

Önálló laboratórium II.

*Vazoaktív intesztinális polipeptid (VIP) tartalmú
interneuronok szerepe az agykérgi
jelfeldolgozásban*

Készítette:

Báthory Eszter

BME VIK Egészségügyi mérnök szak

Belső konzulens: Dr. Bonyár Attila

Külső konzulens: Dr. Szadai Zoltán

Helyszín: Femtonics kft.

2019/2020/2. félév

TARTALOM

1. Bevezetés	3
2. Irodalmi áttekintés	4
2.1. Akcióspotenciál	4
2.2. Dendritműködés	4
2.3. Ioncsatornák	6
2.4. Kérgi neuronok.....	6
2.5. VIP gátló interneuronok	7
2.6. Neurontípusok aktivitása	9
2.7. Két-foton mikroszkóp	12
2.8. Virális transzdukció	15
2.9. Pavlovi kondicionálás	17
3. Elvégzett feladatok.....	17
4. Összegzés	18
5. Hivatkozások	19

1. BEVEZETÉS

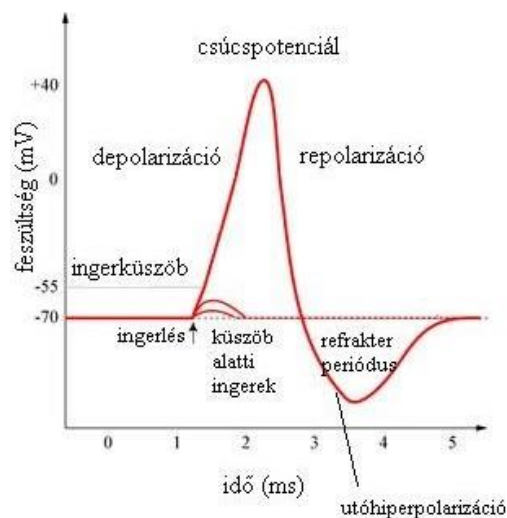
Az idegtudományok területe napjainkra hatalmas kutatási szektorrá vált, dinamikus fejlődése egyre nagyobb teret hódít. A neurológiai kutatások elengedhetetlen fontosságúak az idegrendszer működésének átfogóbb megértése, valamint a klinikai diagnosztika szempontjából. A folyamatot az egyre korszerűbb jelölési és képalkotási technológiák és mérési módszerek megjelenése segíti elő. A kutatás szempontjából releváns kérdés lehet, az in vivo megfigyelés és vizsgálat is, amelyet a gyakorlatban legtöbbször használt egér, mint modellállat alkalmazásával valósítanak meg, annak gazdaságossága és gyors reprodukciója miatt.

A központi idegrendszer, azon belül a nagyagy neokortex, különböző felépítésű és funkciójú régiókra tagolódik. Az eltérő típusú sejtek egymással hierarchikus rendszert alkotnak. Közöttük találhatók a kis számban jelenlévő, de jelentős mértékű befolyásoló szereppel bíró vasoaktív intesztinális polipeptid (VIP) tartalmú interneuronok, melyek GABAerg gátlósejtek és megtalálhatóak az emlősök kortexében. Működésük során képesek direkt gátolni, vagy kioltani a piramissejtekre vagy serkentő neuronokra ható gátlósejtek hatását, melyek az általuk termelt jelátviteli anyag szerint, mely lehet szomatosztatin (SOM vagy SST), vagy parvalbumin (PV) expresszáló sejt. Tehát diszinhbitorként piramissejteket serkentenek, a rájuk ható gátlás feloldásával, amelynek eredményeképpen szerepük van az asszociatív memória kialakításában. A laboratóriumi munka során a primer vizuális kéreg (V1) különböző rétegeiben elhelyezkedő neuronok viselkedésének megfigyelését tűztük ki célul, vizsgálva a diszinhbitáció változását a tanulási folyamat során. A kísérletek alatt a vizuális pavlovi kondicionálás alkalmazásával 2-foton mikroszkópos detektálással vizsgáltuk a laboratóriumi egerek agysejtjeit. Ennek érdekében virális transzfekció segítségével Ca^{2+} -érzékeny fehérjemolekulákat fejeztettünk ki specifikusan, a vizsgálni kívánt agyterület neuronjaival a mérést megelőzően. Ezek a fehérjemolekulák képesek fluoreszcens jelet kibocsátani adott hullámhosszon történő besugárzásra, az emelkedett intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció miatt kialakult konformáció-változás eredményeként. Így fluorofór jelenlétében vizsgálhatók az akciós potenciálok (AP), melyekre a sejten belüli emelkedett Ca^{2+} -koncentráció jellemző. Fontos, hogy a festékmolekulák ne befolyásolják jelentősen az intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációt, ennek mértéke elhanyagolható legyen a vizsgálat szempontjából. Ennek megfelelően választott transzfektáló szekvencia alkalmazásával végeztük el a kísérleteket.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Akcióspotenciál

A bemeneti ingerek jeltranszformálási folyamata során ingerület alakul ki az idegsejtekben, mely akciós potenciálként nyilvánul meg és terjed tovább. Ez nem más, mint a sejtek membránjának két oldala között megváltozó, ugrásszerű potenciálváltozás, amely a membránba ágyazott ioncsatornák segítségével alakul ki megfelelő szignálok hatására. Nagy gyorsasággal elektrokémiai gradiens alakul ki, amelyet depolarizációnak hívunk. A kationok, elsősorban Na^+ -ionok intracelluláris térbe történő beeresztésével pozitívabb töltésűvé válik a sejt. Ezek a csatornák azonban rövid, 5 ms-nál kisebb ideig képesek nyitott állapotban maradni. Ezt a Ca^{2+} -ionok beáramlása követi, depolarizáció kialakulását vonva maga után. Utána a gyors repolarizáció során visszaalakulnak a kiindulási koncentrációviszonyok (Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^-) visszaállnak az eredetire. Ez a folyamat rendkívül energiaigényes (2.1.1. ábra).



2.1.1. Ábra: Akciós potenciál görbe¹.

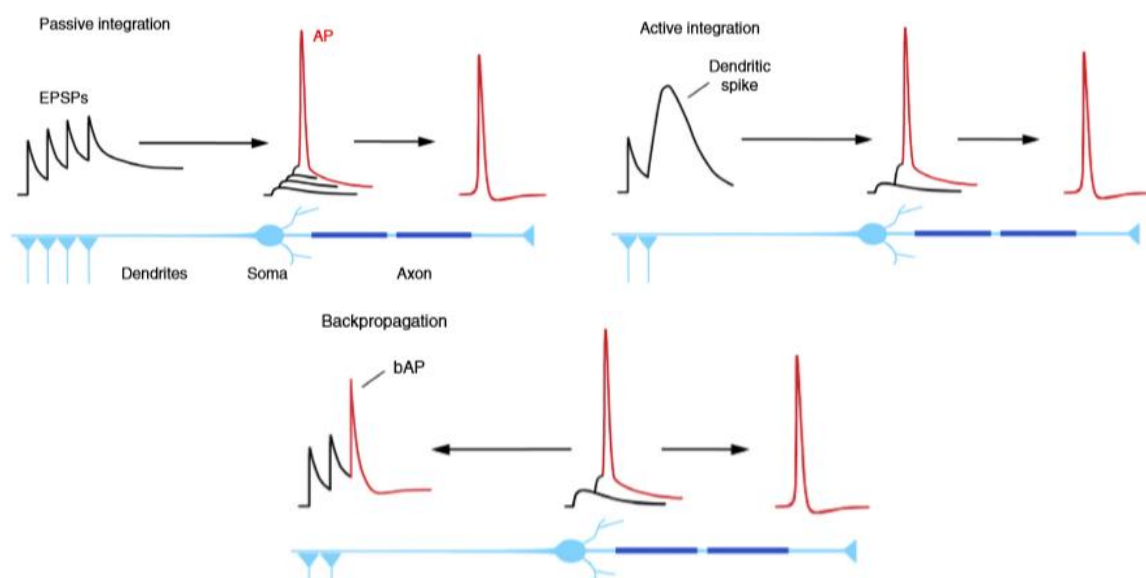
Az adott sejtet egy bizonyos küszöbszint feletti nagyságú ingernek kell érnie ahhoz, hogy az AP létrejöhessen, amely az idegsejtek axonjának szómához közel eső végében alakul ki, majd terjed tovább az axon disztális vége felé.

2.2. Dendritműködés

Az AP kialakulását nagyban befolyásolja a dendritek működése, melyek funkcionálhatnak a beérkező szinaptikus potenciál passzív szűrőjeként, csökkentve az AP kialakulásának valószínűségét. A csillapodott, szóma felé irányuló jelek ilyenkor összegződnek.

Megfelelő intenzitású, akár a dendritre specifikus bemeneti jel érkezésére, azok aktív választ is adhatnak. A dendritek felől pre-potenciálok generálódnak, megelőzve és elősegítve az AP kialakulását, erősödését. Ez a dendritek feszültségfüggő csatornáik működése révén valósul meg. Így ezek a nyúlványok is rendelkeznek az axonhoz hasonló, aktív elektromos tulajdonsággal.

Az AP továbbá az axon terminálistól ellentétes irányba is visszaterjedhet a dendritfa irányába (bAP, visszaterjedő AP), amely szintén hozzájárul a szinaptikus bemenet hatásához. A jele szummálódhat a Na^+ -csatorna működése során bekövetkező jellel, amely AP-t indukálhat. Ezt nagyban meghatározza azonban a dendritfa szerkezete és a Na^+ , K^+ csatornák sűrűsége (2.2.1. ábra).



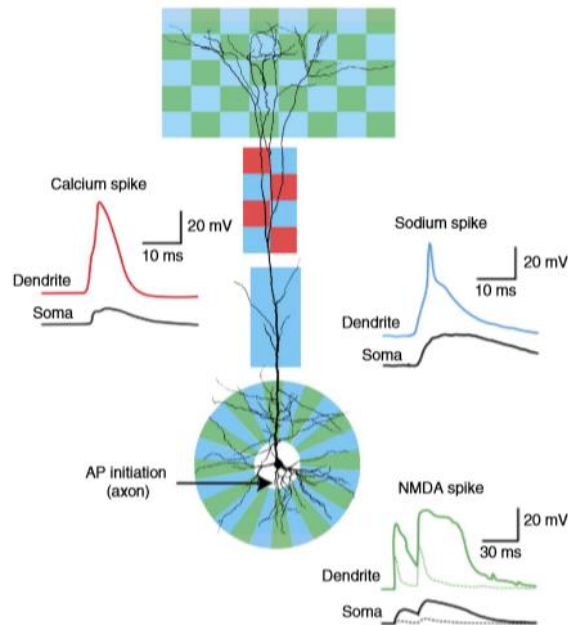
2.2.1. Ábra: A dendritműködés befolyásoló hatása az AP kialakulására².

Az elektromos aktivitásban lezajló spontán oszcilláció megnyithatja a feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornákat a dendritek membránján. Szinaptikus aktiváció során ezek szintén megnyílnak.

A dendriteken általában Na^+ -, K^+ -, Ca^{2+} - és HCN- (hiperpolarizációs kation csatorna) csatornák helyezkednek el. A jelfeldolgozás során lehetnek AND, OR vagy AND-NOT jellegűek. Az AND esetén elégséges a működés kiváltásához a megfelelő nagyságú szinaptikus bemenet, míg OR működés esetén speciális szinaptikus jelkombináció szükséges, a megfelelő lokalizációjú dendritekre. AND-NOT jellegű működés inhibíció esetén lép fel, például GABA receptor által.

2.3. Ioncsatornák

Az idegsejtek aktivitási mintázatát, a potenciálok kialakulását különböző időbeli lefutású ioncsatornák (2.3.1. ábra) nyitott és zárt állása közötti váltakozás alakítja ki. Tehát a megnyílt csatornák csak egy bizonyos idő elteltével fognak bezáródni.



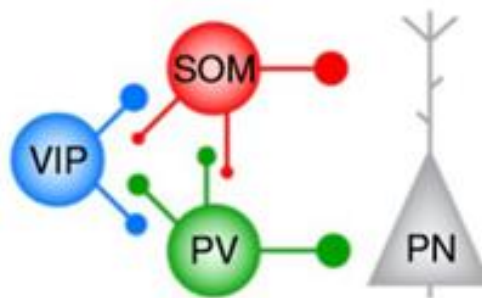
2.3.1. Ábra: A különböző időbeli lefutással rendelkező ioncsatornák működésének grafikus ábrázolása és ezek lokalizációja a neuronon².

A Na^+ -csatornák jellegzetesen rövid (kevesebb, mint 5ms), keskeny időbeli lefutással jellemezhető csatornák, melyek jellegzetesen AP hiánya esetén aktívak. A Ca^{2+} -csatornák ennél szélesebb (10ms körüli) nyitott állással jellemezhetők és a depolarizációban játszanak fontos szerepet. Az NMDA (N-metil D-aszpartát) csatornák ennél is hosszabb ideig lehetnek nyitott állapotban, melyek a szűkebb keresztmetszetű dendritnyúlványokra jellemzők. A hosszabb időtartományon nyitott, jellemzően a Ca^{2+} - és az NMDA-csatornák működése hozza létre a plató-fázisokat, amelyek ezáltal érzékenységet, plaszticitást és szelektivitást kialakításában játszik szerepet. A Na^+ és a Ca^{2+} - csatornák együttes működése az irány szelektivitásban vesz részt.

2.4. Kérgi neuronok

A nagyagy működése kolumnális, oszlopos organizációval bír. A neokortexen belül hat mélységi szintet, réteget különböztetünk meg. Jellemző a sejtek közötti szoros vertikális kommunikáció, míg a szomszédos sejtekkel egészen minimális is lehet az információcsere. A

szinteken belül eltérő arányokban találkozhatunk a felépítésében részt vevő sejtekkel, melyek között megtalálhatóak principális neuronok, interneuronok, melyek között vannak gátló és csillagsejtek³, valamint különböző gliasejtek, melyek nagy morfológiai diverzitással bírnak és az emberi agy sejtjeinek felét alkotják⁴. Számos feladat mellett részt vesznek az immunitásban (mikroglia sejtek), a tápanyagellátásban (asztrociták) és a véragygát (ependima sejtek) kialakításában. A kéregállomány körülbelül 85%-át glutamaterg, serkentő piramis sejtek töltik ki. Ezek döntően a kettes és az ötös számú rétegben találhatók. A maradék, nagyjából 15% GABAerg gátlóneuron, melyek nagy diverzitást mutatnak, emellett nagyobb hányaduk a lokális mikrohálózatot szabályozza, néhány száz mikrométeres nyúlványaik segítségével. Ezen gátló interneuronok között találhatók a szomatosztatint (SOM) és a parvalbumint (PV) expresszáló sejtek, melyek aktív működés során képesek gátolni a serkentő piramis sejtet (2.4.1. ábra). Mind a két típus közvetlen szinaptikus kapcsolatot teremt a piramis sejttekkel, azonban a PV+ sejtek jellemzően a serkentőneuronok szómájához közel eső, míg a SOM+ sejtek azok szómától távol eső dendritikus régióit kötik össze nyúlványaikkal⁵.



2.4.1. Ábra: A diszinhibícióban részt vevő neuronok kapcsolata. A folyamatot kiváltó inger lehet hang, vizuális stimuláció vagy bármi egyéb.

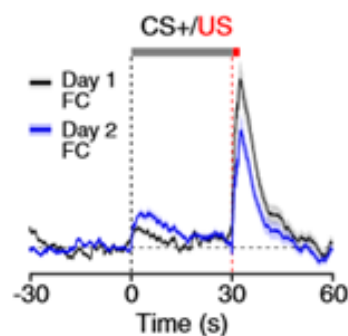
Valamint léteznek olyan neuronok is, melyek képesek más GABAerg neuronokat gátolni, köztük a már korábban ismertetett gátlóinterneuronokat is, ezáltal diszinhibíciót képesek létrehozni és aktivitásukkal a piramis sejtet közvetetten aktiválni. Ezen kívül kapcsolatot létesíthetnek piramis sejttekkel is. Ezek a neuronok vazoaktív intesztinális polipeptidet (VIP) választanak ki⁶, mely egy 28 aminosavból előálló molekula.

2.5. VIP gátló interneuronok

A VIP sejtek egyik legfontosabb tulajdonsága, hogy diszinhibitorként piramis sejtet aktiválhatnak. Továbbá részt vehetnek lokális szenzorként, valamint hosszú hatótávolságú

tulajdonságokkal is rendelkezve szinkronizálhatják a piramissejtek működését. Gyors neuromodulációt válthatnak ki kolinerg (AChR) és szerotonerg receptorok expresszáásával. A neuromodulátorok olyan vegyületek, melyek képesek megváltoztatni az idegsejtek közötti kapcsolatok hatékonyságát, pozitív és negatív irányban is azáltal, hogy az ingerületátvitel során a sejt elektromos töltését szolgáló ioncsatornák aktivitását modulálják. Fontos szubkortikális molekulák, melyek szerepet játszanak a különböző tanulási folyamatokat kísérő neurális hálózatok átrendeződésében, a neuronok újraszerveződésében, a plaszticitás alakításában. Létrejön az új aktivitási mintázat, kialakul a megfelelő diszinhibíció és ez alapján fog kialakulni a megfelelő, megtanult válaszreakció⁷. Ettől eltérően a neurotranszmitterek azok a molekulák, amelyek a kémiai szinapszisban a jelátviteli anyagot képviselik. A VIP molekula feltehetően neurotranszmitterként vagy neuromodulátorként működhet. A VIP sejtek monoszinaptikus bemenettel rendelkeznek számos neuromodulációs központtól, közvetlen kapcsolatokon keresztül is, melyek kolinerg, szerotonerg, illetve dopaminerg magok lehetnek.

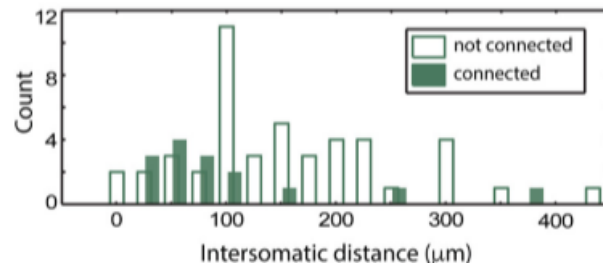
A VIP sejtek aktiválódhatnak a különböző stimulusokra, majd bizonyos ismétlési szám után kialakulhat egy tanult válaszreakció. Váratlan veszélyhelyzet, vagy büntető jel esetén kimagasló mértékben aktiválódnak, melyek az ismételtetések során csökkenő amplitúdóval jelennek meg (2.5.1. ábra). A VIP sejtek hasonlóképpen reagálnak a jutalmazó és a büntető jel esetén is.



2.5.1. Ábra: A stimulusok ismétlésével a sejtválasz mértéke csökken⁵⁾.

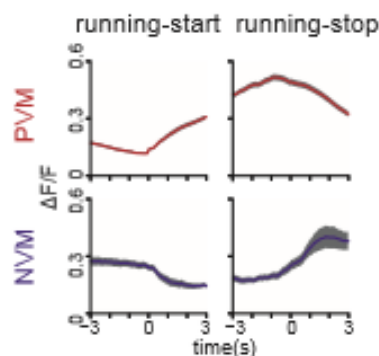
A VIP sejtek direkt kapcsolatot is kialakíthatnak piramissejtekkel, melyeket így képesek azonnal gátolni. Emellett nagyobb arányban létesítenek kapcsolatot SOM-sejtekkel, mint PV-intenreuronokkal, melyek aktív működés során a piramissejteket gátolják. Mivel a VIP-ek axonjai keskenyebb, vertikális lefutásúak, mint az általa befolyásolt interneuronoké, a sejt gátló hatása a nyúlvány körüli közvetlen henger térfogatába koncentrálódik (2.5.2. ábra).

Ezáltal a SOM sejtek által kifejtett „szőnyegszerű”, nagyobb kiterjedésű laterális gátláson képesek pontszerű diszinhibiciót létrehozni. A hozzájuk közelebb eső neuronok lesznek érintettebbek⁸.



2.5.2. Ábra: VIP-SOM sejtkapcsolatok távolságeloszlása a kapcsolódó és a nem kapcsolódó sejtekre kapott értékek ábrázolása.

A VIP sejtek különböző mértékben fejezhetnek ki calretinint (CR) és a kolecisztokinint (CCK). Ez befolyásolja, hogy az adott sejt, egy adott ingerre milyen irányú választ ad (2.5.3. ábra). Megfigyelték, hogy a Hippocampus CA1 régiójában lévő VIP sejtek megbízható jelleggel reagálnak azonos irányban az egér futás sebességének változására, a CCK tartalmuktól függően. A CCK- sejtek pozitív korrelációt, míg a CCK+ sejtek negatív mutattak a futási sebességgel.



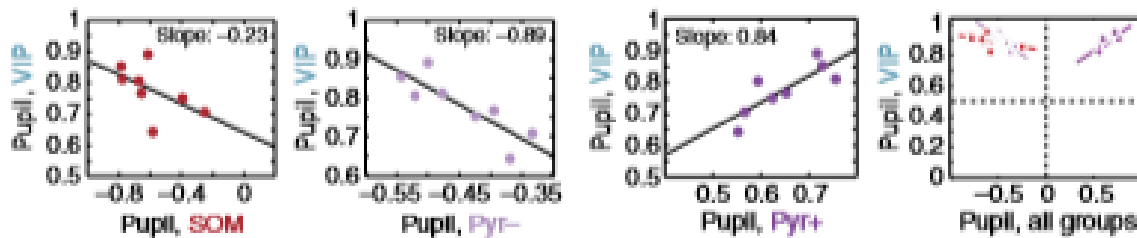
2.5.3. Ábra: Az eltérő kolecisztokinin tartalmú VIP sejtek reakciója a futásra.⁶

Érdekes, hogy a VIP sejtek egy csoportja a Hippocampus CA1 régiójában az egér futásakor aktív, míg egy másik a megállást követően mutat nagyobb aktivitást. A sejtpopuláció egyes csoportjainak aktivitása az egér futási sebességével pozitívan, míg a másik csoport negatívan korrelál¹⁶.

2.6. Neurontípusok aktivitása

Az egyes neurontípusok eltérően reagálnak a különböző stimulusokra, gyakran az elhelyezkedésük is befolyásolja őket. Például a frontális kéregben az egér futási sebességéhez

és a pupilla átmérő méretének változásához képest pozitív és negatív korreláció is megfigyelhető az L2/3-as réteg piramissejtjeiben (2.6.1. ábra). Ellenben a V1-re a piramissejt elnyomás nem jellemző ezeket a paramétereket vizsgálva. Továbbá a VIP sejt és a piramissejt közötti közvetlen, erős kapcsolatra utal a nagy negatív korreláció.⁹ Valamint a mozgás hatása gyakran vált ki aktivitást a sejtekből.



2.6.1. Ábra: A neurontípusok aktivitása a VIP sejtekhez képest, a pupillaméret függvényében.

A V1 interneuronjai két fő műveleti formát követhetnek. Az egyik a size tuning, amely az aktivitás elnyomását jelenti, amikor vizuális stimulus túlnő egy adott nagyságon, ami valószínűleg az SST sejtek szomatosztatin termelésével függ össze, amely integrálja a kortex kiterjedt régióiból beérkező jeleket. A másik a locomotor modulation, amely a mozgás hatására bekövetkező tüzelési moduláció, ami beindítja a diszinhibíciós hálózatot. A folyamat eredményeként VIP termelődik, mely gátolja az SST sejtek működését és ezáltal diszinhibeálja az ezekhez a SST sejtekhez kapcsolódó piramissejteket. Ez a két forma magyarázza a hálózat anatómiai és működési viszonyait (2.6.2. ábra). Az SST sejtek egymást nem gátolják, valamint a mozgás általi moduláció minden sejtípus esetén kritikusan függ a kiváltó stimulus méretétől és ez a válasz alapvetően eltér a spontán aktivitásból adódó jelenségektől, V1-ben.¹⁰

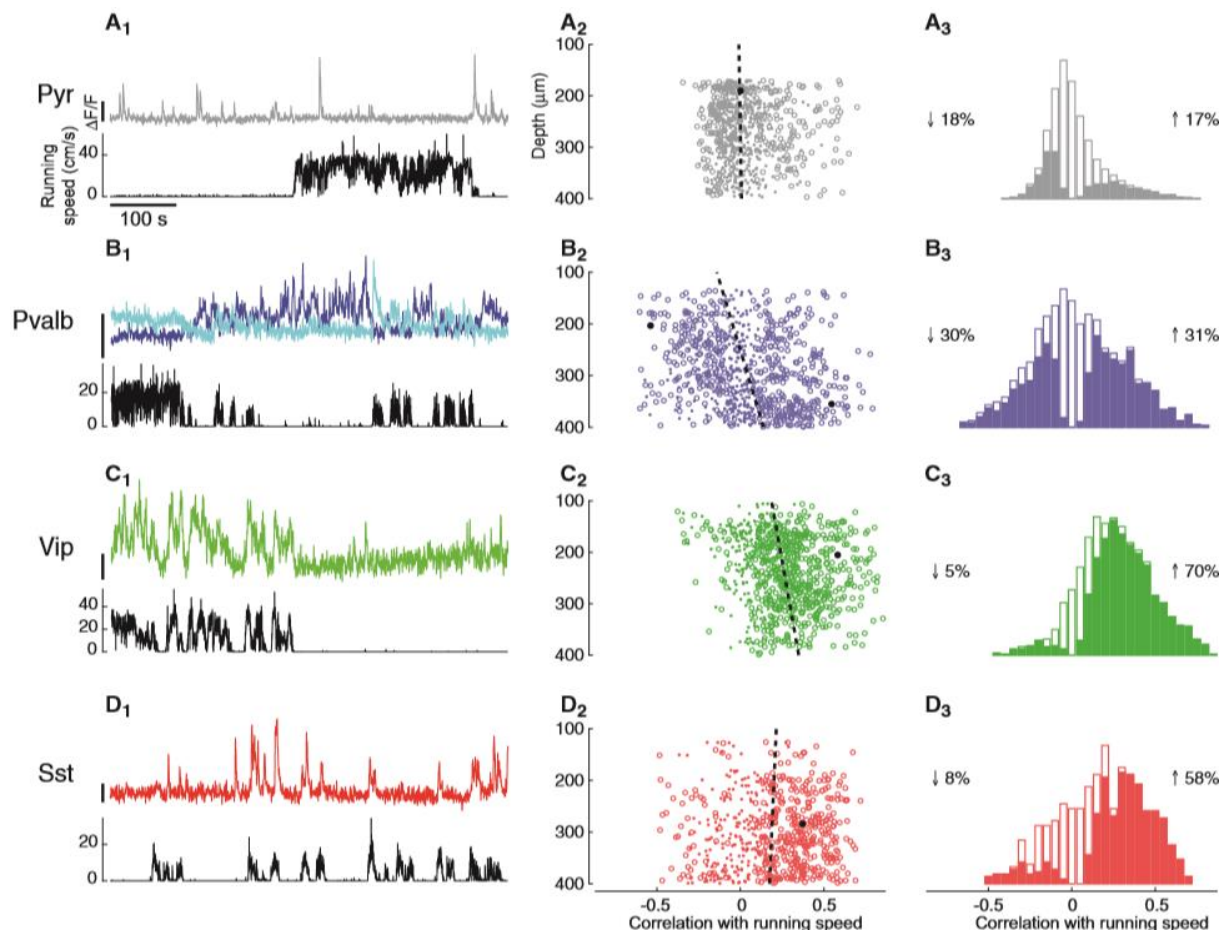
A VIP sejtek alapvonaljele a mozgásra döntően pozitív korrelációval válaszol. Az aktiváció hatása a mélyebb struktúrák irányában egyre szignifikánsabbá válik vizuális stimuláció mellett. A stimulus méretétől függően változik az aktivitás növekedése. Kisebb stimulusok esetén jelentősebb növekedés mérhető, míg a nagyobb stimulusok alkalmazásakor ennek jelentősége már nem tart ki. Tehát a VIP sejtekre jellemző a size tuning jelenség.

A SOM sejtekre pozitív korreláció jellemző, amely a mélységgel csökken mozgás és vizuális stimuláció mellett. Az alapjel aktivitása azonban mélységtől független. A vizuális inger hiányában viszont negatív jelleget mutatnak. A nagyobb stimulusokra jobban reagálnak, de vannak közöttük size tuningot mutató sejtek is. Ennek oka lehet ezen sejtek nagyfokú szenzitivitása a stimulus helyzetének középpontját illetően. Megvizsgálták a size tuning változását a receptív mező középpontja és a stimulus középpontja közötti távolság

függésében. Kis távolság esetén jelentkezett a size tuning hatás, nagyobb távolság esetén a mozgás hatása került előtérbe.

A PV sejtek alapjelére erősebb hatás és nagyobb mélységbeli függés áll fenn. Pozitívan és negatívan korreláló sejtek is megtalálhatók közöttük, ezek aránya a mélységgel változik. Az alapvonal jelénél túl, a sejtek aktivitása a felszín közelében csökken a futási sebesség növekedésével, azonban a mélyebb rétegekben már emelkedés figyelhető meg. Ezen felül mozgás hatására szignifikáns emelkedést mutatnak és szelektívek a kisebb stimulusokra.

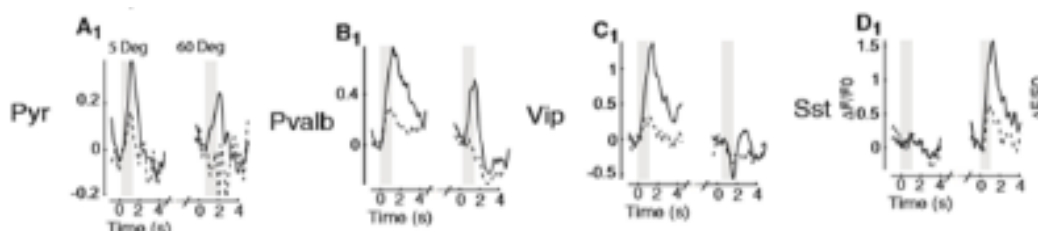
A piramis sejtek alapvonal jele nem mutat mélységbeli függést és az aktiválódásuk hatással lehet a szomszédos, azonos típusú sejtekre is. Az átlagos korrelációjuk 0 közeli értéket mutat, de a sejtek több, mint harmada egyértelmű korrelációt mutatott pozitív vagy negatív irányba.



2.6.2. Ábra: A mozgás hatása az alapvonalra a sejtípus és sejtmélység függésében. Az első oszlopban láthatók a neuronok aktivitása (színessel) és a futási sebesség (fekete). Mellettük az egyes sejtek aktivitásának a korrelációja a mélység és a futási sebesség függésében. A körök jelzik a $p < 0.05$ -nél szignifikáns korrelációt mutatott sejteket, pontokkal a nem szignifikánsakat. Szaggatott vonal mutatja a mélységtől való, illesztett korreláció függést. Fekete kör jelzi az első oszlop sejtjét. A harmadik oszlop a pozitív és negatív korrelációt mutató sejtválaszok hisztogramját ábrázolja.

Az egyes interneuron típusok eltérő jellegű kapcsolatokat tartanak fenn a piramissejtekkel. Ez a kapcsolat VIP sejtekkel és SOM sejtekkel nemlineáris jelleget mutat, melyek egymástól eltérőek. A VIP sejteknél spontán aktivitás és zaj mellett is pozitív korreláció áll fenn piramissejtekkel, amely gyengébb, mint a PV-piramissejt kapcsolat esetén. A nemlineáris jelleg adódhat a VIP sejtekre jellemző size tuning hatás (2.6.3. ábra) miatt, mely miatt ezen sejtek a kisebb stimulusoknál válaszolnak. A SOM sejtek kapcsolata pozitív korrelációt mutat, ami mozgás hatására gyengébb, az alap nemlineáris kapcsolathoz viszonyítva. Zajra szintén pozitív korreláció érvényesül.

PV sejtekkel viszont erős, lineáris kapcsolat figyelhető meg, mely mozgás mellett és hiányában is fennáll, valamint hanghatásokra is érvényes.



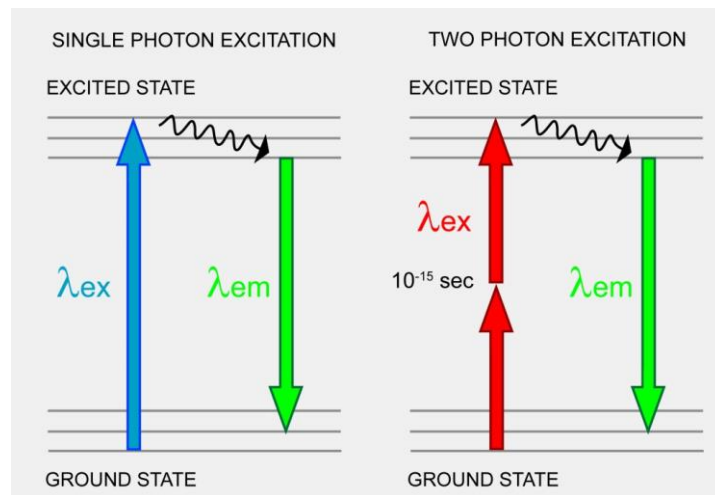
2.6.3. Ábra: A különböző nagyságú stimulációk által kiváltott válasz az egyes sejtípusokban.

2.7. Két-foton mikroszkóp

Mérési elv:

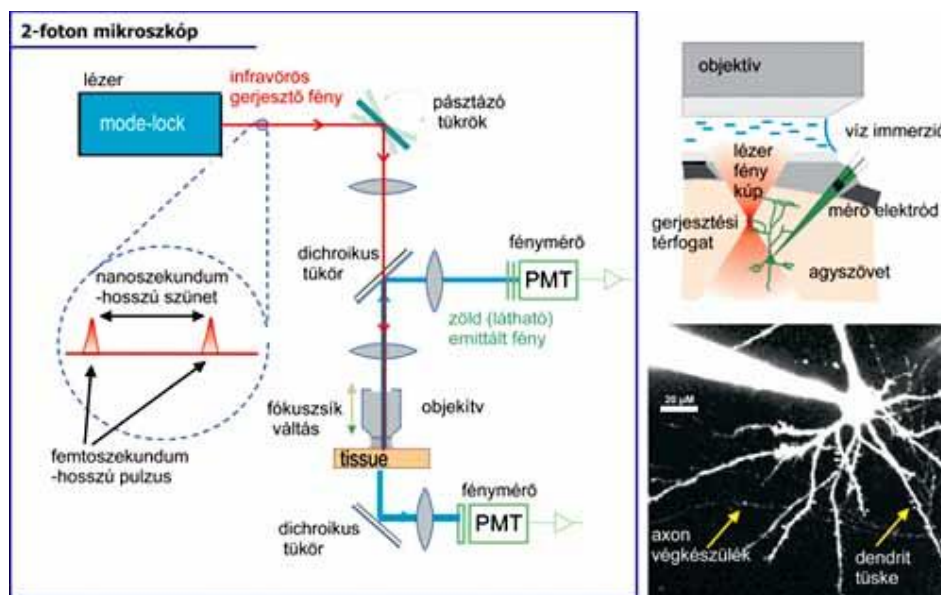
Az idegrendszerben végbemenő dinamikus változó folyamatok regisztrálásához szükséges egy ehhez megfelelően alkalmazkodó, szükségszerűen nagy tér- és időbeli felbontással rendelkező eszköz. Ennek az igénynek a mértékét meghatározza a vizsgálni kívánt rendszer működésének kinetikája, valamint az objektumnak a térbeli kiterjedése. A különböző vizsgálati módszerek lehetővé teszik a megfigyeléseket az egyes ioncsatornák funkcionalitásától egészen a komplex neuronhálózatokig. Ezeknek a kritériumoknak megfelel a 2-foton mikroszkóp, abban az esetben, ha olyan jelzőmolekulát, indikátort használunk a vizsgálni kívánt területen, amely megfelelő tartományon (IR) nyel el és képes ennek a hullámhossznak a felén, a látható tartományon fényt kibocsátani. Ez úgy lehetséges, hogy a másodrendű folyamat során beérkező két foton egyszerre abszorbeálódik (femtosekundumos nagyságrendű időn belül [10^{-15} s]), ennek eredményeképpen pedig energiájuk összeadódik (2.7.2. ábra). A mérés során a háttérzaj elhanyagolhatóvá válik, mivel csak abban az esetben fog lejátszódni a megfelelő intenzitású fluoreszcencia jelensége,

amennyiben a két foton egyidejűleg nyelődik el. A kívánt jelenség a fotonsűrűség négyzetével arányos¹¹. A lézerimpulzus fókuszpontjában fog keletkezni a megfelelően nagy fluoreszcencia intenzitás.



2.7.2. Ábra: Fluoreszcencia jelensége: Megfelelő hullámhosszon történő gerjesztés esetén a molekula gerjesztett állapotba kerül. Ebből az állapotból igyekszik visszatérni alapállapotba, miközben az energiatöbbletet egy a gerjesztéstől eltérő hullámhosszú foton kisugárzásával adja le.¹²

A mérésekhez továbbá olyan festékmolekulát célszerű használni, amely abszorpciós hatáskeresztmetszetének változása a vizsgálni kívánt jelenséghez köthető. Ilyen például a gyakorlatban elterjedt, Ca^{2+} -koncentráció változásra bekövetkező konformációs-változás, mely az idegsejtek akciós potenciálja során jelentősen megnő intracellulárisan. Továbbá ide tartozik a membránpotenciál változására érzékeny indikátormolekula is, azonban ez még kevésbé jó hatásfokkal működő lehetőség.



2.7.3. Ábra: 2-foton mikroszkóp felépítése¹³.

Az eszköz előnyei más mérési elrendezésekhez képest:

A két-foton effektusnak köszönhetően megszabadulunk a konfokális mikroszkópok használata esetén fellépő háttérzajtól. Az indikátor csak a fókuszolt egy kis forgási ellipszoid alakú terében ($0,3 \times 0,3 \times 1 \mu\text{m}^3$) gerjed a 2-foton effektushoz szükséges intenzitásküszöb felett, emissziót eredményezve, ami javítja a felbontóképességet is, valamint elkerülhető a festékmolekula túlgerjesztése (photobleaching), valamint a vizsgált terület túlzott gerjesztése során végbemenő károsodás, a fototoxicitás¹⁴. Az összeállítás a fókuszpontban keletkező, de az útja során megtörő jelet is képes detektálni (2.7.3. ábra). Mivel a minta sokkal kevésbé károsodik a mérések alkalmával, ezért a struktúra alkalmas in vivo megfigyelésekre is. A penetráció során a nagyobb hullámhosszú fotonok képesek mélyebbre hatolni a szövetben, akár az 1000 μm -es távolságot is meghaladva¹⁵. A rendszer az összes emittált fényt hivatott rögzíteni, így nagyobb detektálási látószöggel rendelkezik. Emiatt elégséges a kisebb energiájú besugárzás használata. A gerjesztő lézerfény hullámhosszát az általunk használt indikátormolekula gerjesztési maximumához lehet hangolni. Emellett lehetővé vált a minta nagy felbontású (kHz<) időbeli pásztázása különböző lekövetési algoritmusok felhasználásával. Akár dendritek időbeli működése is vizsgálhatóvá vált¹⁶.

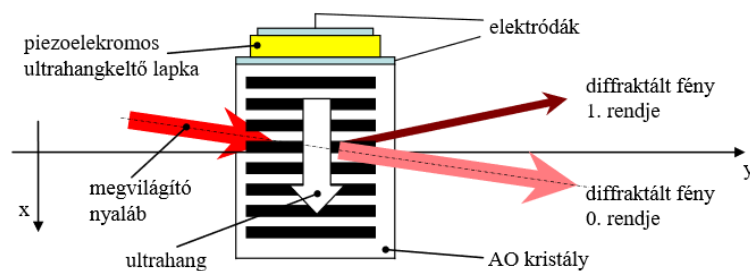
Használt mikroszkópok:

A gyakorlat során több mikroszkóppal is mértem. A Femtonics Kft. által fejlesztett DualScan architektúra két különböző letapogatási eljárást képes megvalósítani tandem konfigurációban, elkülönült fényutakkal. Ezek között szoftveresen vezérelhető tükör felelős a váltásért. Az egyik módszer a rezonáns pásztázás, amely adott rácsvonal mentén halad. Sejtpopuláció aktivitást kellőképpen nyomon lehet vele követni nagy felbontás mellett, azonban térfogati vagy tetszőleges trajektória mentén történő letapogatásra nem alkalmas. A változtatható fényút mellett a galvanometrikus szkennerral lehetséges az x-y síkban történő fókuszpont változtatás, amellyel már nyúlványok is vizsgálhatók, bár kisebb sebességgel, mint a rezonáns módszerrel.

AO 3D 2-foton mikroszkóp:

Az idegrendszeri kutatások legkorszerűbb, in vivo megfigyelésre is alkalmas, nagy felbontással rendelkező, újgenerációs mikroszkóp, mely napjainkban a cutting-edge technológia részét képezi. Olyan mérési lehetőséget biztosít, amellyel lehetséges a minta nagy

térfogatában, sok együttesen kijelölt sejt aktivitásának mérése kvázi szimultán. Ehhez azonban szükség volt a fókuszpont 3 dimenzióban történő, nagy gyorsaságú, tetszőleges megváltoztatására. Ezt úgy valósították meg, hogy a pásztázó lézerfény útját akusztiko-optikus (AO) módon térítik ki és így fókuszálják a kívánt koordinátába (2.7.4. ábra). A nyaláb egy nagy törésmutatóval jellemezhető AO-kristályon (Tellúr-dioxid) halad keresztül, amely a pozícionáláshoz szükséges frekvenciájú ultrahanghullámokkal van rezegtetve, ezáltal befolyásolva a kilépő nyaláb útját.



2.7.4. Ábra: AO eljárással modulált lézerfény¹⁷.

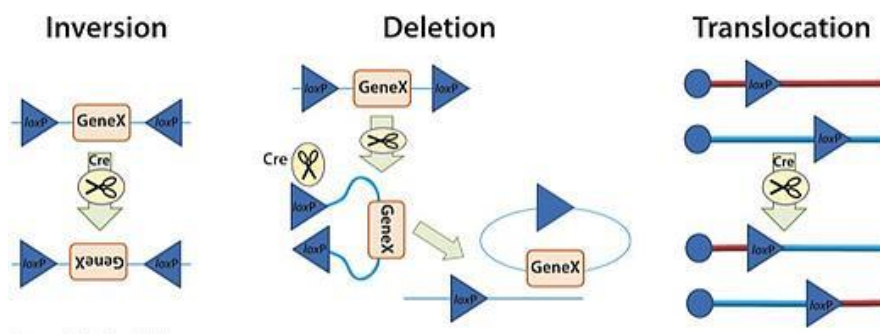
A mikroszkóp különlegessége, hogy képes az x-y síkbeli és a z mélységbeli fókuszállást szeparálni a nagyobb vizsgálandó térfogat érdekében. Széles látószögű objektívvel és ultrahanghullámok által vezérelt optikai ráccsal van felszerelve. Mivel kevesebb mechanikai alkatrészt tartalmaz, mint a korábban ismertetett, tükrök mozgatása által fókuszálló mikroszkóp, ezért gyorsabb fókuszpont váltás történhet meg vele.

2.8. Virális transzdukció

Az agyban végbemenő változások nyomon követésére, az AP-k in vivo megfigyelésére megfelelő indikátorra van szükség. Ez azonban természetes körülmények között nincs jelen a szervezetben, ezért mesterségesen kell bevinnünk a rendszerbe. Neuronok vizsgálatánál célszerű a Ca^{2+} -szint váltakozását nyomon követni, mely akár 100-szorosára is emelkedhet az AP alatt az 50-100nM-os nyugalmi értékről kiindulva. Ehhez genetikailag kódolt Ca^{2+} -indikátort (GECI) szoktak használni. A jelzőmolekula bevitelének egyik lehetséges módszere a virális transzdukció. Ennek során a méréshez alkalmas fehérje jellegű indikátormolekulát fejeztetjük ki a vizsgálni kívánt sejtekben virális vektor segítségével. A DNS-vírus egy nem replikálódó kódoló régiójához adják a felhasználni kívánt szekvenciákat, amelyek megfelelő helyre kerülve hatékonyan, hosszú távon kifejeződhetnek. A módszer specifikusságának szabályozására

számos eljárás létezik. Ilyen például a Cre-lox rendszer is (2.8.2. ábra), amely lehetővé teszi, hogy az adott szekvencia csak bizonyos, szűk határok közé korlátozott sejtekben fejeződhessen ki. Ilyenkor egy enzimen keresztül történik a rendszer biztosítása. A vektor bejut a sejtekbe, de csak az enzimet kifejező célsejtekben fog végbemenni az idegen DNS expressziója. Az ilyen célsejteket tartalmazó egyedek transzgén állatok és az enzim is egy mesterséges génszekvencia terméke, melyet rekombináns DNS technológiával lehet létrehozni.

Mivel a munka során döntően Cre-egereket használunk ezért ezt részletesebben is ismertetném. A transzkripció a megfelelő promóter régió felismerését követően indulhat el. A transzgén állatok célsejtjeiben jelenlévő Cre-rekombináns enzim felismeri a lox szekvenciákat tartalmazó idegen génállományt és amennyiben a lox régiók a szekvencián belül ellentétes orientációban vannak, aktivitása következtében megfordítja őket. Ha a mi szekvenciánk ettől a lépéstől kezdve a lox-szekvenciával együtt megfelelő orientációba kerül, az alkalmas lesz transzkripcióra.^{18 19} Ezt követően az egyik lox szekvencia kivágódhat a Cre enzim által, amit követően már nem tud befolyásolni.



2.8.2. Ábra: A Cre-lox rendszer működése.²⁰

A gyakorlat során AAV (adeno asszociált vírus) vektort használunk, mely kis fehérjeburka miatt könnyen képes behatolni a sejtekbe. A gazdasejt genomjával képes integrálni és nem a neuronokra nézve csak kevésbé toxikus. A transzdukción átesett sejtek 1-2 hét elteltével kezdik el expresszálni a kívánt fehérjéket.

A jelzőmolekuláink között gyakran szerepel a kalmodulint tartalmazó, zölden fluoreszkáló GCaMP6f, mely széleskörűen elterjedt és lehetővé teszi akár egyetlen AP detektálását is. Az indikátorcsaládnak különböző kinetikájú típusai is vannak, jelen esetben az f a gyors kinetikára utal. a gyorsaság és az érzékenység fordított arányosságban áll egymással. Azonban a gyors kinetikájú reakciók lefolyása végett, amelyeket vizsgálunk, ez elengedhetetlen tulajdonság.

Egy másik, gyakran alkalmazott jelölő a szintén Ca^{2+} -érzékeny CaM-kináz, valamint a FusionRed olyan molekula, amely gerjesztés hatására megváltoztatja a Cl^- -csatorna konformációs szerkezetét, így elősegíti a klorid sejtbe áramlását. Ennek hatására az AP keletkezése elmarad, mivel a beáramló Na^+ -ionok hatása nem érvényesül.

2.9. Pavlovi kondicionálás

A tanulási folyamatok vizsgálatok során gyakran alkalmazzák a pavlovi kondicionálást. ennek lényege, hogy a tanulás során egy feltétlen választ vagy reflexet kiváltó inger (US) kapcsolunk egy feltételes ingerhez (CS). A tanulás végbemenetelét követően a feltételes ingerre is be fog következni a korábbi feltétlen válasz. A kondicionálást befolyásolja a predikció, valamint a meglepődés mértéke. Ha a feltételes ingert nem követi a reflexet kiváltó inger, a kialakuló reakciók egyre csökkenő mértékben fogják követni egymást.^{5,21} A neurális tanulásban, valamint a döntéshozatalban szerepet játszhat a dopaminrendszer is. Abban az esetben, ha az ingerben bekövetkező változás eltér a feltételezettől, hibajelzés keletkezik, mely összefügg a válaszreakcióval. A működése során jutalmat közvetít az agy felé, elősegítve a döntéshozatalt. Abban az esetben, ha az ingert követő jutalom bekövetkezési valószínűsége nagy és ezt az alany már megtanulta, azonban a jutalom még nem következett be, akkor a dopaminrendszer aktív működése várakozásra ösztönzi.²²

3. ELVÉGZETT FELADATOK:

Állatkísérletek:

Napjainkban a leggyakrabban alkalmazott kísérleti állat a laboregér, annak gazdaságossága, könnyű eltarthatósága, gyors reprodukciója miatt. A kísérletek lebonyolítása érdekében a mikroszkópos méréseket megelőzően injektálást kell végrehajtani az egereken különböző vírusvektorok felhasználásával. Az adott, jelölni kívánt sejtpopulációt a korábban ismertetett módon, valamely specifikus jelölési eljárásnak megfelelően célszerű jelölni, hogy csak a kíván sejtekben legyen expresszió, de ott megfelelően játszódjon is le. Egymás után több sejttípust is meg lehet jelölni, eltérő fluoreszcenciát adó jelzőmolekulák segítségével. A munkám során a vizuális neokortex (V1) L2/3-as rétegében lévő piramis sejtek kerültek jelölésre 300 μm -es, valamint a VIP interneuronok, 800 μm -es mélységben. A jelölést követő

7-14 nap alatt bekövetkezik a bevitt gének expressziója. A sejtek ezeket a termékeket nem tudják teljes mértékben eliminálni, ezért egy idő után felhalmozódnak.

Az injektálással egybekötve, vagy az azt követő 1-2 hétben craniotómiás műtétet kell végezni, amely során láthatóvá teszik az injektálás során megjelölt sejteket.



3.5.2. Ábra: A bal oldali képen az ablak helyének kijelölése látható, középen az injektálás helyével. A középsőn az ablak, jobb oldalon pedig a befogó került rögzítésre.

Egy üveglap kerül beépítésre, mely fogorvosi cementtel rögzül a kötőszövetektől rendesen megtisztított koponyacsont felszínére az eltávolított részt körülvevő területen. Ezt követően egy fém befogó is rögzítésre kerül, mely segítségével az egér rögzítésre kerül a set up-ban (3.5.2.).

A műveletek izoflurán inhalációt követő fentanilos narkózisban történnek. A beavatkozások közben ügyelni kell, hogy a mérés szempontjából fontos látás ne sérüljön sem a periférián, sem a magasabb feldolgozási szinteken. Az egér szemét védeni kell a kiszáradástól.

4. ÖSSZEGZÉS:

Az elméleti háttér megismerése és az irodalmazás mellett 5 egeret injektáltam különböző vektorkészítményekkel, melyekkel piramissejteket és VIP sejteket jelöltem meg egerek neokortexében a V1 régióban. 7 egeret megműtöttem, amelyek közül kettőnek igazoltuk a jelölés sikerességét AO 3D mikroszkópos méréssel, viszont ezeket az injektálásokat nem én végeztem. A félév során a gyakorlat szempontjából a munkafolyamatok elsajátítása volt a cél, mint az injektálás és a műtét kivitelezése. Konkrét feladatokat a következő félévtől fogunk végezni.

5. HIVATKOZÁSOK:

¹<http://tamop-sport.ttk.pte.hu/tananyagfejlesztes/mozgasszabalyozas/02>; 5. March 2016.

²Dendritic integration: 60 years of progress; G. J. Stuart, N. Spruston; Volume 18 | Number 12 | December 2015.

³http://semmelweis.hu/anatomia/files/2017/09/Alpár_A-nagyagykéreg-szerkezete.pdf; 09. 2017.

⁴Realising their true potential; A. Butt, A. Verkhratsky; Neuroglia; First Published December 4, 2018.

⁵Adaptive disinhibitory gating by VIP interneurons permits associative learning; S. Krabbe, E. Paradiso, S. d'Aquin, Y. Bitterman, J. Courtin, C. Xu, K. Yonehara, M. Markovic, C. Müller, T. Eichlisberger, J. Gründemann, F. Ferraguti, A. Lüthi; Nature Neuroscience, Volume 22 1834–1843; November 2019

⁶Vasoactive Intestinal Polypeptide Expressing Interneurons in the Hippocampus Support Goal-Oriented Spatial Learning; G. Farkas Turi, Wen-Ke Li, S. Chavlis, A. Losonczy; Turi et al.; Neuron 101, 1150–1165 March 20, 2019.

⁷Cortical interneurons that specialize in disinhibitory control; H.-J. Pi, B. Hangya, D. Kvitsiani, J. I. Sanders, Z. J. Huang, and A. Kepecs; Nature, Volume 503, Number 7477, Pages 521– 524; 2013.

⁸Opening Holes in the Blanket of Inhibition: Localized Lateral Disinhibition by VIP Interneurons; X. Mahesh, M. Karnani, J. Jackson, I. Ayzenshtat, X. Azadeh Hamzehei Sichani, K. Manoocheri, S. Kim, R. Yuste; Neurotechnology Center, New York 10027; The Journal of Neuroscience, 36(12):3471–3480 3471; March 23, 2016.

⁹An inhibitory pull–push circuit in frontal cortex; P. G. J.-Clemente, T. Ikrar, E. Tring, X. Xu, D. L Ringach, J. T Trachtenberg; Nature America, Inc., part of Springer Nature; 23 January 2017.

-
- ¹⁰Vision and locomotion shape the interaction between neuron types in mouse visual cortex: M. Dipoppa, A. Ranson, M. Krumin, M. Pachitariu, M. Carandini, K. D. Harris; 2018, Neuron 98, 1–14 May 2, 2018.
- ¹¹Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen; M. Göppert-Mayer; Ann. Phys., Volume 401, Number 3, Pages 273-294, 1931.
- ¹²<http://blogs.cardiff.ac.uk/acerringtonlab/research-techniques/2-photon-excitation-jablonski-diagram/>; 07. November 2017.
- ¹³<http://www.termesztvilaga.hu/szamok/kulonszamok/k0602/lendvai.html>; 01. January 2004.
- ¹⁴Two-photon laser scanning fluorescence microscopy; W. Denk, J. Strickler, W. Webb; Science, Volume 248, Number 4951, Pages 73-76; 1990.
- ¹⁵Kétfoton mikroszkópia térben és időben, új mérési módszerek a kétfoton mikroszkópiában; B. Rózsa, G. Katona, B. Lendvai, S. Vizi E., and R. Szipőcs; MMT abstract; 2004.
- ¹⁶Hippokampális interneuronok dendritikus Ca^{2+} szignalizációjának mérése 2-foton pásztázó mikroszkóp technológiával; Doktori értekezés; Dr. Rózsa J. B.; 2006.
- ¹⁷<https://docplayer.hu/18284267-Akuszto-optikai-fenydiffrakcio.html>; 25. April 2020.
- ¹⁸Guide to Research Techniques in Neuroscience (Second Edition), Chapter 12 - Making and Using Transgenic Organisms; San Diego: Academic Press, Page 253–271; 2015.
- ¹⁹Construction of adenovirus vectors through Cre-lox recombination; S Hardy, M Kitamura, T Harris-Stansil, Y Dai, M L Phipps; Journal of Virology; March 1997.
- ²⁰<https://blog.addgene.org/plasmids-101-cre-lox>; 12. February 2020.
- ²¹Általános pszichológia 1–3. – 2. Tanulás – emlékezés – tudás; Csépe, Valéria, Győri, Miklós, Ragó Anett; 2007–2008.
- ²²Recent advances in understanding the role of phasic dopamine activity; W. Schultz; Department of Physiology, Development and Neuroscience, University of Cambridge; 24. September 2019.