

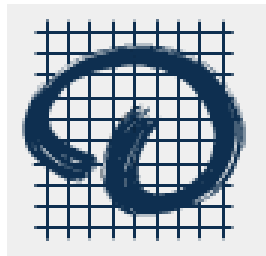
XXXII. OTDK Biológia Szekció

Alvási orsók jellemzői a hálózati állapot függvényében

Faradzs-zade Lejla

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Biológus Msc 2. évfolyam
MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet, Thalamus Kutatócsoport

Témavezető: dr. Barthó Péter



2014.05.02.

1 Tartalom

2	Rövidítésjegyzék	3
3	Összefoglaló	4
4	Bevezető	4
5	Célkitűzések	7
6	Anyagok és módszerek	9
7	Eredmények	10
8	Diskusszió	17
9	Szerzői Hozzájárulás	19
10	Irodalom	19
11	Köszönetnyilvánítás	21

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

nRT - nucleus reticularis thalami

PV - parvalbumin

REM - rapid eye movement, álomlátásos, vagy paradox alvás

TC - talamokortikális

vGAT - vezikuláris-GABA-transzporter

VPM - ventrális poszteromediális talamikus mag

YFP - sárga fluoreszcens fehérje

3 Összefoglaló

Az alvási orsók 1-3 s időtartamú, 7-14 Hz frekvenciájú tranziens oszcillációk, melyek a lassú hullámú alvás 2. stádiumában fordulnak elő. Az orsók a talamuszban keletkeznek a GABAerg retikuláris mag (nRT), illetve a glutamáterg relémagok sejtjeinek interakciójaként, a pontos mechanizmusok azonban még tisztázatlanok.

Korábbi eredményeink alapján az nRT populáció aktivitása az orsó kezdetekor fordítottan korrelál annak hosszával. A jelenség hátterében két lehetséges mechanizmus állhat: az oszcilláció hossza a résztvevő nRT sejtek számától függ, vagy mindkét faktor a hálózat állapotának függvénye. Ennek vizsgálatára transzgenikus, PV-ChR2 és vGAT-ChR2 egereken váltottunk ki alvási orsókat az nRT optikai stimulálásával uretán altatás alatt. Ilyenkor az aktivitás periodikusan fluktuál szinkronizált és deszinkronizált állapot között, lehetővé téve a vizsgált jelenség megfigyelését különböző éberségi szinteken. A kiváltott orsókat a talamusz ventrális poszteriomedialis mag (VPM) soksejt-aktivitása alapján detektáltuk.

Mély altatásban, illetve deszinkronizált állapotban nem lehetett orsókat kiváltani, míg közepes (természetes alvás 2. stádiumának megfelelő) altatásban nRT stimuláció orsókat indukált. Ezen stádiumon belül a kiváltott orsók hossza és frekvenciája nem mutatott összefüggést a stimulus erősségével, a meghatározó tényező az altatás mélysége volt. Eredményeink azt mutatják, hogy a hálózat állapota (feltehetően a modulátorok szintje) az, ami az nRT populáció méretén keresztül meghatározza ezen oszcilláció paramétereit.

4 Bevezető

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 megszürt információt az agykéreg felé továbbítja.

Két fő sejtípus különíthető el a talamuszban, a serkentő relésejtek, vagyis a talamokortikális (TC) neuronok, illetve a gátló, GABAerg neuronok. Ez utóbbiak egy a dorzális talamuszt körül ölelő struktúrában, a nucleus reticuláris thalamiban (nRT) találhatóak (Steriade és Deschenes 1984a). A talamuszból a kéregbe érkező, valamint a kéreg VI. rétegi sejtjei felől

jövő kortikotalamikus rostok egyaránt áthaladnak az nRT-n, közben serkentő kollaterális kapcsolatba lépnek annak neuronjaival (Pinault és mtsai., 1995). Az nRT ezen felül topografikus, reciprok kapcsolatban áll a megfelelő talamikus maggal, IPSP-k kialakulását indukálja azokban (Jones, 1985). Ennek a három komponensnek a kapcsolatrendszere alkotja a talamokortikális kört, amik a talamokortikális oszcillációk alapját képezik (Bonjean és mtsai., 2011).

Ezeket, és más oszcillációkat többnyire tranzienst előfordulás jellemzi, 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.

Az egyik fontos talamokortikális oszcilláció az alvási orsó. Ezek a lassú hullámú alvás 2. stádiumában jelentkező, 1-3 másodperc hosszú, 7-14 Hz frekvenciájú kisüléscsomagok. Jelentős funkciójuk lehet a memória konszolidációjában, mivel tanulási folyamatot követő éjszaka az orsók hossza, és denzitása is növekszik (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 patológiás állapotokra 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).

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 az nRT orsógenerátor szerepét feltételezte, mivel annak egyoldali kiirtása az orsók eltűnéséhez vezet a 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 1984b, von Krosigk és mtsai., 1993).

Mind a TC, mind az nRT sejteit duális tüzelési mintázat jellemzi. Depolarizált memberánpotenciálon (~-60 mV felett) egyedi akciós potenciálokból álló, úgynevezett tonikus

tüzelés, míg hiperpolarizáltabb membránpotenciálon rövid, 200-300 Hz frekvenciájú kisüléssorozatok (burst) produkálnak (Hirsch és mtsai., 1983). Ennek 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 ülnék. Lassú hullámú alvás, illetve altatás alatt a burst üzemmód jellemző a talamikus sejtekre, ébrenlét, illetve REM alvás alatt viszont főleg tonikusan tüzelnek (Steriade és Deschenes 1984b). A sejtek tüzelési mintázatát azok nyugalmi membrán potenciál 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 noradrenalin (NA), hisztamin (His), szerotonin (5-HT), glutamát és az acetilkolin (Ach) lehetnek, melyek koncentrációja az alvási ciklusnak megfelelően váltakozik. 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).

A burst üzemmód az alapja az alvási orsók kialakulásának is. 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.

Ahhoz, hogy ezeknek az oszcillációknak a lefolyását megérthessük, az ezeket létrehozó, egymással kapcsolatban lévő populációk vizsgálata elengedhetetlen. Csoportunk korábbi kísérleteiben megvizsgálta a reciprok kapcsolatban álló nRT és TC sejtek aktivitását az alvási orsók egyes ciklusaiban, különböző hosszúságú orsók esetében. Szoros összefüggést tapasztaltak a résztvevő nRT neuronok és az orsók hossza között, míg a TC neuronok esetében csupán gyenge kapcsolatról van szó. Az első ciklusban résztvevő nRT populáció mérete és az orsók hossza között szoros, negatív korreláció tapasztalható, vagyis rövid orsók magas, míg hosszú orsók alacsony nRT populációs aktivitással kezdődnek. Ezek mellett az első és az utolsó ciklusban résztvevő nRT populáció mérete, illetve az orsó hossza között is szignifikáns kapcsolat mutatható ki. Mindez azt feltételezi, hogy az orsók hosszát azok kezdetén résztvevő nRT

populáció mérete határozhatja meg, ami megszabhatja az oszcilláció előre meghatározott kezdeti és végpontja közötti lefutását. Ezek alapján 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.

Az nRT populáció mérete és az orsók hossza közötti összefüggés további vizsgálatának egyik módja különböző méretű nRT 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.

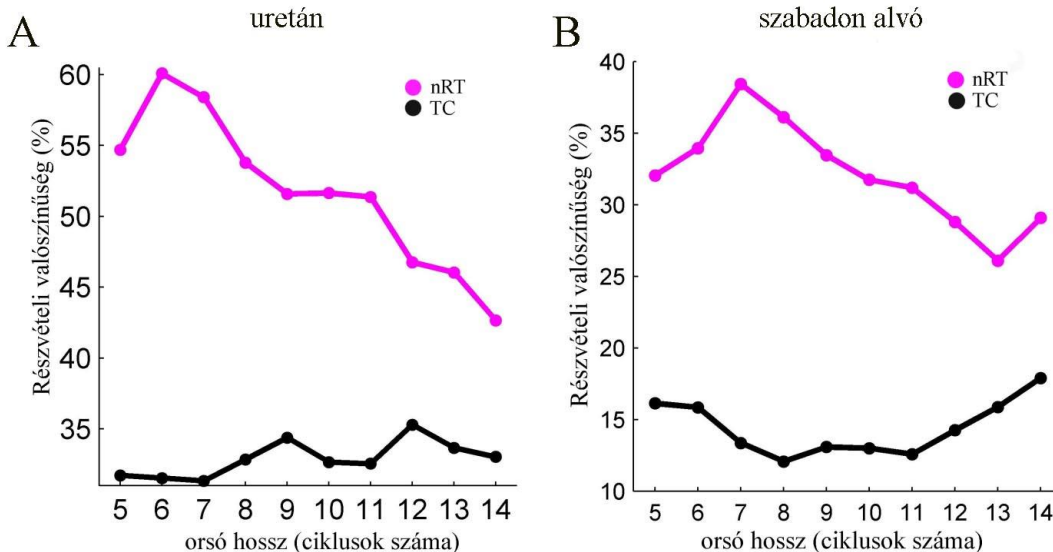
Néhány évvel ezelőtt Halassa és Moore vGAT-Chr2 transzgenikus egerek nRT neuronjait stimulálva alvási orsókat váltott ki (Halassa és mtsai., 2011). Ebben az egérvonalban a Chr2-eYFP a vezikuláris GABA transzporter gén promótere által meghajtva expresszáldik, lehetővé téve a GABA-erg neuronok szelektív targetálását. Ugyanilyen működési elven alapszanak a PV-Chr2 egérvonalak is, ahol a Chr2 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 Chr2-hoz kötött fluoreszcens fehérje, az eYFP a sejtek anatómiai behatárolását is lehetővé teszi.

5 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) (**1. 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

résztevő nRT sejtek száma is determinálhatja az oszcilláció hosszát. Abban az esetben, ha ez utóbbi hipotézis a valós, különböző méretű nRT populációk aktiválásával eltérő hosszúságú orsók 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 különbözőségét a természetes módon megjelenő orsókétól.
- A fényimpulzus intenzitását, illetve időtartamát változtatva vizsgáljuk az egyes paraméterekkel történő aktiválás hatását az orsók hosszúságára.
- Megvizsgáljuk a különböző alvás-ébrenléti szintek, vagyis a hálózat hatását az orsók kiválthatóságára.



1. 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 altatott (B) esetén, míg a talamokortikális (TC) neuronok nem mutatnak efféle összefüggést.

6 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 expresszáló sejtekben megindulhat a fúziós protein transzkripciója. Nevezetesen a vGAT illetve a PV pozitív sejtekben (Cre rekombinázt expresszálóknak) kifejeződik a Chr2-eYFP fúziós protein, ami kiül 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 szómáját optogenetikai módszerrel 100 μm vastag optikai szállal (Thorlabs, DE) 447 nm hullámhosszú kék fénnel 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

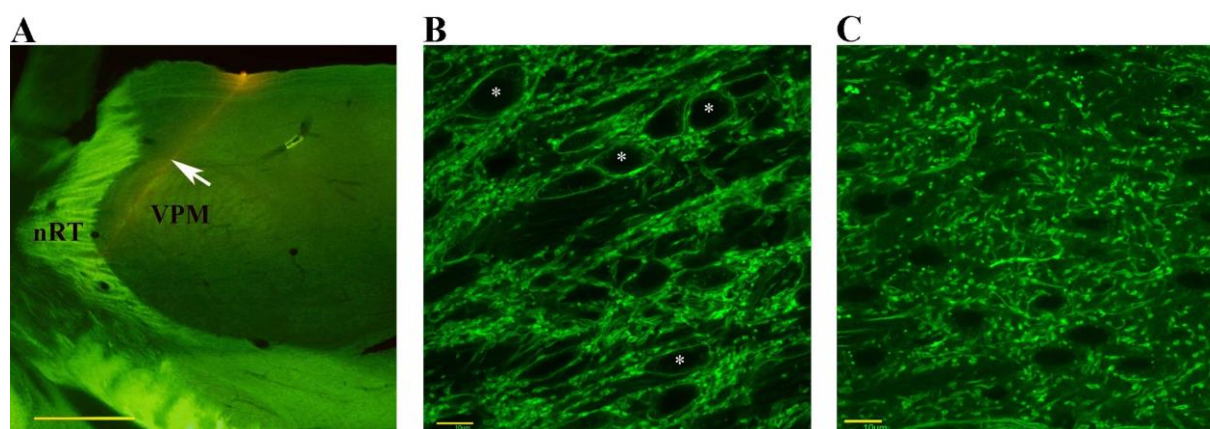
megszűrtük, és erre burkológörbét illesztettünk. A küszöbértékeket meghaladó ($2\text{ SD} > 100\text{ ms}$ és $1\text{ SD} > 300\text{ ms}$) aktivitást orsóként detektáltuk.

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.

7 Eredmények

Az elvezetések sok csatornás szilikon alapú elektródákkal végeztük uretán altatás alatt. Ez az altatási mód lehetőséget nyit arra, hogy az alvási orsókat össze lehessen hasonlítani a természetes alvás során kialakuló orsókkal, mivel 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 orók hossza és az nRT kezdeti populációs aktivitása közötti negatív korreláció (**1.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 a soksejt aktivitás alapján nagy amplitúdójú, alacsony frekvenciás jelek keletkeznek. Ekkor a talamikus sejtek hiperpolarizáltak (-60 mV alatt), és visszacsapó kisüléssorozatokat (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) (**2. ábra**). A spontán orsók mellett (**3.A ábra**) Halassa és Moore (2011) eredményeivel párhuzamban, az nRT-t érő fénystimulus hatására is sikerült orsókat kiváltani a VPM-ben (**3.B ábra**). Az eredmények mindkét állattörzsben, illetve stimulációs felállásban konzisztensek voltak.

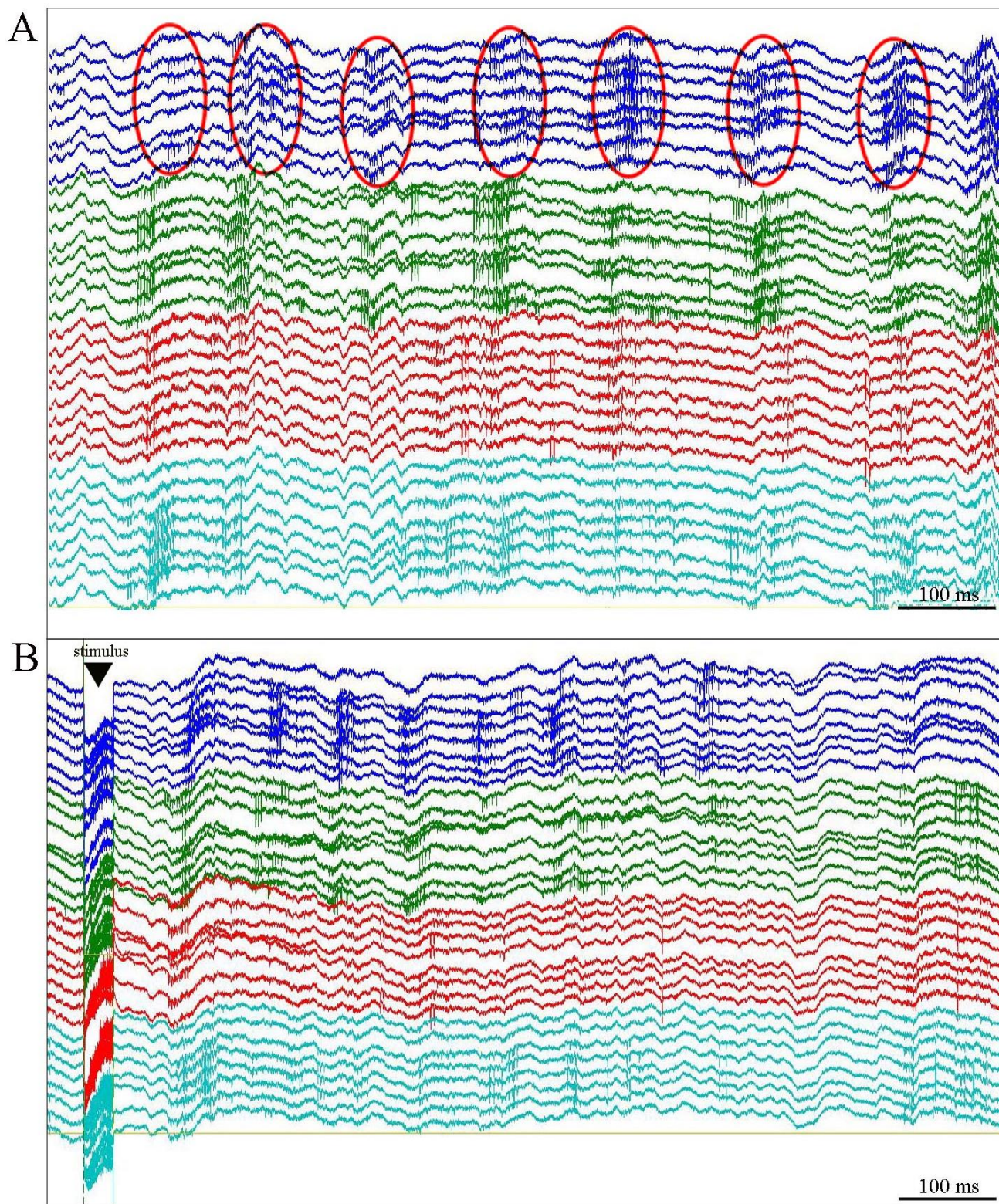


2. ábra: vGAT-Chr2 egér agyából készült koronális metszetek (60 μ m).

(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 membránfestékekbe 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 (**4. 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 a különböző állapotok ciklikusan követték egymást. Az orsók jellemzői az enyhén szinkronizált szakaszon belül is variáltak, a deszinkronizáltabb szakaszoktól a szinkronizáltabb felé haladva frekvenciájuk csökkent, hosszuk megnőtt (**4. A,B ábra**).

Kiindulási hipotézisünk szerint különböző méretű nRT populációk aktiválása az orsók hosszának változásában nyilvánulhat meg. Optogenetikai eszközökkel ezt kétféleképpen



3. 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 ágú 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.

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) (**5. ábra**) nagyobb méretű nRT populációt aktiválunk, ami rövidebb orsókat eredményez. Az orsók hossza a fényimpulzus hosszának növelésével (2-40 ms, 5,4mW, n=11) (**6. 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 (**5. A, B ábra; 6. B ábra**). Az enyhén szinkronizált állapotban mind a spontán, mind a kiváltott orsók hosszában gyenge komoduláció mutatkozott (**5. B ábra**), azok hasonlóképpen váltakoztak az adott szakaszon belül ($R=0.21$, $p<0.001$). Ezekben a periódusokban a leggyengébb stimulusok ritkán indukáltak orsót (**5.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 (**5.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 (**5.C ábra**), mind időtartamának növelésével (**6.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 orsókhoz képest sem kaptunk szignifikáns különbség ($p > 0.05$, Kruskal-Wallis teszt) (5.D ábra, 6.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) (7. 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.

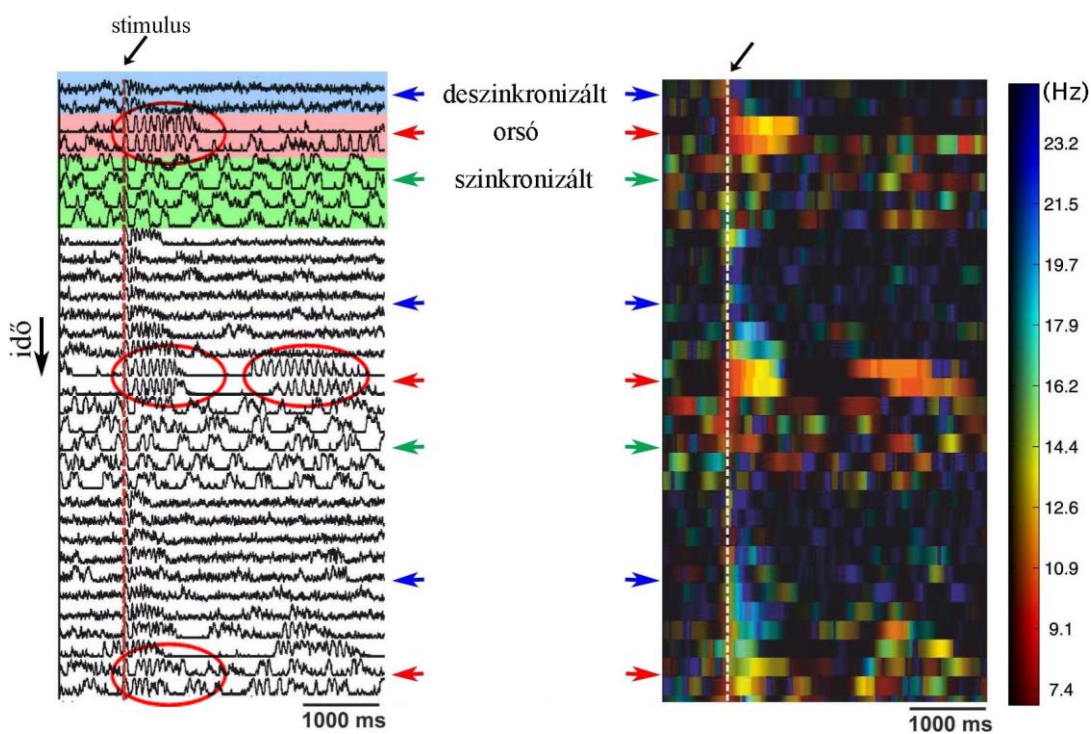
4. ábra:

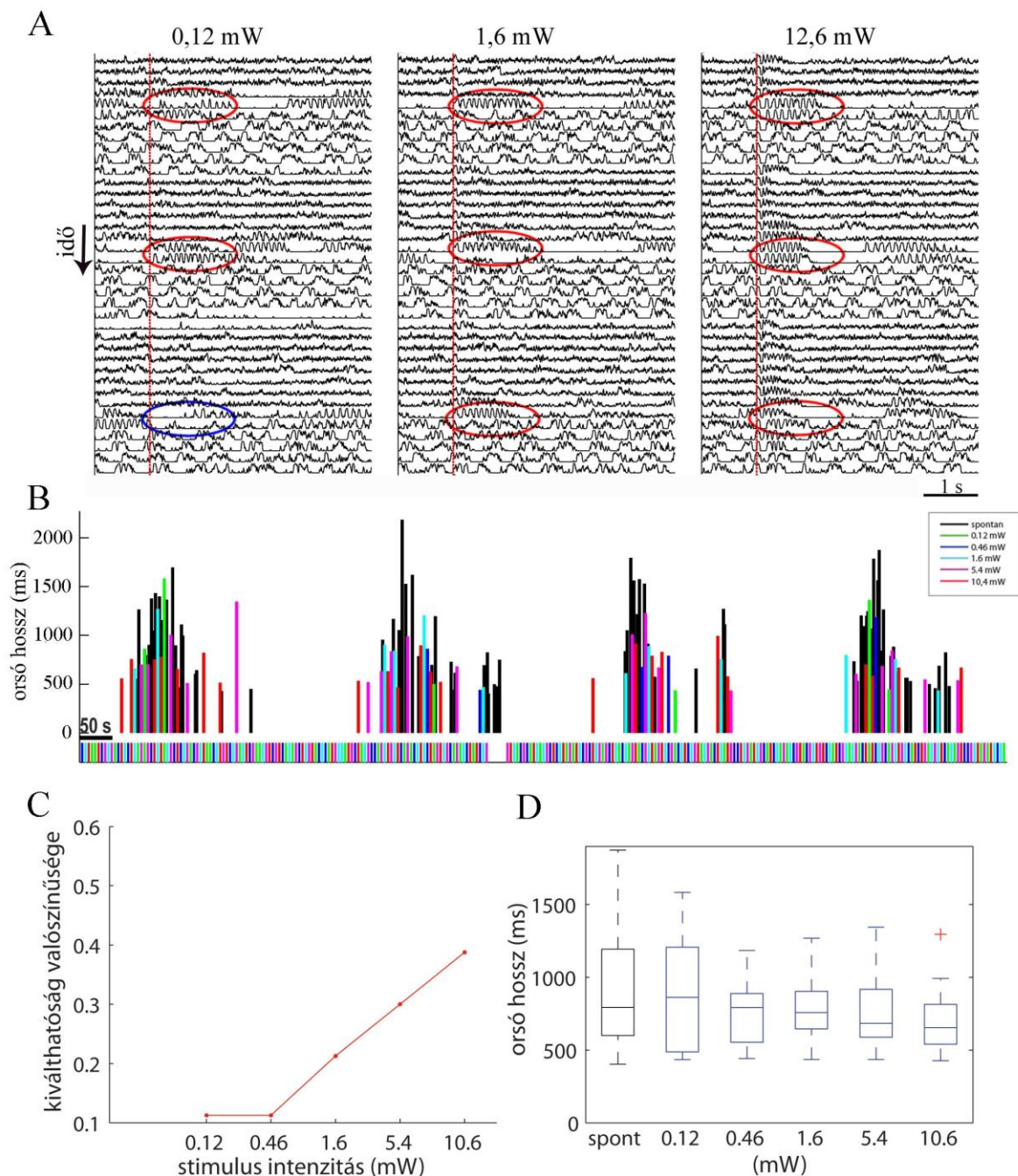
Alvási orsók kiválthatósága függ a hálózat állapotától

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

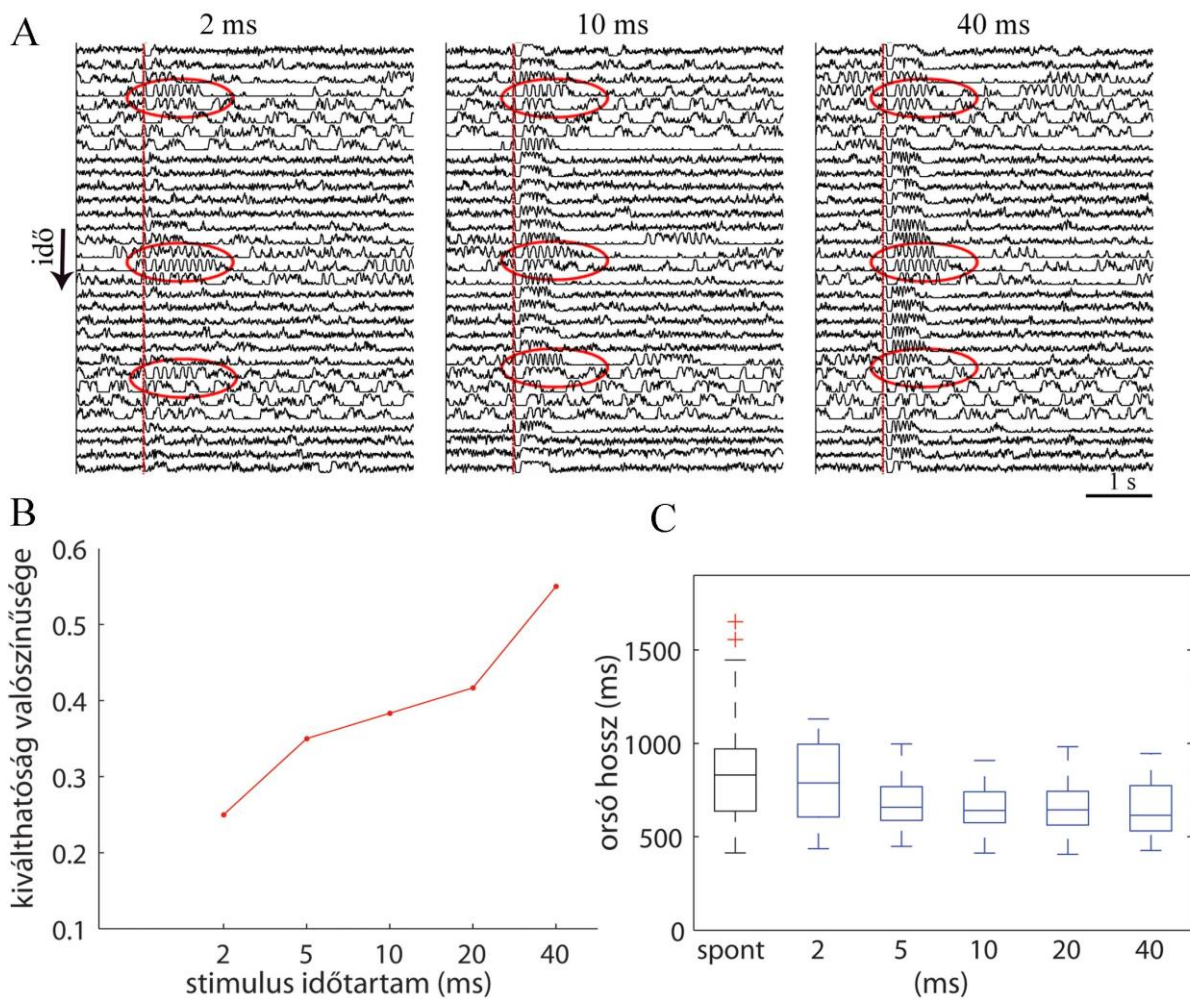
spontán fluktuál szinkronizált (zöld nyilak) és deszinkronizált (kék nyilak) állapot között. A stimuláció csak az altatási ciklus bizonyos pontjain, enyhén szinkronizált szakaszban (piros nyilak) képes orsókat kiváltani (piros ellipszis). **B)** MUA domináns frekvenciája 7-23 Hz között. A kiváltott orsóknak mind a hossza, mind a frekvenciája változik az állapot függvényében.





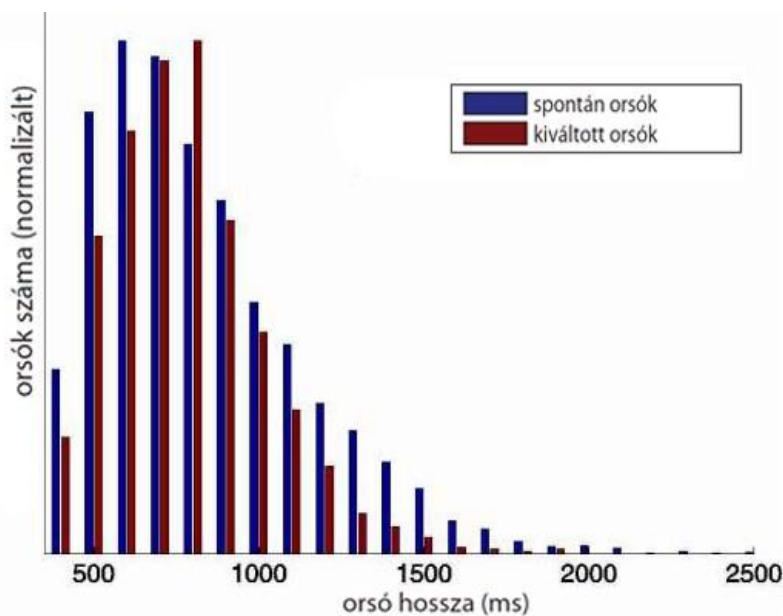
5. ábra: A kiváltott orsók hossza független a stimulus intenzitástól

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.



6. ábra: A kiváltott orsók hossza függetlenek 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.



7. 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.

8 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 értük el. A fénystimuláció által kiváltott orsók hossza nem mutatott szignifikáns változást a stimulus paramétereinek hatására, sem az egyes stimulusok, 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 Chr csatorna megnyílásához, így az nRT neuronokba áramló pozitív ionok szintje nem érte el az értéket, hogy létrehozzanak egy kellő mértékű depolarizációt, így egy burst kisüléssorozatot. Küszöb feletti intenzitással stimulálva már elegendő mértékben depolarizálódhattak a sejtek egy orsó oszcillációt 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 kiváltásának valószínűsége is növekedett. Ez feltehetően az aktivált sejtek rekrutálódásának, így a populáció méret növelésének következtében valósult meg. Mindez arra enged következtetni,

hogy nem közvetlenül az nRT populáció, hanem a hálózat aktuális állapota az, ami az aktiválódott nRT populáció méretén keresztül meghatározza 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 inhibítorikus 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 közelebb kerüljünk a pontos populációs mechanizmusok megértéséhez, szükségszerűen a kérgi hatások vizsgálata volna a cél. Így mind a kéreg, mind az nRT pontos szerepe világossá válna az orsók hosszának alakulásában.

9 Szerzői Hozzájárulás

Alulírott Faradzs-zade Lejla a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül:

- az állatok műtétjét illetve perfúzióját
- az elektrofiziológiai elvezetéseket
- az optogenetikai stimulálást
- a hisztológiai elemzést
- és az elvezetések elemzését (dr. Barthó Péterrel együtt, az általa megírt scriptek alapján)

végeztem el.

Budapest, 2014. május. 02.

10 Irodalom

- 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
- 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
- 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
- Lu J, Sherman D, Devor M, Saper CB. 2006. A putative flip-flop switch for control of REM sleep. *Nature* 441: 589-594
- 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
- Steriade M, Deschenes M. 1984a. The thalamus as a neuronal oscillator. *Brain Res.* 320: 1-63
- Steriade M, Deschenes M. 1984b. The thalamus as a neuronal oscillator. *Brain research* 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
- 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
- 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

11 Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt köszönöm témavezetőmnek, dr. Barthó Péternek a felém tanúsított rengeteg türelmét, hogy szakmailag felkészít és mindazt a segítségét, amit nap mint nap biztosít.

Köszönöm dr. Acsády Lászlónak az útbaigazítást, a folyamatos bátorító támogatását és a dolgozat megírásához nyújtott hasznos tanácsait.

Mátyás Ferencnek is köszönettel tartozom a nekem nyújtott praktikus és segítő tanácsaiért.

És végül, de nem utolsó sorban köszönöm a Thalamus csoport többi tagjának is az összes segítséget.