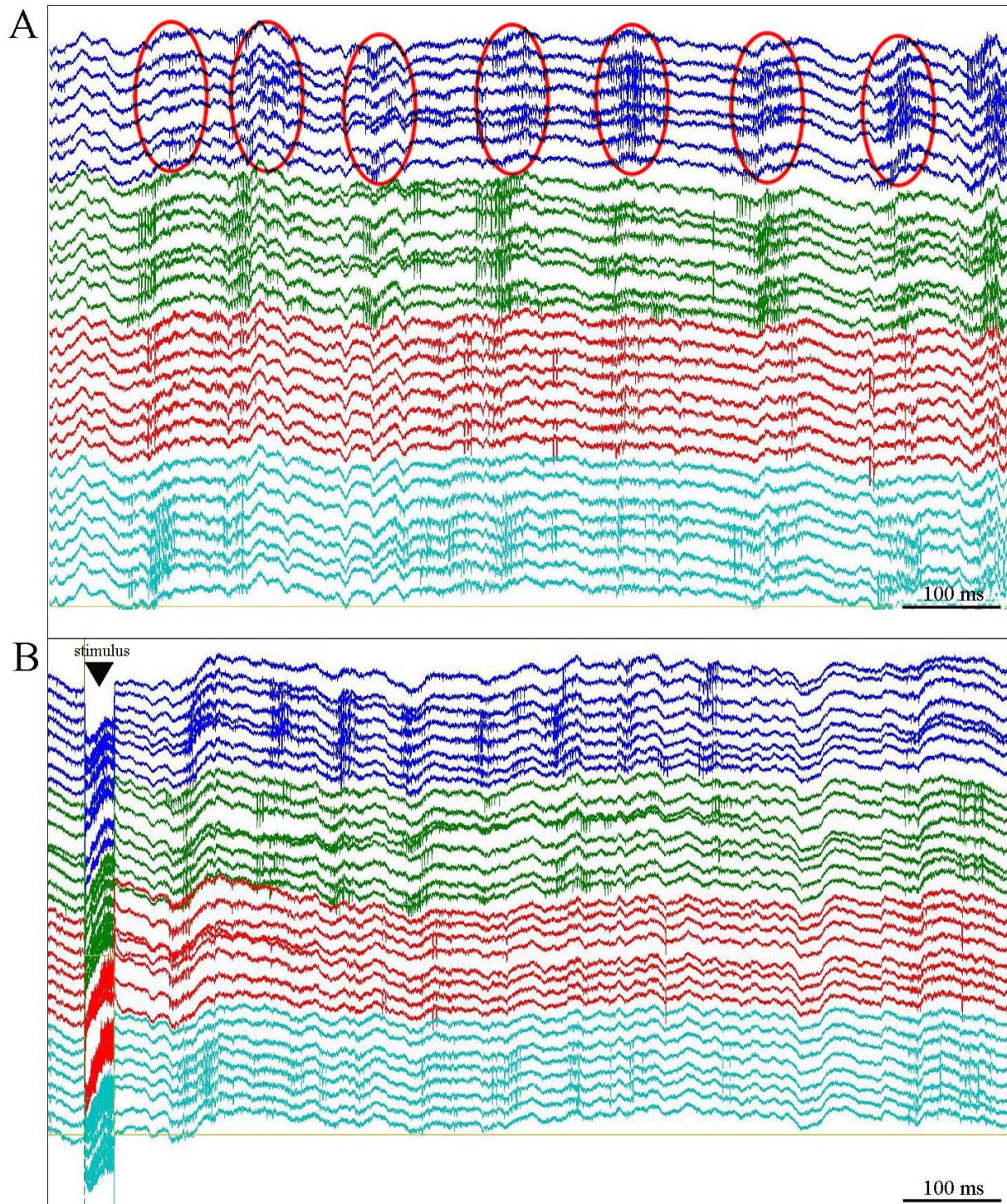
A kísérletekhez vezikuláris-GABA-transzporter-channelrhodopszin (vGAT-ChR, 9 állat, 17 kísérlet), illetve parvalbumin-channelrhodopszin (PV-ChR) (3 állat, 8 kísérlet) egereket használtunk. Ezekben az állatokban az nRT sejttestjei és axonterminálisai egyaránt kifejezik a Chr-t, így kék fénnel aktiválhatóvá válnak. A kísérletek egy részében közvetlenül az nRT szómáját stimuláltuk (n=10), a többi esetben az optikai szál az elvezető elektródához rögzítve, a környéki axonterminálisokat célozta a VPM-ben (n=15) (**7. ábra**). A spontán orsók mellett (**8.A ábra**) Halassa és Moore (2011) eredményeivel párhuzamban, az nRT-t érő fénystimulus hatására is sikerült orsókat kiváltani a VPM-ben (**8.B ábra**). Az eredmények mindkét állattörzsben, illetve stimulációs felállásban konzisztensek voltak.



7. ábra: vGAT-Chr2 egér agyából készült koronális metszetek (60µm).

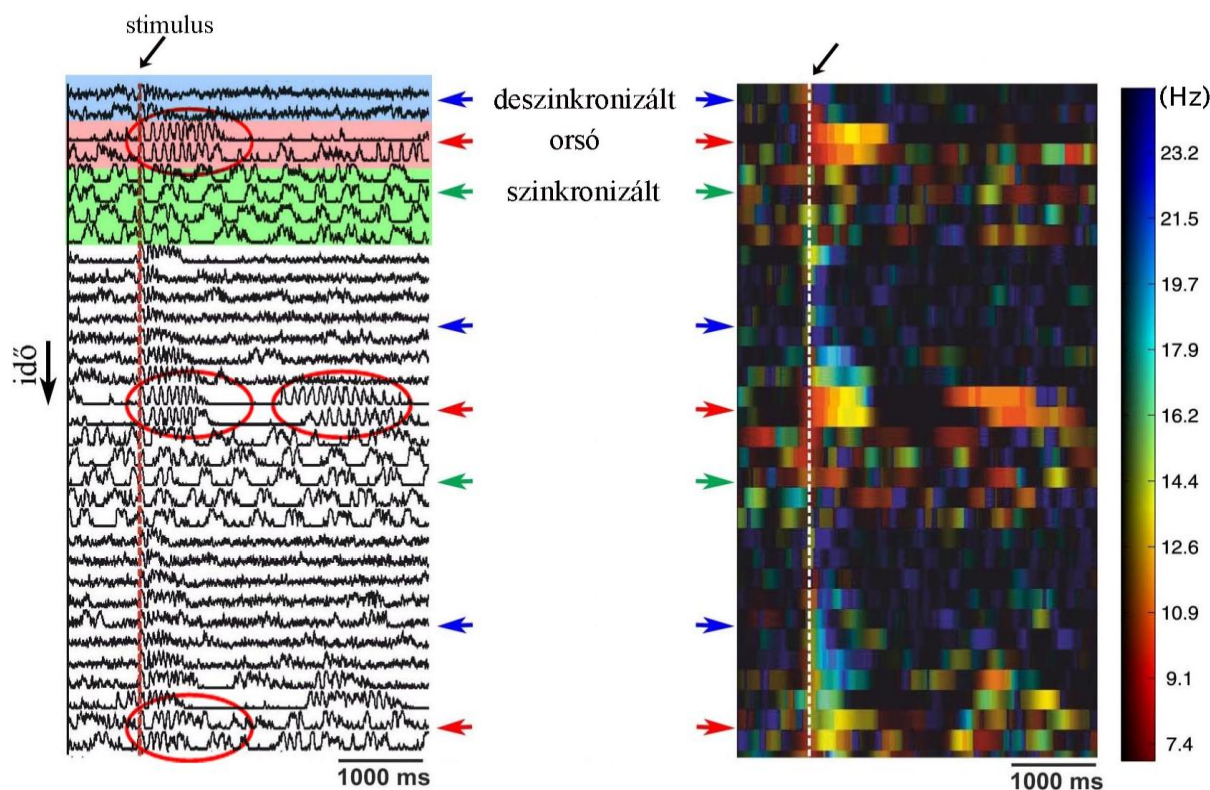
(A) Az nRT-n belül a sejtek szomatodendritikus régiója (B, fehér csillagok), ill. a VPM-be nyúló axonterminálisok (C) is Chr2 pozitivitást mutatnak. Az elektródákat Dii fluoreszcens membránfestékbe mártva helyeztük a talamuszba. A fehér nyíl az elektróda egyik ága által hagyott jelre mutatnak (piros).

Az orsók kiválthatósága erősen függött az altatás aktuális mélységétől (**9. ábra**). A stimulus sem teljesen szinkronizált, sem deszinkronizált állapotban nem váltott ki orsót. Ezzel szemben az enyhén szinkronizált szakaszokban mind a spontán, mind a kiváltott orsó aktivitása gyakori volt, tehát azok megjelenése a hálózat egy adott állapotához kötött. Egy-egy alvási ciklus 5-10 percig tartott, amin belül az egyes stádiumok ciklikusan követték egymást. Az orsók jellemzői az



8. ábra: Spontán és fénystimulussal kiváltott orsók nyers elvezetése

Spontán orsók elvezetése a VPM-ből. A kék, zöld, piros és világoskék színek a talamuszba érő 4 ági elektróda egy-egy ágát reprezentálják. Mindegyik ágon 8 db elvezető pont van, ezért összesen 32 csatorna elvezetését látjuk. (A) Spontán megjelenő orsók a talamuszban. Az egyik elvezető ágon az orsók ciklusait a piros ellipszisek jelölik. (B) Optikai stimulus (fekete háromszög) hatására kiváltott orsók elvezetése.



9. ábra: Alvási orsók kiválthatósága függ a hálózat állapotától

A) Talamikus retikuláris mag (nRT) optogenetikai stimulálásával kiváltott soksejt-aktivitás (MUA) a talamusz VPM magjában uretán altatás alatt. A stimulusok (piros függőleges vonal) 5 másodpercenként követik egymást. A rendszer spontán fluktuál szinkronizált (zöld nyilak) és deszinkronizált (kék nyilak) állapot között. A stimuláció csak az altatási ciklus bizonyos pontjain, enyhén szinkronizált szakaszban (piros nyilak) képes orsókat kiváltani (piros ellipszis). B) MUA domináns frekvenciája 7-23 Hz között. A kiváltott orsókat a melegebb színek jelölik, mind a hosszuk, mind a frekvenciájuk változik az állapot függvényében.

enyhén szinkronizált szakaszon belül is variáltak, a deszinkronizáltabb szakaszoktól a szinkronizáltabb felé haladva frekvenciájuk csökkent, hosszuk megnőtt (9. A,B ábra).

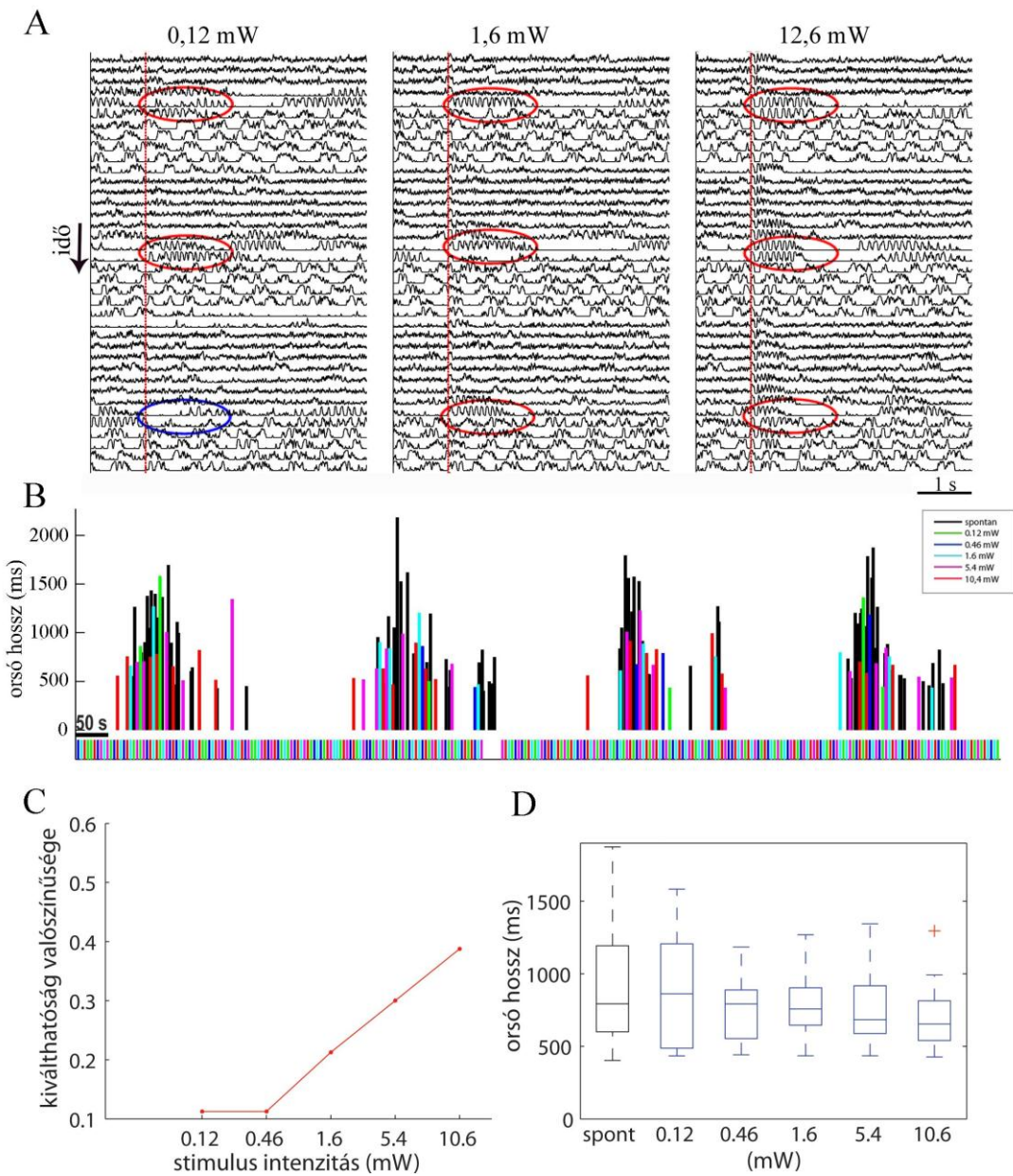
Kiindulási hipotézisünk szerint különböző méretű nRT populációk aktiválása az orsók hosszának változásában nyilvánulhat meg. Optogenetikai eszközökkel ezt kétféleképpen lehet elérni: a stimulus intenzitásának, illetve időtartamának változtatásával. A stimulus erősségét növelve több Chr fehérjében, valamint nagyobb számú nRT neuronban érhető el egy küszöb feletti aktivitási szint, ami több csatorna megnyílását, és a sejtek kisülését eredményezi. Emellett

a fény térbeli kiterjedése is változtatható ezzel a módszerrel. Tehát a kiindulási eredmények alapján a fény intenzitását emelve (0.1-10 mW, 10ms, n=14) (**10. ábra**) nagyobb méretű nRT populációt aktiválunk, ami rövidebb orsókat eredményez. Az orsók hossza a fényimpulzus hosszának növelésével (2-40 ms, 5,4mW, n=11) (**11. ábra**) is változhat. Hosszabb ideig tartó megvilágítás növeli a csatornák nyitvatartási idejét, így több kation áramlik a sejt belsejébe, ami a sejtek kisülését teszi lehetővé. Nagyobb teret enged az nRT neuronok recruitálódásának is, mivel az így szétterjedő aktivitás egyre nagyobb méretű nRT populációt von bele az oszcillációba, így az alvási orsók hossza lecsökken. Ezekkel az eszközökkel manipulálhatóvá válik az aktivált populáció mérete, vagyis ennek tényleges hatása az orsók hosszára vizsgálhatóvá válik.

A fénystimulus paramétereit változtatva az orsók kiválthatósága függött az altatás mélységétől, vagyis azokra a szakaszokra korlátozódott, amikor azok spontán módon is előfordultak (**10. A, B ábra; 11. B ábra**). Az enyhén szinkronizált állapotban mind a spontán, mind a kiváltott orsók hosszában gyenge komoduláció mutatkozott (**10. B ábra**), azok hasonlóképpen váltakoztak az adott szakaszon belül ($R=0.21$, $p<0.001$). Ezekben a periódusokban a leggyengébb stimulusok ritkán indukáltak orsót (**10.A ábra, bal panel**), az ennél nagyobb fényimpulzusok viszont ki tudtak váltani orsókat. Ugyanakkor teljesen szinkronizált, vagy deszinkronizált állapotban maximális intenzitású stimuláció sem volt hatásos. Ezenfelül a maximális intenzitás hatására közvetlenül az orsózó szakaszok előtt a deszinkronizált stádiumban, illetve utána, a szinkronizált szakaszok kezdetén is előfordultak kiváltott orsók (**10.B ábra, piros oszlop**). Ennél a stimulus paraméternél az enyhén szinkronizált szakaszokon kívül egy β -frekvenciájú oszcilláció volt megfigyelhető. Az orsók kiválthatóságának valószínűsége 0% és 56% között ingadozott, növekedett mind a stimulus intenzitásának (**10.C ábra**), mind időtartamának növelésével (**11.B ábra**). Ezek alapján arra következtettünk, hogy az alkalmazott stimulus paraméterek hatására változtatni lehetett az aktivált nRT populáció méretét.

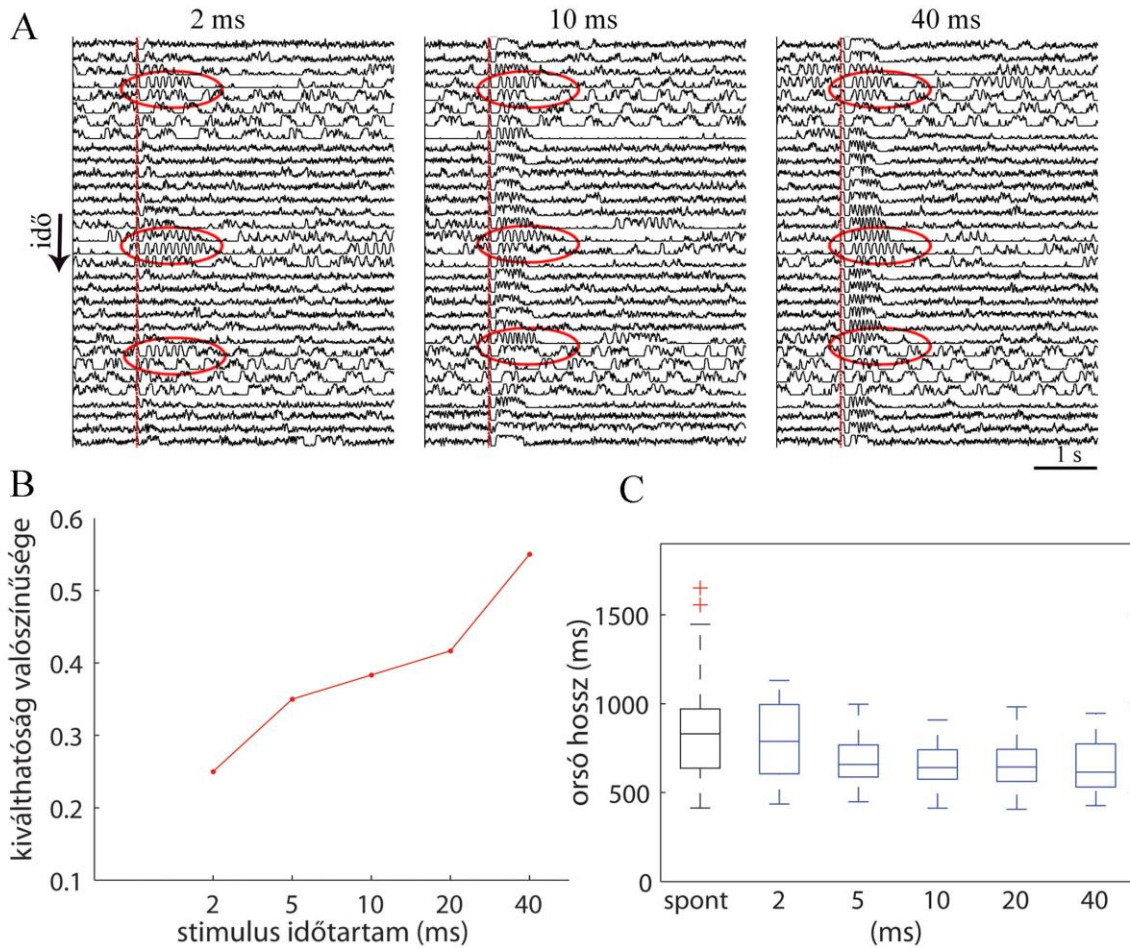
Amennyiben az orsók hosszát közvetlenül az nRT populáció mérete határozná meg, úgy a különböző stimulusok hatására módosuló nRT populáció mérete az orsók hosszának változását idézné elő. Ezzel szemben 24-ből 20 kísérletben nem találtunk szignifikáns különbséget az orsók hosszában a különböző stimulussal kiváltott csoportok között, valamint a spontán orsókhöz képest sem kaptunk szignifikáns különbség ($p>0.05$, Kruskal-Wallis teszt) (**10.D ábra, 11.C ábra**). A fennmaradó 4 kísérletben az eredmények nem voltak konzisztensek,

a csoportok között több irányban gyenge korreláció mutatkozott. A stimulus paramétereit (0.14 mW, 4.4 mW, 10.5 mW, 1200 ismétlés) és az elvezetési koordinátákat 4 állatban azonos körülmények között tartottuk, hogy egy összesített adathalmazt kaphassunk, azonban ezen belül sem találtunk szignifikáns különbséget (Kruskal Wallis teszt, $p=0.11$) a különböző intenzitásokkal kiváltott orsók között. Mindez azt mutatja, hogy a stimulus intenzitása nem közvetlenül határozza meg az orsók hosszát, feltehetően a hálózati állapotok folyamatos fluktuációja az, ami meghatározó. Habár a spontán és a kiváltott orsók hossza az adott szakaszon belül hasonlóképpen váltakozott, azok eloszlásában különbség mutatkozott. A kísérletek 41,6%-ában (24-ből 10 kísérletben) szignifikáns különbséget figyeltünk meg (Mann-Whitney teszt) (**12. ábra**), a kiváltott orsók száma főként a hosszeloszlás két végén volt kevesebb. Feltehetően ezeknek a létrejöttéhez precízen kialakított populációs mechanizmusok társulnak, amit a fény indukálta aktivitásokkal nem lehet kellő pontossággal utánozni.



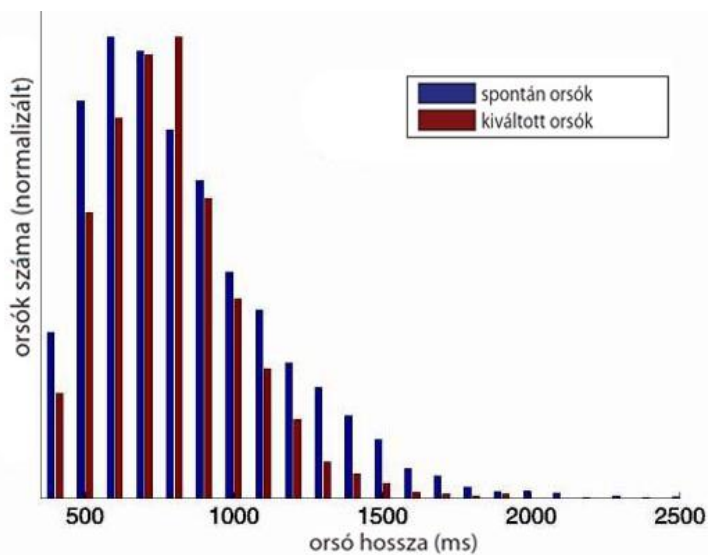
10. ábra: A kiváltott orsók hossza független a stimulus intenzitástól

A) Három különféle stimulus erősséggel (0.12, 1.6, 12.6 mW; 10 ms) kiváltott MUA aktivitás az elektróda egyik ágán. A fényimpulzusok 5 másodpercenként követték egymást, a függőleges szaggatott vonalak mutatják a stimulus időpontját. A 0.12 mW stimuláció többnyire nem éri el az orsók kiváltásához szükséges küszöböt (kék ellipszis), az ennél magasabb intenzitások az enyhén szinkronizált állapotban többnyire ki tudtak váltani orsót (piros ellipszis). **B)** A kiváltott orsók hossza az idő és a stimulus intenzitás függvényében (fekete: spontán orsók). A kiváltott és a spontán orsók együtt jelentkeztek, ezeken az orsózó szakaszokon belül az orsók hossza nagyfokú variációt mutatott. **C)** A stimulus intenzitást növelve növekedett az orsók kiválthatóságának valószínűsége. **D)** Spontán, illetve különböző intenzitásokkal kiváltott orsók hossza dobozdiagramon. A különböző csoportok között nincs szignifikáns különbség.



11. ábra: A kiváltott orsók hossza független a stimulus időtartamától

A) Mint az 5. ábra, intenzitás helyett különböző hosszúságú stimulusokkal (2, 10, 40 ms; 6 mW). **B)** Az optikai stimulus hosszának növelésével nőtt az orsók kiválthatóságának valószínűsége, **C)** viszont az orsók hosszában itt sincs szignifikáns különbség az egyes csoportok között.



12. ábra: Spontán és kiváltott orsók hosszának eloszlása.

A rövid (600 ms-nál kevesebb), illetve hosszú (1100 ms-nál hosszabb) orsók száma nagyobb a spontán esetben, mint a kiváltott orsóké, a kísérletek összesített adatai alapján.

10 DISZKUSSZIÓ

Az alvási orsók iniciációjáról, frekvenciájának alakulásáról illetve hosszáról ezidáig kevés információ áll rendelkezésünkre. Az orsók hosszának vizsgálata során csoportunk azt az eredményt kapta, hogy az orsók kezdetén aktiválódott nRT populáció mérete negatívan korrelál az orsók hosszával. Vagyis az orsó első ciklusában megfigyelt kis nRT populációs aktivitás a hosszú, míg nagy nRT populációs aktivitás a rövid orsókra jellemző (Barthó és mtsai., 2014). Ennek hátterében két lehetséges mechanizmus állhat: az aktív nRT sejtek száma közvetlenül határozza meg az oszcilláció hosszát, vagy az nRT populáció mérete, így az orsók hossza a hálózat aktuális állapotának a függvénye.

Kísérleteinkben optogenetikai stimulálással különböző méretű nRT populációkat aktiváltunk, hogy megvizsgáljuk azok hatását a kialakuló orsók hosszára. Az aktivált populáció méretét a fény intenzitásának, valamint időtartamának növelésével érték el. Azt feltételezzük, hogy az erősebb stimulus nagyobb területet aktivál, valamint a neuronok membránjában expresszálandó Chr fehérjék is nagyobb számban nyílnak ki, tehát több sejt depolarizációját érhetjük el így. A fény időtartamát változtatva pedig az aktivált neuronok rekrutálódásának következtében változó méretű populáció aktiválódhat, tehát rövidebb stimulus kisebb, míg hosszabb stimulus nagyobb populációt aktivál.

Az optogenetikai stimuláció több szempontból is előnyösnek bizonyult. Ezzel a módszerrel kellő mértékű szelektivitást lehet elérni, mivel csak azok a neuronok aktiválódnak, amik kifejezik a Chr-t, esetünkben a PV és vGAT immunpozitív neuronok. Emellett az nRT-n áthaladó talamokortikális és kortikotalamikus rostok nem kívánatos aktiválása is kiküszöbölhetővé válik. A fénystimulus intenzitását változtatva nem csupán az optikai fiber közvetlen közelében lehetséges az aktiváció, hanem a fény terjedése révén változtatható a megvilágított terület mérete is.

A fénystimuláció által kiváltott orsók hossza nem mutatott szignifikáns változást a stimulus paramétereinek hatására, sem az egyes stimulusok között, sem a spontán megjelenő orsókhoz képest. Mind a kiváltott, mind a spontán orsók egy hálózati állapothoz, az enyhén szinkronizált szakaszokhoz kötötten jelentkeztek. Ezekben a periódusokban a leggyengébb stimulusok ritkán indukáltak orsót. Feltehetően ezek a küszöb alatti intenzitások nem voltak elégségesek kellő számú nRT sejt aktiválásához, illetve Chr csatorna megnyílásához, így az nRT

neuronokba áramló pozitív ionok szintje nem érte el azt az értéket, hogy létrehozzanak egy kellő mértékű depolarizációt, így egy burst kisüléssorozatot. Küszöb feletti intenzitással stimulálva már elegendő mértékben depolarizálódhattak a sejtek egy orsó oszcilláció beindításához. Meglepő módon a legerősebb fényimpulzusok a spontán megjelenő orsók előtt, illetve közvetlenül az orsózó szakasz után is képesek voltak orsókat indukálni. Ezekben az időszakokban a neuronok intrinsic tulajdonságai nem teszik lehetővé, hogy a két populációban megfelelő ritmusú reciprok burst kisülést generáljanak, azonban egy kellően erős külső behatás elegendő lehet ahhoz, hogy egy gyors kisüléssorozatot indukálhasson. Mivel a legnagyobb intenzitású fényimpulzus az orsózó szakaszokon kívül is egy afiziológiás β -frekvenciájú oszcillációt idézett elő, valószínűsítjük, hogy ezekben az esetekben is a fényimpulzus hatását látjuk. Növelve a stimulus időtartamát, vagy az erősségét az orsók kiválthatóságának valószínűsége is növekedett. Ez feltehetően a fényérzékeny csatornák nyitási valószínűségének és nyitvartási idejének növelése végett valósult meg.

Amennyiben közvetlenül az aktiválódott nRT populáció mérete elegendő volna ahhoz, hogy meghatározza az orsók hosszát, akkor a fénystimulus paramétereit növelve az orsók rövidülését kellene tapasztalnunk. Mivel ilyen összefüggést nem figyeltünk meg, valószínűsítjük, hogy nem az aktivált nRT populáció mérete határozza meg direkt módon az orsók hosszát. A hálózat aktuális állapota lehet az, ami megszabja azt az nRT populáció méretet, amiben minden feltétel adott az orsó generálásához. Ezt alátámasztja az is, hogy a spontán megjelenő, illetve a stimulusok hatására kiváltott orsók hosszában komoduláció mutatkozott az orsózó szakaszokon belül. Tahát a hálózati állapotok az nRT populáció méretén keresztül határozzák meg az orsók hosszát.

Mi állhat a különböző hálózati állapotok hátterében? Feltehetőleg a kortikotalamikus hatások, illetve a modulátorok szintjének (acetilkolin, noradrenalin) fluktuációja meghatározó. Ez utóbbi esetben a modulátor hatású anyagok a leaky K^+ -áramok befolyásolásával szabályozzák a talamikus sejtek membránpotenciálját. Deszinkronizált stádiumban a VPM neuronjainak nyugalmi membránpotenciál értéke pozitív irányba tolódik el, emiatt történhet, hogy az nRT felől érkező gátló bemenet nem elegendő a T-típusú Ca^{2+} -csatornák aktiválásához, így visszacsapó kisüléssorozat sem alakul ki bennük. Enyhén szinkronizált aktivitás során a VPM-be érkező inhibitorikus hatás a nyugalmi potenciál csökkenése következtében megfelelően nagy lehet a T-áram aktiválásához, burst kisülést eredményezve. Ezt követően a TC neuronok serkentő

bemenetet küldenek az nRT felé, tovább folytatva ezt a ping-pong szerű folyamatot. Mély altatásban viszont a membránpotenciál túl alacsony lehet a visszacsapó kisüléssorozat generálásához, így a TC-nRT interakció fenntartásához.

Következésképpen az orsók hosszbeli varianciája összefüggésben van a hálózati állapotok fluktuációjával, illetve az nRT neuronok belső tulajdonságainak változása végett alakul. A membránpotenciálok megfelelő értékre való állítása, így a sejtek tüzelési mintázata egy magasabb hálózati rendszerhez kötötten valósul meg. Ez az, ami meghatározza azt az állapotot, amikor az nRT neuronok képesek az orsó genezisre, ugyanakkor az orsók hossza az nRT aktuális tüzelési mintázatának a függvénye. Tehát mind a hálózatban, mind az nRT-ban történő változás kihatással lehet az orsók hosszára.

Ahhoz, hogy megérthessük a pontos populációs mechanizmusokat, következő lépésben a kérgi hatások vizsgálata volna a cél. Az agykérgi inputok nélkül az nRT pontos szerepe is világossá válna az orsók hosszának alakulásában. Mindemellett a különböző talamikus magvakban kialakuló orsók vizsgálata is szükséges lenne. Korábban publikált eredmények alapján az egyes magokban lévő TC neuronok hasonló fiziológiai tulajdonságokkal rendelkeznek, vagyis azokban jelen van a T-áram, így képesek burst tüzelésre (Jahnsen és Llinas 1984a, Jahnsen és Llinas 1984b). Habár az intrinsic tulajdonságok adottak, ez idáig nem alátámasztott, hogy az orsók létrejötte egységes-e a talamusz magvaiban. Ezekben eltérő az nRT felől érkező gátló bemenet denzitása (Pinault és Deschenes 1998), ami az orsók kialakulásában történő különbséget eredményezheti. A talamusz felé az nRT-n kívüli, extraretikuláris gátlás is érkezik. Ezen gátlás szerepe mindeddig nem tisztázott az orsó aktivitás illetve egyéb alvás során megjelenő oszcillációk kialakításában, ugyanakkor az nRT gátlását mintegy kiegészítve lényeges lehet az orsók genezisében.

Az alvási orsók megjelenése plasztikus, változik egyes betegségek esetében, valamint tanulási folyamatot követően is. Tanulmányozásukkal közelebbi képet kaphatunk arról, milyen mechanizmusok alakítják ezt a széleskörűen előforduló oszcillációt, mind a normálisan működő, mind a sérült neuronhálózatok esetében.

11 ÖSSZEFOGLALÓ

Az alvási orsók 1-3 s időtartamú, 7-14 Hz frekvenciájú tranziens oszcillációk, melyek a lassú hullámú alvás 2. stádiumában figyelhetőek meg. Jelentős szerepet tulajdonítanak nekik a memória konszolidációban, mivel tanulást követően számuk nagymértékben megnövekszik, valamint patológiás állapotban, ill. különböző farmakonok hatására az orsók száma és hossza is megváltozik. Régóta ismert, hogy az alvási orsók talamikus eredetűek, a nucleus reticularis thalami (nRT) GABAerg és a relémagok glutamaterg neuronjainak reciprok interakciójaként alakulnak ki. A pontos populációs mechanizmusai azonban mindezidáig tisztázatlanok.

Laboratóriumunk korábbi eredményei azt mutatták, hogy az orsó kezdetekor kialakuló nRT populációs aktivitás negatívan korrelál az orsók hosszával. Vagyis egy orsó kezdetekor már determinálva van annak lecsengése. Ennek hátterében két lehetséges mechanizmus állhat: az orsó hossza közvetlenül függhet a résztvevő nRT sejtek számától, illetve a hálózat aktuális állapota lehet az, ami az nRT populáció méretén keresztül határozza meg az orsók hosszát. Ennek vizsgálatára vezikuláris-GABA-transzporter-channelrhodopszin (vGAT-Chr) és parvalbumin-channelrhodopszin (PV-Chr) transzgenikus egereket használtunk, melyekben különböző hosszúságú és intenzitású kék fénnel való megvilágítással eltérő méretű RT populációt aktiváltunk. Az alvási orsókat a talamusz ventrális poszteriomedialis magjában (VPM) soksejt aktivitás alapján detektáltunk. A vizsgálatok uretán altatás alatt történtek, mivel ennél az altatási formánál a kérgi aktivitás deszinkronizált és szinkronizált állapotok között fluktuál, csakúgy, mint az a természetes alvás során is megfigyelhető. Mély altatásban és deszinkronizált állapotban nem sikerült alvási orsókat kiváltani az nRT aktiválásával, ezzel szemben enyhén szinkronizált állapotban (ami a természetes alvás 2. stádiumának felel meg) a spontán megjelenő orsók mellett stimulus hatására is ki lehetett váltani alvási orsókat. Ebben a stádiumban a kiváltott orsók hossza nem mutatott összefüggést a stimulus hosszával, vagy intenzitásával, a meghatározó tényező az altatás mélysége volt.

Eredményeink azt mutatják, hogy az alvási orsók hossza és gyakorisága a hálózat aktuális állapota a meghatározó, ami feltehetően a neuromodulátorok szintjének szabályozása alatt áll.

12 SUMMARY

Sleep spindles are 1-3 s long transient events with a frequency of 7-14 Hz and occur during stage 2. sleep. The duration of spindles increases after learning periods suggesting its role in memory consolidation. Furthermore, the duration and density of spindles shows alteration in some pathological states and under the influence of different drugs. It is well defined that spindles are generated in the thalamus by the crosstalk between the reciprocally connected excitatory thalamocortical and the inhibitory neurons of nucleus reticularis thalami (nRT). In contrast, the mechanisms underlying the parameters of spindles are still debated.

Previous studies of our group showed negative correlation between the length of the spindles and the participation probability of nRT cells in the first cycle of the spindles. Two possible mechanisms can lead to this phenomenon: spindle duration is determined directly by the size of the active nRT population, or the nRT population is under the influence of the ongoing network state. To test these scenarios we optogenetically evoked spindles in vesicular-GABA-transporter-channelrhodopsin (vGAT-Chr) and parvalbumin-channelrhodopsin (PV-Chr) mice by activating nRT neurons. The experiments were done under urethane anesthesia which provide a condition similar to natural sleep: continuous fluctuation between synchronized and desynchronized states. We hypothesized that different sizes of nRT populations can be recruited by varying the duration or the intensity of the stimulus. Spindles were detected by the multiunit activity of the ventral posteromedial nucleus of the thalamus (VPM).

No spindles could be evoked during desynchronized or highly synchronized periods, when no spontaneous events could be detected either. In contrast, during lightly synchronized stages spontaneous as well as evoked spindles occurred with comparable parameters. Nevertheless, no correlation was observed between the stimulus intensity or duration and the length of the spindles; but the main factor was the actual network state.

Based on our results we can conclude that the duration of sleep spindles is not directly determined by the size of the active nRT population but the general excitability of the network, which is under the control of neuromodulation.

13 IRODALOM

- Astori S, Wimmer RD, Luthi A. 2013. Manipulating sleep spindles--expanding views on sleep, memory, and disease. *Trends in neurosciences* 36: 738-748
- Bal T, McCormick DA. 1993. Mechanisms of oscillatory activity in guinea-pig nucleus reticularis thalami in vitro: a mammalian pacemaker. *The Journal of physiology* 468: 669-691
- Bal T, McCormick DA. 1996. What stops synchronized thalamocortical oscillations? *Neuron* 17: 297-308
- Bartho P, Freund TF, Acsady L. 2002. Selective GABAergic innervation of thalamic nuclei from zona incerta. *The European journal of neuroscience* 16: 999-1014
- Bartho P, Slézia A., Mátyás F., Faradzs-zade L., Ulbert I., Harris K.D., Acsády L. 2014. Ongoing network state controls the length of sleep spindles via inhibitory activity. *Neuron* in press
- Bodizs R, Kis T, Lazar AS, Havran L, Rigo P, és mások. 2005. Prediction of general mental ability based on neural oscillation measures of sleep. *Journal of sleep research* 14: 285-292
- Bokor H, Frere SG, Eyre MD, Slezia A, Ulbert I, és mások. 2005. Selective GABAergic control of higher-order thalamic relays. *Neuron* 45: 929-940
- Bonjean M, Baker T, Lemieux M, Timofeev I, Sejnowski T, Bazhenov M. 2011. Corticothalamic feedback controls sleep spindle duration in vivo. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31: 9124-9134
- Cox CL, Zhou Q, Sherman SM. 1998. Glutamate locally activates dendritic outputs of thalamic interneurons. *Nature* 394: 478-482
- Csicsvari J, Henze DA, Jamieson B, Harris KD, Sirota A, és mások. 2003. Massively parallel recording of unit and local field potentials with silicon-based electrodes. *J Neurophysiol* 90: 1314-1323
- Ferrarelli F, Huber R, Peterson MJ, Massimini M, Murphy M, és mások. 2007. Reduced sleep spindle activity in schizophrenia patients. *The American journal of psychiatry* 164: 483-492

- Fogel SM, Smith CT. 2011. The function of the sleep spindle: a physiological index of intelligence and a mechanism for sleep-dependent memory consolidation. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 35: 1154-1165
- Gibbs EL, Gibbs FA. 1962. Extreme spindles: correlation of electroencephalographic sleep pattern with mental retardation. *Science (New York, N.Y.)* 138: 1106-1107
- Halassa MM, Siegle JH, Ritt JT, Ting JT, Feng G, Moore CI. 2011. Selective optical drive of thalamic reticular nucleus generates thalamic bursts and cortical spindles. *Nature neuroscience* 14: 1118-1120
- Hirsch JC, Fourment A, Marc ME. 1983. Sleep-related variations of membrane potential in the lateral geniculate body relay neurons of the cat. *Brain research* 259: 308-312
- Jahnsen H, Llinas R. 1984a. Electrophysiological properties of guinea-pig thalamic neurones: an in vitro study. *J.Physiol* 349: 205-226
- Jahnsen H, Llinas R. 1984b. Ionic basis for the electro-responsiveness and oscillatory properties of guinea-pig thalamic neurones in vitro. *The Journal of physiology* 349: 227-247
- Jones EG. 1998. Viewpoint: the core and matrix of thalamic organization. *Neuroscience* 85: 331-345
- Jones EG. 2001. The thalamic matrix and thalamocortical synchrony. *Trends in neurosciences* 24: 595-601
- Kim U, McCormick DA. 1998. Functional and ionic properties of a slow afterhyperpolarization in ferret perigeniculate neurons in vitro. *J Neurophysiol* 80: 1222-1235
- Kultas-Ilinsky K, Ilinsky I, Warton S, Smith KR. 1983. Fine structure of nigral and pallidal afferents in the thalamus: an EM autoradiography study in the cat. *J Comp Neurol* 216: 390-405
- Kuroda M, Price JL. 1991. Synaptic organization of projections from basal forebrain structures to the mediodorsal thalamic nucleus of the rat. *J.Comp Neurol.* 303: 513-533
- Landisman CE, Long MA, Beierlein M, Deans MR, Paul DL, Connors BW. 2002. Electrical synapses in the thalamic reticular nucleus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22: 1002-1009
- Lu J, Sherman D, Devor M, Saper CB. 2006. A putative flip-flop switch for control of REM sleep. *Nature* 441: 589-594

- Luthi A, Bal T, McCormick DA. 1998. Periodicity of thalamic spindle waves is abolished by ZD7288, a blocker of I_h . *J Neurophysiol* 79: 3284-3289
- McCormick DA, Pape HC. 1990. Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurones. *The Journal of physiology* 431: 291-318
- McCormick DA, Wang Z. 1991. Serotonin and noradrenaline excite GABAergic neurones of the guinea-pig and cat nucleus reticularis thalami. *The Journal of physiology* 442: 235-255
- Morin A, Doyon J, Dostie V, Barakat M, Hadj Tahar A, és mások. 2008. Motor sequence learning increases sleep spindles and fast frequencies in post-training sleep. *Sleep* 31: 1149-1156
- Nagel G, Ollig D, Fuhrmann M, Kateriya S, Musti AM, és mások. 2002. Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae. *Science (New York, N.Y.)* 296: 2395-2398
- Nagel G, Szellas T, Huhn W, Kateriya S, Adeishvili N, és mások. 2003. Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 13940-13945
- Nicolas A, Petit D, Rompre S, Montplaisir J. 2001. Sleep spindle characteristics in healthy subjects of different age groups. *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology* 112: 521-527
- Pinault D, Bourassa J, Deschenes M. 1995. The axonal arborization of single thalamic reticular neurons in the somatosensory thalamus of the rat. *The European journal of neuroscience* 7: 31-40
- Pinault D, Deschenes M. 1998. Projection and innervation patterns of individual thalamic reticular axons in the thalamus of the adult rat: a three-dimensional, graphic, and morphometric analysis. *J Comp Neurol* 391: 180-203
- Sherman SM, Guillery RW. 1996. Functional organization of thalamocortical relays. *J Neurophysiol* 76: 1367-1395
- Steriade M, Deschenes M. 1984a. The thalamus as a neuronal oscillator. *Brain research* 320: 1-63
- Steriade M, Deschenes M. 1984b. The thalamus as a neuronal oscillator. *Brain Res.* 320: 1-63

- Steriade M, Deschenes M, Domich L, Mulle C. 1985. Abolition of spindle oscillations in thalamic neurons disconnected from nucleus reticularis thalami. *J Neurophysiol* 54: 1473-1497
- Steriade M, Domich L, Oakson G, Deschenes M. 1987. The deafferented reticular thalamic nucleus generates spindle rhythmicity. *J Neurophysiol* 57: 260-273
- Varela C, Sherman SM. 2007. Differences in response to muscarinic activation between first and higher order thalamic relays. *J Neurophysiol* 98: 3538-3547
- Varela C, Sherman SM. 2009. Differences in response to serotonergic activation between first and higher order thalamic nuclei. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)* 19: 1776-1786
- von Krosigk M, Bal T, McCormick DA. 1993. Cellular mechanisms of a synchronized oscillation in the thalamus. *Science (New York, N.Y.)* 261: 361-364
- Williams SC, Deisseroth K. 2013. Optogenetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110: 16287
- Zhao S, Ting JT, Atallah HE, Qiu L, Tan J, és mások. 2011. Cell type-specific channelrhodopsin-2 transgenic mice for optogenetic dissection of neural circuitry function. *Nature methods* 8: 745-752

14 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, dr. Barthó Péternek mindazért a rengeteg segítségért, amit nap mint nap nyújt, hogy türelmes, és kellő módon motivál.

Köszönöm dr. Acsády Lászlónak az útbaigazítást, a folyamatos bátorító támogatását, valamint, hogy elősegíti a személetmódom alakulását.

Köszönettel tartozom dr. Mátyás Ferencnek, aki praktikus és segítő tanácsaival ellát, amik nagyban hozzájárulnak ahhoz, hogy olajozottan haladjon a munka.

Végül köszönöm a Thalamusz csoportnak is az összes segítséget.

15 NYILATKOZAT

Név: Farads-zade Lejla

Neptun azonosító: JP845N

ELTE Természettudományi Kar, **biológus mesterszak**

Diplomamunka címe: Alvási orsók vizsgálata optogenetikai és fiziológiai módszerekkel

A diplomamunka szerzőjeként fegyelmi felelősségem tudatában kijelentem, hogy a dolgozatom önálló munkám eredménye, saját szellemi termékem, abban a hivatkozások és idézések standard szabályait következetesen alkalmaztam.

Tudomásul veszem, hogy plágiumnak számít:

- szó szerinti idézet közlése idézőjel és hivatkozás megjelölése nélkül;
- tartalmi hivatkozás a forrás megjelölése nélkül;
- más személy publikált gondolatainak saját gondolatként való feltüntetése.

Kijelentem továbbá, hogy a diplomamunka leadott nyomtatott példányai és elektronikus változata szövegükben, tartalmukban megegyeznek.

Budapest, 2014. 05.16.

a hallgató aláírása