

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

Sajátos hálózati motívumok a mediális entorhinális kéregben

Ph.D. téziszfüzet

Dr. Szőcs Szilárd

Témavezető: Dr. Varga Csaba

Programvezető: Prof. Dr. Zelena Dóra

Doktori iskola vezető: Prof. Dr. Reglődi Dóra



Pécsi Tudományegyetem,
Általános Orvostudományi Kar,
Élettani Intézet

Pécs

2025

1. Általános bevezető

1.1. Az entorhinális kéreg

Agyunk szűri, feldolgozza, tárolja és visszahívja azokat az információkat és eseményeket, amelyek segítségével tájékozódunk a térben és amelyek segítségével emlékeket alkotunk a múltból. Ezeket a bonyolult folyamatokat specifikus neuronális mikro- és makrohálózatok hajtják végre.

Általánosan elfogadott, hogy a temporális lebeny kulcsfontosságú a memória kialakításában és a térbeli navigációban. A kortikális és szubkortikális területekről érkező, meglehetősen heterogén információ először az entorhinalis kéregbe (EC) érkezik, amely a hippocampális formáció „kapujaként” szolgál. Ezenkívül a hippocampus által feldolgozott információ először ismét az EC-be kerül, ahonnan más, specifikus kérgi területekre kerül továbbításra. Az EC nemcsak továbbítja az információkat a hippocampális formációhoz és onnan tovább, hanem fel is dolgozza az adatok egy részét.

1.1.1. A rágszáló és a humán entorhinalis kéreg anatómiai felépítése

Az EC rágszálóiban onnan kapta a nevét, hogy részben a rhinális sánc (sulcus rhinalis) határolja. Az entorhinalis kéreg több kérgi terület veszi körül. A citoarchitektonikus kritériumok alapján az entorhinalis kéreg egy laterális és egy mediális területre osztható. A mediális entorhinális kéreg (MEC) hat rétegből áll, és kulcsfontosságú

szerepet játszik a navigáció, a tanulás és a memória alapjául szolgáló fiziológiai folyamatok kialakításában. A régió gyakran érintett egyes betegségek (mint az epilepszia és az Alzheimer-kór) korai patofiziológiai elváltozásaiban, így ismerete elengedhetetlen ezen betegségek megismerésében (Beed et al., 2010; Canto et al., 2008; Witter & Amaral, 2004).

A humán entorhinalis kéreg nagyobb és összetettebb a főemlősökhöz és más emlősökhöz viszonyítva. Úgy tartjuk, hogy ez a nagyobb méret és komplexebb felépítés az emberek fokozott kognitív képességeivel hozható összefüggésbe. Emberben az entorhinalis kéreg a halántéklebeny ventromediális felszínén található, és nyolc különböző részre osztható. Topográfiailag az emberi entorhinális kéreg nagyon hasonlít a nem humán főemlősökére. Az emberi és más nem-humán modellek lamináris szerveződése is hasonló; nincsenek jelentős különbségek, kivéve a Vc réteget, amely a főemlősöknél látható (Amaral & Insausti, 1990; R. Insausti et al., 1987, 1995; Ricardo Insausti, 2013; Witter & Amaral, 2021).

1.1.2. Az entorhinális kérgi hálózatok

A MEC, és maga az egész EC a hippocampális formáció kapujaként szolgál emberben, főemlősökben és más emlősökben is.

Klasszikus értelemben két fő pálya köti össze a MEC-t a hippocampuszal (HPC): a triszinaptikus pálya, amely a MEC II rétegét köti össze a DG-al és a CA3 régióval, és a hippocampusz CA1 régiójában végződik; valamint a MEC III rétegét a hippocampusz CA1 régiójával összekötő monoszínaptikus pálya (Steward &

Scoville, 1976; Witter et al., 2000). A MEC kimenetek a CA1-ben kerülnek integrálódásra, és közvetlenül vagy közvetve subiculumon keresztül térnek vissza a MEC V-VI rétegébe (Naber et al., 2001; Witter et al., 2000) vagy más kérgi és szubkortikális területekre (Cenquizca & Swanson, 2007; Fanselow & Dong, 2010).

1.1.3. A mediális entorhinális kéreg funkciója

A MEC egy fontos agyi régió, amely részt vesz a térbeli navigációban és a memória kialakításában embereknél, főemlősöknél és más emlősöknél egyaránt (Grande et al., 2022; Maass et al., 2015). Egyedülálló funkcionálisan fontos sejtípusai, az úgynevezett grid-sejtek. Ezek a sejtek térben periodikus tüzelési mintázatokat mutatnak, és kulcsfontosságúak a környezeten belüli pozíció kódolásában és az úgynevezett hexagonális grid-sejt mintázatok kialakításában. Grid sejteket találunk a MEC minden sejtrétegében, nagyobb arányban a felszíni, különösen a II. rétegben (Sargolini et al., 2006).

A MEC, mint az agy GPS-e, térbeli információkat továbbít a hippocampusz számára, döntő szerepet játszik az epizodikus memória és a térbeli memória kialakításában (Knierim et al., 2014). A fent említett grid-sejteken kívül a MEC-ben számos más, funkcionálisan fontos sejtípust is találunk, mint például border-sejteket, amelyek a környezet határait kódolják, és head-direction-sejteket, amelyek információt adnak az ember vagy állat térbeli orientációjáról (Bjerknes et al., 2014; Taube, 2007).

1.2. GABAerg sejtek az entorhinális kéregben

A MEC principális sejtjei erős gátló bemeneteket kapnak, mind spontán felszabaduló GABAerg (Greenhill et al., 2014; Woodhall et al., 2005), mind akciós potenciál során felszabaduló GABAerg hatások révén (Gloveli, Schmitz, & Heinemann, 1997; Gloveli, Schmitz, Empson, et al., 1997; Jones & Bühl, 1993). Az akciós potenciál során felszabaduló GABA egyaránt közvetíthet feed-forward gátlást (Finch et al., 1986; Gloveli, Schmitz, & Heinemann, 1997; Gloveli, Schmitz, Empson, et al., 1997; Jones & Bühl, 1993) és feedback gátlást is (Armstrong et al., 2016; Beed et al., 2010; Couey et al., 2013; Kumar et al., 2007; Varga et al., 2010). Ezek a gátló interneuronok nagyon heterogén populációt képviselnek és klasszikusan három külön osztályba sorolhatók, amelyek parvalbumint (PV+), szomatosztatint (SOM+) vagy szerotonin 3a receptort expresszálnak (5HT3R+) (Tukker et al., 2022). A disszertációban ismertetett másik jelentős GABAerg sejtípus az NPY+ és a neuronális nitrogén-monoxid szintáz (nNOS+) expresszáló neurogliaform sejt (NGF).

1.3. A gátlás jelentősége az agyi hálózatokban

A principális sejtek tüzelését és működését az 1.2. fejezetben tárgyalt GABAerg interneuronok legalább kétféle módon befolyásolhatják: feed-forward és feedback gátlás révén.

Az feed-forward gátlás csökkentheti a principális idegsejtek tüzelését azáltal, hogy kompetitíven hat a serkentő bemenetekre vagy csökkenti maga a principális sejtek aktivitását. A

plaszticitás különböző formáiban vesz részt (Basu et al., 2013) és modulálja a térbeli asszociációs memória kialakulását (Kitamura et al., 2017; Roux & Buzsáki, 2015). A gátlás másik formája, a feedback vagy a rekurrens gátlás, amely során egy posztszinaptikus interneuront aktivál egy serkentő sejt és a gátló sejt maga akadályozza meg a serkentő neuron további aktiválódását azáltal, hogy egy negatív visszacsatolást ad rá (Miles, 1990).

Fontos megemlíteni, hogy a gátlás formái ennél sokkal bonyolultabbak és heterogénebbek. A feedback és a feed-forward gátlás a két leggyakoribb gátlási forma az agyban, és megértésük kulcsfontosságú a jelen dolgozat szempontjából, ezért csak ezeket tárgyaljuk

1.4. Akut agyszelet elektrofiziológia optogenetikával kombinálva

Az elektrofiziológia megjelenése óta széles körben használt módszer a kettős foszfolipid membrán mentén bekövetkező elektromos jelenségek vizsgálatára (Hodgkin et al., 1952). Az agyban az in vitro akut agyszelet elektrofiziológiai méréseket hatékonyan használják a szinaptikus kapcsolatok szerkezeti és funkcionális jellemzőinek leírására már a megjelenése óta (Eguchi et al., 2020; Li & McIlwain, 1957; Llinás & Sugimori, 1980; Yamamoto & McIlwain, 1966).

A hálózatok és kapcsolatok vizsgálatára a szeletelektrofiziológiában páros és többcsatornás elvezetéseket használunk. Ezen módszerek azonban egy tapasztalt elektrofiziológus

számára is kihívást jelentenek, és az elvezetett sejtek közötti kapcsolatok száma és aránya gyakran nagyon alacsony (Szabadics et al., 2007; Vandrey et al., 2022; Winterer et al., 2017). Ezen sikertelenségek és kihívások leküzdésére használhatjuk az optogenetikát, amelyet még mindig újszerű eszköznek tartanak az agyi hálózatok vizsgálatában.

Az optogenetikában specifikus opszinokat, genetikailag kódolt fényérzékeny fehérjéket használunk, amelyeket vírusvektorok segítségével injektálunk genetikailag módosított egerekbe. Ezek a fehérjék ezért a kívánt, specifikus sejtípusokban expresszálnak. Ezt követően különböző hullámhosszú LED megvilágítás segítségével manipulálhatjuk ezeket a specifikus neuronokat.

Az optogenetika használható a lokális és távoli szinaptikus kapcsolatok vizsgálatára, poliszinaptikus vagy monoszinaptikus kapcsolatok tanulmányozására, szinapszisok jellemzésére, különböző sejtípusok funkcióinak leírására a különböző agyi régiókban, jelátvitel útvonalak modulálására, stb. (Karl Deisseroth, 2015; Lee et al., 2020; Pastrana, 2011).

2. Célkitűzések

Az EC funkciója és hálózata több szempontból is nagymértékben eltér más kérgi területtől. Az EC lokális hálózatának jellemzésére azonban számos általánosított modellt használunk. Valóban alkalmasak ezek a modellek az EC számítási kapacitásának

megértéséhez? Más szóval, van-e EC-specifikus hálózat, amely nem lelhető fel más agyi területen?

Dolgozatomban ezekre a konkrét EC-motívumokra koncentráltam. A konkrét célok a következők voltak:

1. Az I rétegi GABAerg interneuronok, elsősorban a neurogliaform sejtek funkcióinak jellemzése a lokális entorhinális kérgi hálózatban.
2. A neurogliaform sejtek és a II rétegi principális sejtek (mind piramis, mind stellate-sejtek) közötti kapcsolatok feltérképezése.
3. A szomatosztatint expresszáló GABAerg interneuronok kapcsolatai és hálózati szerepük az EC-ben.
4. Az előbbieken említett szomatosztatint expresszáló GABAerg sejtek által létrehozott posztzinaptikus hatás összehasonlítása a parvalbumint expresszáló sejtek posztzinaptikus hatásaival.

3. Anyag és módszer

3.1. Kísérleti állatok

A kísérleteket a Pécsi Munkahelyi Állatjóléti Bizottság hagyta jóvá (engedélyszám: BA02/2000-1-2015 és BA02/2000-21/2021). Kísérleteinkben hím és nőstény 4-14 hetes transzgenikus egereket használtunk fel, továbbiakban 6-8 hetes Wistar patkányokat alkalmaztunk az anatómiai és in vitro elektrofiziológiai páros elvezetéseinkhez. Az állatokat 12 órás világos/12 órás sötét ciklusban tartottuk.

3.2. Vírus injekció

A vírusinjekcióhoz az állatokat mély altatásba helyeztük (izoflurán segítségével, 4% kezdeti dózis az indukcióhoz, majd 1% a műtét során). Egy kis lukat fűrtünk a koponyába a MEC felett (a koordináták: 3,75 mm oldalirányban a középvonaltól és 0,2 mm előre a haránt sinustól (Heys & Dombeck, 2018)). Annak érdekében, hogy a transzgenikus egereinkben szelektíven expresszáljunk ChR2-t, ChR2-mCherry-t kódoló adeno-asszociált vírusvektort injektáltunk a MEC-be a posztnatális 25-30-ik napon. A vírusinjektálást követő 2-3 héten leöltük az állatokat és agyszeleteket készítettünk.

3.3. Akut agyszeletek készítése az in vitro elektrofiziológiai mérésekhez

Optogenetikai és in vitro szeletelektrofiziológiai kísérleteket végeztünk akut horizontális agyszeleteken. A szomatoszenzoros kéregben és a hippocampusban végzett kísérleteink egy részéhez akut koronális metszeteket is használtunk. Mély izoflurán altatásban az egereket lefejeztük, és 300 μm -es horizontális vagy koronális szeleteket készítettünk, amelyeket in vitro elektrofiziológiai kísérletekben használtunk fel.

3.4. In vitro elektrofiziológiai kísérletek

A patch pipettákat boroszilikát üvegkapillárisokból húztuk (ellenállásuk 3-5 M Ω). A szeleteket differenciális interferencia-kontraszt (DIC) optikával és fluoreszcens gerjesztő forrással felszerelt mikroszkóppal vizsgáltuk. A kísérleteket 32-34°C-os ACSF-ben végeztük, amelyet 95% O₂-t és 5% CO₂-t tartalmazó gázkeverékkel

buborékolattunk. Kísérleteinkben „CsCl tartalmú – magas klorid – intracelluláris oldatot”, „Alacsony Cl tartalmú intracelluláris oldatot” és „Nagyon alacsony Cl tartalmú intracelluláris oldatot” használtunk, amely 0,2% biocitint tartalmazott.

3.5. In vivo elektrofiziológiai mérések

Minden műtét mély izoflurán érzéstelenítésben történt. A fejbefogó beültetése, az állatok akklimatizálása és koponya fúrása a korábban leírtak szerint történt (Varga et al., 2012). A dorzális hippocampusz CA1 régiójába egy lineáris szilikon-próbát helyeztünk, amely 32 ponton alkalmas jelerőztítésre (A1x32-Poly2, Neuronexus). A MEC-be 2 vagy 3 szárú szilikon-próbát helyeztünk. Mindegyik szár 8 jelerőztítési pontot tartalmazott 50 μm távolsággal (Buzsaki32 design, Neuronexus). Az optogenetikai manipulációhoz optikai szálakat rögzítettünk a próbához. Minden felvétel 30-90 percig tartott.

3.6. Immunhisztokémia, konfokális képalkotás és Neurolucida rekonstrukció

Anatómiai, morfológiai és immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk 60 vagy 70 μm vastag metszeteken. A konfokális képeket Nikon Eclipse Ti2-E és Zeiss LSM710 fluoreszcens konfokális mikroszkóppal készítettük, 10 $\times$, 20 $\times$ és 60 $\times$ objektíveket használva. Az axonok és dendritek háromdimenziós rekonstrukcióját a Neurolucida szoftverrel 60 $\times$ 1,4 NA objektívvel végeztük. A sejtsűrűséget sejt/mm²-ben határoztuk meg, és az ImageJ szoftverrel számoltuk.

3.7. Statisztikai elemzések

A statisztikákat GraphPad Prism program segítségével végeztük. A minták normál eloszlását a D'Agostino–Pearson teszttel vagy a Kolmogorov–Smirnov teszttel (alacsony elemszám esetén) teszteltük. Az adatokat páratlan T-teszttel hasonlítottuk össze, míg a nem-normál eloszlású adatokat Mann-Whitney teszttel. Azon statisztikai elemzések esetében, ahol három vagy több csoportot hasonlítottunk össze, amely nem normál eloszlást mutatott Kruskal–Wallis tesztet alkalmaztunk post-hoc Dunn-féle összehasonlító teszttel egybevetve. A normál eloszlású adatokhoz ANOVA tesztet használtunk, Tukey féle adatösszehasonlítással. Néhány nemparametrikus eloszlású in vivo adatunk esetében Wilcoxon rang tesztet alkalmaztunk. Az adatokat átlag $\pm$ S.E.M formájában reprezentáltuk. Az állatok számát és a sejtszámokat N és n formájában reprezentáltuk.

4. Eredmények

4.1. A II. rétegi piramis-sejtek axonjai főként a II. réteget célozzák

A II. rétegi principális sejtek axonális célpontjai a II. rétegben és bizonyos mértékig a mélyebb rétegekben találhatóak (Sürmeli et al., 2015). A II. réteg piramis-sejtek és a stellate-sejtek között nagy a kapcsolati valószínűség (Winterer et al., 2017). Ennek tesztelésére Calb-Cre egerekben szelektíven expresszáltuk a ChR2-t a II. rétegi piramis-sejtekben, és megvizsgáltuk a rövid (5 ms) fényimpulzusok hatását a II. rétegi stellate-sejteken. Megállapítottuk,

hogy nagy amplitúdójú serkentő posztszinaptikus potenciálok (EPSP-k) (késleltetési idő: $2,0 \pm 0,2$ ms, $n = 6$, EPSP-k átlagos amplitúdója: $10,6 \pm 2,9$ mV, 5 mW fényintenzitás mellett) válthatóak ki a stellate-sejteken (gyakran akciós potenciálok (AP) is kialakulnak). Azt is megvizsgáltuk, hogy a II. rétegi gyorsan tüzelő parvalbumint expresszáló interneuronokat is beidegzik-e a II. rétegi piramis-sejtek axonjai. Erős serkentést (késleltetés idő: $2,2 \pm 0,7$ ms, EPSP-k átlagos amplitúdója: $6,8 \pm 2,1$ mV 0,5 mW fényintenzitás mellett) találtunk a II. réteg interneuronjain ($n = 5$, 2/2 parvalbuminra tesztelve), amelyeken a fényimpulzusok gyakran okoztak AP-kat.

4.2. Az I. rétegi neurogliaform sejtek erőteljes serkentő monoszinaptikus bemeneteket kapnak a II. rétegi piramis-sejtektől

A Chr2-t expresszáló axonok nem korlátozódnak a II. rétegre, hanem az I. rétegben is megtalálhatók. Ezért megvizsgáltuk a fényimpulzusok hatását az I. rétegben elhelyezkedő interneuronokon. Ezen interneuronok többsége neurogliaform sejt, amely GABAAR α 1-et és Reelin-t expresszál (Armstrong et al., 2012). Kolokalizációs kísérleteink során azt találtuk, hogy az I. rétegben lévő GABAAR α 1-et expresszáló sejtek $53 \pm 12\%$ -a (összesen 735 Reelin és/vagy GABAAR α 1 + sejt, $N = 2$) Reelint is expresszál. Ezen sejtek dendritei és axonjai többnyire az I. rétegre korlátozódnak (Craig & Mcbain, 2015). A Chr2⁺ axonok fénnel való gerjesztése EPSP-ket váltott ki neurogliaform sejtekben (késleltetés: $1,9 \pm 0,1$ ms, amplitúdó: $6,0 \pm 0,7$ mV, $n = 34$, fényintenzitás: 5 mW). A TTX és a 4-AP bemosási kísérletek igazolták, hogy ezen EPSP-k monoszinaptikusak.

A calbindin nemcsak a II. rétegi piramis-sejtekben expresszálódik, hanem néhány GABAerg interneuronban is (Canto et al., 2008), ami potenciálisan vegyes GABAerg és glutamaterg hatást eredményez a calbindin+ ChR2-t expresszáló sejtek aktivációja során Calb-Cre állatokban. Ezért megvizsgáltuk, hogy a neurogliaform sejtek kapnak-e inputokat a calbindin+ interneuronoktól is. Ehhez magas kloridtartalmú intracelluláris oldatot használtunk, a membránpotenciálokat -60 mV-on tartottuk, és a szeletekre NBQX-t és CNQX-t mostunk be (mindkettőt 10 μ M koncentrációban). Az AMPA receptor blokkolók teljesen megszüntették a neurogliaform sejteken látható posztzinaptikus hatást (a drogbemosás előtt az EPSP-k átlagos amplitúdója $6,8 \pm 1,5$ mV, $n = 3$, fényintenzitás: 5 mW), ezért feltételezzük, hogy az entorhinalis kéregben lévő calbindin-pozitív interneuronokból nincs GABAA receptor által közvetített bemenet a neurogliaform sejteken.

4.3. A neurogliaform és a nem-neurogliaform sejtek eltérően reagálnak a II. réteg serkentő bemeneteire

A neurogliaform sejteket későn tüzelő sejteknek tekintjük (Kawaguchi, 1995), ami azt jelenti, hogy a szomatikus depolarizáló négyszögimpulzus hatására csak néhány száz ms után látható az első akciós potenciál. A MEC-ben a neurogliaform sejtek hasonlóan későn tüzelő sejtek (reobázis: $-36,6 \pm 0,9$ mV, első AP $278,5 \pm 48,0$ ms után, NGF sejtek nyugalmi membránpotenciálja: $-65,1 \pm 0,5$ mV, $n = 34$; időállandó: $7,5 \pm 0,4$ ms). Ennek a sejtpopulációnak az EPSP által kiváltott tüzelési mintázatáról azonban csak korlátozott adatok állnak

rendelkezésre (Chittajallu et al., 2020). Ezért a következőkben teszteltük, hogy a neurogliaform sejtek és más nem későn tüzelő interneuronok hogyan reagálnak a II. rétegi piramis-sejtek által létrehozott EPSP-sorozatokra. A II. rétegi interneuronokban ($n = 5$) nagy valószínűséggel hozott lére akciós potenciált a fénystimuláció (5 EPSP 17 Hz-en, $10,7 \pm 2,7$ mV, fényintenzitás 5 mW). Az I. rétegi neurogliaform sejtekben azonos intenzitású fény kisebb amplitúdójú EPSP-ket váltott ki (EPSP-k átlagos amplitúdója: $6,2 \pm 1,1$ mV, $n = 17$, fényintenzitás 5 mW), és nem alakult ki akciós potenciál. Amikor azonban a membránpotenciált a nyugalmi állapotból kissé depolarizáltuk ($-64,5 \pm 0,6$ mV-ról $-52,8 \pm 0,9$ mV-ra), akciós potenciálok alakultak ki. Az alkalmi akciós potenciálok az első és/vagy a második fényimpulzus során jelentkeztek, és a fennmaradó 3 fényimpulzus során semmilyen akciós potenciál nem volt kiváltható.

4.4. A neurogliaform sejtek eloszlása nem korrelál a II. rétegi piramis-sejtek dendriteinek klaszterével

Kimutatták, hogy két sejt közötti kapcsolat valószínűsége nagymértékben függ a neuronok közötti távolságtól (Holmgren et al., 2003). Ennek az állításnak megfelelően megvizsgáltuk a monoszinaptikus kapcsolatokat a II. rétegi principális sejtek és a szorosan fölöttük elhelyezkedő neurogliaform sejtek között ($n = 15$ stellate és $n = 24$ piramis sejt, a vele egyidejűleg elvezetett neurogliaform sejtrel). Mivel az elvezetett sejtpárok között nem találtunk kapcsolatokat, elemeztük a sejtek morfológiáját patkány és egér metszeteken egyaránt. A II. rétegi piramis-sejtek apikális

dendritei ahelyett, hogy egyenesen az I. réteg irányába futnának a rétegre merőlegesen, mint ez a II–III. rétegi piramis-sejtek esetében megfigyelhető a neocortexben (M.L. Feldman, 1984) és a III. rétegi piramis-sejtek esetében a MEC-ben (Canto & Witter, 2012; Craig & Mcbain, 2015), MEC-i II. rétegi calbindin+ piramis sejtek „prominens” apikális dendritei oldalirányba húzódnak. A II. rétegi stellate-sejtek ezzel szemben mind laterálisan, mind mediálisan futó dendritekkel rendelkeznek, és többnyire nincsenek apikális dendriteik, amelyek egyenesen az I. rétegbe futnának. A II. réteg principális sejtjeinek ezen jellemzői eltérő hálózati szabályokat határoznak meg, mint a korábbiakban más kérgi területeken leírt hálózati motívumok. Ezt követően megvizsgáltuk, hogy a neurogliaform sejtek az I. rétegben valóban a kevesebb II. rétegi piramis-sejt dendritet tartalmazó területen helyezkednek-e el. Ehhez olyan tangenciális metszeteket készítettünk, ahol az entorhinális kéreg I. rétege jól kirajzolódik és ezeket neurogliaform és II. réteg specifikus markerekkel festettük. A szigetsoportosulások, amelyeket a II. rétegi piramis sejtek okoznak az I. rétegben is felismerhetők; azonban a szigetek hexagonális elrendezése helyett amorf WFS1+ területeket találtunk, amelyek a III-V. rétegi piramis-sejtek apikális dendriteivel keveredtek. Megszámoltuk a neurogliaform sejtek sűrűségét a szigetekben belül és a szigetek közötti területeken. Az α -actinin+ neurogliaform sejtek szemikvantitatív mérése patkányban (Price et al., 2005; Ratzliff & Soltesz, 2001) azt mutatta, hogy a neurogliaform sejtek viszonylag homogénen oszlanak el.

4.5. A MEC-ben a SOM+ interneuronok erős rétegspecifitást mutatnak, míg a PV+ interneuronok egyformán beidegzik az összes principális sejtet

Chr2 expressziót indukáltunk SOM+ vagy PV+ interneuronokban a MEC-ben. Vizsgáltuk a SOM+ interneuronok hatását a MEC különböző rétegeiben. Ehhez a SOM-ChR2 egerekben a MEC különböző rétegeinek principális sejteiből vezettünk el és vizsgáltuk fény által kiváltott posztszinaptikus válaszokat. Sűrű SOM+ axonfelhő és SOM-Cre-ChR2 axonok (de nem PV+ boutonok) találhatóak az I. rétegben. A SOM+ interneuronok azonban csak mérsékelt posztszinaptikus választ váltottak ki az I. réteghez közel elhelyezkedő II. rétegi principális sejteken. Mind a reelin+ stellate ($n=33$, $N=18$), mind a WFS1/calbindin+ piramis-sejtek ($n=9$, $N=7$) csak mérsékelt posztszinaptikus válaszokat adtak (II. rétegi stellate-sejtek: $2,2 \pm 0,38$ mV; II. rétegi piramis-sejtek: $0,66 \pm 0,16$ mV) SOM+ interneuron fény általi aktivációja során. Az elvezetett sejtek sűrű dendritálózáttal rendelkeztek, amelyeket SOM+ axonokból származó robusztus Chr2-mCherry expresszió vesz körül; így a mérsékelt posztszinaptikus hatás nem a fejletlen dendritfáknak köszönhető.

A II. réteggel ellentétben a III. rétegi ($n=15$, $N=12$) és az V. rétegi ($n=8$, $N=6$) piramis-sejtek nagyságrendileg nagyobb amplitúdójú posztszinaptikus válaszokkal reagáltak az azonos időtartamú és intenzitású fényimpulzusokra (III. rétegi piramis-sejt: $13,58 \pm 2,02$ mV, V. rétegi piramis-sejt: $16,6 \pm 2,09$ mV). A stellate-

sejtekben kialakult fényindukált posztszinaptikus potenciálok (PSP) amplitúdóinak összehasonlítása a II. rétegi piramis-sejtek PSP-ivel, valamint a III. rétegi és az V. rétegi piramis-sejtek PSP-ivel nem mutatott különbségeket; azonban minden más összehasonlítás (II. rétegi sejtek vs III. rétegi vagy V. rétegi sejtek) jelentős különbségeket mutatott ($p < 0,0001$, varianciaanalízis Tukey többszörös összehasonlító tesztjével). Ezért arra a következtetésre jutottunk, hogy a SOM+ GABAerg sejtek elsősorban a mély rétegeket (III–V. réteget) idegzik be a felszíni, II. rétegi principális sejtekkel szemben.

Ezt követően a PV+ GABAerg gátló interneuronok réteg- és sejt-specifitásának feltérképezésére törekedtünk a MEC-ben. A PV-ChR2-t expresszáló szeleteken rövid (3 ms), teljes látómezős fényfelvillanást alkalmaztunk (Pfeffer et al., 2013) és rögzítettük különböző rétegi principális sejteken kialakuló posztszinaptikus hatásokat. A stellate- ($n = 14$, $N = 5$) és a piramis-sejtek ($n = 4$, $N = 3$) gyors, monoszínaptikus ($2,17 \pm 0,56$ és $1,9 \pm 0,6$ ms késleltetési idővel) potenciálváltozásokkal reagáltak. A III. rétegi ($n = 11$, $N = 8$) és az V. rétegi ($n = 8$, $N = 3$) piramis-sejtekben is ugyanekkora mértékű posztszinaptikus változásokat találtunk. Ezek a gátló posztszinaptikus változások hasonlóak voltak a II. rétegi principális sejteken tapasztaltakkal (II. rétegi piramis: $13 \pm 1,08$ mV, II. rétegi stellate: $16,5 \pm 1,79$ mV és III. rétegi: $18,45 \pm 1,49$ mV, V. rétegi piramis: $19,25 \pm 1,75$; $p = 0,23$, egyirányú varianciaanalízis (ANOVA), majd Tukey többszörös összehasonlítási tesztje). Ezért arra a következtetésre jutottunk, hogy a korábbi immunhisztokémiai előrejelzésekkel ellentétben (Boccaro et al., 2010) a mélyrétegi (III–

V. rétegi) piramis-sejtek erőteljes PV+ beidegzésben részesülnek; így a PV+ GABAerg sejtek összességében erős GABAerg gátlást adnak az összes principális sejtípusra a MEC II-V. rétegében.

A MEC felszíni és mély rétegeiben található principális sejteinek SOM+ beidegzése általánosabb kérgi/hippokampális hálózati motívumot tükrözhet. Ennek érdekében megvizsgáltuk a SOM+ interneuronok által adott monoszinaptikus gátló hatásokat a szomatoszenzoros kéregben és a CA1 régióban. Ehhez ChR2 expressziót indukáltunk SOM+ sejtekben a szomatoszenzoros kéregben és a dorzális hippokampusz CA1-ben ugyanazon a SOM-Cre egérvonalon (SOM-Cre) és ugyanazzal az AAV-ChR2 vírusvektorral. Különböző rétegi piramis-sejtekből vezettünk el a szomatoszenzoros kéregből és a dorzális hippokampusz CA1 régiójából és vizsgáltuk a rövid, teljes látómezőt érintő fényimpulzusok hatását az elvezetett sejteken. Megállapítottuk, hogy az elvezetett régiókban a SOM+ beidegzés azonos mértékű a felszíni vagy mélyebben elhelyezkedő piramis-sejteken. Így a MEC mélyrétegi piramis-sejteinek a SOM+ GABAerg sejtek általi erőteljes beidegzése arra utalhat, hogy ezen motívumnak specifikus szerepe lehet ezen az agyterületen.

4.6. A SOM+ interneuronok hosszabb ideig gátolják a piramis-sejteket, mint a PV+ interneuronok

Ezt követően megvizsgáltuk, hogy a PV+ és SOM+ lokális gátló interneuronok eltérő hatással vannak-e a piramis-sejtek tüzelésére a MEC-ben. Először fejbefogott éber transzgenikus egerek

(PV-Cre-ChR2 és SOM-Cre-ChR2) MEC-ben rögzítettük több idegsejt együttes aktivitását. Amikor 10 ms-os fényimpulzusokat alkalmaztunk a Cre-dependensen ChR2-t expresszáló MEC-ben, a feltételezett PV+ vagy SOM+ interneuronok tüzelési frekvenciája megnövekedett (PV-ChR2: $8,2 \pm 1$ Hz-ről 50 ± 6 Hz-re, $n = 122$, $N = 6$; SOM-ChR2: $3,5 \pm 1$ Hz-ről $27,3 \pm 7$ Hz-re, $n = 36$, $N = 4$), és a feltételezett III–V. rétegi piramis-sejtek gátlás alá kerültek. A gátlás időtartama a PV-Cre-ChR2 állatokban rövidebb volt, mint a SOM-Cre-ChR2 állatokban (50%-os helyreállítás gátlást követően: PV-Cre-ChR2: 37 ± 1 ms, $N = 6$, $n = 136$; SOM-Cre-ChR2: 89 ± 7 ms, $N = 4$, $n = 51$, $p < 0,0001$, Wilcoxon rangösszeg teszt). A PV-Cre-ChR2 állatokban a gátlás időtartama hasonló volt ahhoz, amit korábbi in vivo MEC vizsgálatokban találtak (Buetfering et al., 2014). Azonban a SOM-Cre-ChR2 állatokban megfigyelt elhúzódó gátlás egy atipikus gátló-mechanizmusra utalt.

4.7. A SOM, mint neuromodulátor befolyásolja a III-V. rétegi piramis-sejtek tüzelési valószínűségét

Kimutatták korábban, hogy a SOM, mint neuromodulátor hiperpolarizációt vált ki a CA1 piramis-sejtekben (Baraban & Tallent, 2004) és feltételezték, hogy ez a SOM+ szinaptikus boutonokból szabadul fel (Katona et al., 2014).

Korábban már beszámoltak a SOM+ sejtek által létrehozott elhúzódó gátlásról, például a prefrontális kéregben (Kvitsiani et al., 2013), de a mögötte álló mechanizmusokat nem tárták fel. Annak érdekében, hogy megértsük, hogy mi okozza a elhúzódó SOM+ hatást,

először meghatároztuk, hogy a PV+ és SOM+ interneuronok által kiváltott posztszinaptikus áramok kinetikája hasonló-e. A PSP-k dendritikus szűrése lassabb kinetikát okozhat (Hoffman et al., 1997). Kísérleteinkben azonban a felfutási idők (SOM: $5,96 \pm 1,22$ ms ($n = 11$, $N = 2$), PV: $5,77 \pm 0,99$ ms ($n = 11$, $N = 3$), $p = 0,91$) és a lefutási idők (SOM: $179 \pm 34,5$ ms, PV: $199,8 \pm 21,6$ ms, $p = 0,17$, Mann-Whitney teszt) a két csoport között nem különböztek. Ez a megállapítás megegyezik a korábban leírtakkal (Szabadics et al., 2007). Továbbá a GABAA receptor blokkoló GABAZINE alkalmazása teljesen megszüntette mind a PV+, mind a SOM+ interneuronok posztszinaptikus hatását.

Ezt követően összehasonlítottuk a fény által kiváltott gátlás időtartamát MEC III-V. rétegi piramis-sejtjeiben *in vitro* kísérletek során. A rögzített sejt membránpotenciálját azon a szinten tartottuk, ahol alacsony frekvenciájú tüzelés történt, és fényimpulzusokkal gerjesztettük a SOM-ChR2+ vagy PV-ChR2+ sejteket/axonokat. A principális sejtek tüzelése sokkal korábban helyreállt a PV+ interneuronok gerjesztése után, mint a SOM-ChR2 állatokban (PV 220 ± 17 ms, $n = 16$, $N = 2$; SOM 340 ± 32 ms, $n = 10$, $N = 3$; $p = 0,0023$). Ezek az *in vitro* elektrofiziológiai eredmények összehasonlíthatóak voltak az *in vivo* megállapításainkkal, ami arra utal, hogy a SOM+ sejtek elhúzódó gátlást hoznak létre a III-V. rétegi piramis-sejteken. Mindezeket figyelembe véve, megállapíthatjuk, hogy sem a GABAB, sem a dendritikus szűrés nem vesz részt ebben a mechanizmusban. Továbbá azt találtuk, hogy a SOM

neuromodulátor felelős lehet ezért az elhúzódó gátlásért, de ezek az eredmények a jelen disszertációban nem kerülnek bemutatásra.

5. Megbeszélés és következtetések

Új technikák és módszertanok alkalmazásával két egyedi motívumot azonosítottunk az entorhinális kéregben. Az entorhinális kéreg II. rétegi piramis-sejtjeinek szelektív genetikai markereit és a szelet elektrofiziológiával kombinált optogenetikát alkalmazva, eredményeink azt mutatják, hogy az I. rétegi neurogliaform GABAerg sejtek serkentő monoszínaptikus bemeneteket kapnak a II. rétegi calbindin-pozitív piramis-sejtektől, és feedback gátlást fejtenek ki, ami egy specifikus entorhinális kérgi motívumnak bizonyult.

Továbbá, eredményeink feltárták, hogy a lokális SOM+ interneuronok által kiváltott GABAerg gátlás erős rétegpreferenciát mutat a MEC-ben, ugyanakkor a memória kialakulásában fontos szerepet játszó III-V. rétegi piramis-sejtek aktivitását erősen befolyásolja a SOM+ gátlás. A II. rétegi principális sejtek azonban csak mérsékelt szintű gátlást kapnak a lokális SOM+ GABAerg sejtektől. Az I. rétegi neurogliaform sejtek is erős gátlást kapnak ezekből a SOM-t expresszáló neuronokból.

Összefoglalva, eredményeink röviden a következők:

1. A neurogliaform sejtek erős, monoszínaptikus bemeneteket kapnak a II. rétegi piramis-sejtektől.
2. Az NGF sejtek aktivitását nagyrészt meghatározzák a gátló és serkentő neuronokból származó bemenetek.

3. Az NGF sejtek erős feedback gátlást biztosítanak a lokális entorhinális kérgi hálózatban.

4. Az EC-ben sajátos módon a szomatosztatin-pozitív sejtek által biztosított dendritikus gátlás gyengébb a II. rétegi principális sejteken, mint a mélyebb rétegi principális sejteken.

5. A SOM+ neuronok által biztosított gátlás jelentősen elhúzódóbb a PV+ interneuronok által adott gátláshoz képest.

Összegzésként elmondhatjuk, hogy munkánk rávilágított két specifikus entorhinális kérgi motívumra, és hangsúlyozza, hogy a tanulás, a memóriaformálás és a térbeli navigáció komplex folyamatainak megértéséhez meg kell értenünk a lokális neuronhálózatokat.

6. Publikációs jegyzék

A disszertáció alapját képező publikációk:

Szocs, S., Henn-Mike, N., Agocs-Laboda, A., Szabo-Meleg, E., & Varga, C. (2022). Neurogliaform cells mediate feedback inhibition in the medial entorhinal cortex. *Frontiers in Neuroanatomy*, 16(August), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnana.2022.779390> (IF = 2.90)

Kecskés, M., Henn-Mike, N., Agocs-Laboda, Á., **Szócs, S.,** Petykó, Z., & Varga, C. (2020). Somatostatin expressing GABAergic interneurons in the medial entorhinal cortex preferentially inhibit layerIII-V pyramidal cells. *Communications Biology*, 3(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01496-x> (IF = 6.26)

Egyéb, a disszertációhoz nem kapcsolódó publikációk:

Makkai, G., Abraham, I. M., Barabas, K., Godo, S., Ernszt, D., Kovacs, T., Kovacs, G., **Szocs, S.,** & Janosi, T. Z. (2023). Maximum likelihood-based estimation of diffusion coefficient is quick and reliable method for analyzing estradiol actions on surface

receptor movements. *Frontiers in Neuroinformatics*, 17(March), 1–10.
<https://doi.org/10.3389/fninf.2023.1005936> (IF = 2.50)

Kövesdi, E., Udvarács, I., Kecskés, A., **Szőcs, S.**, Farkas, S., Faludi, P., Jánosi, T. Z., Ábrahám, I. M., & Kovács, G. (2023). 17B-Estradiol Does Not Have a Direct Effect on the Function of Striatal Cholinergic Interneurons in Adult Mice in Vitro. *Frontiers in Endocrinology*, 13(January), 1–14.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2022.993552> (IF = 6.05)

Luo, W., Egger, M., Domonkos, A., Que, L., Lukacsovich, D., Cruz-Ochoa, N. A., **Szőcs, S.**, Seng, C., Arszovszki, A., Sipos, E., Amrein, I., Winterer, J., Lukacsovich, T., Szabadics, J., Wolfer, D. P., Varga, C., & Földy, C. (2021). Recurrent rewiring of the adult hippocampal mossy fiber system by a single transcriptional regulator, Id2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(40), e2108239118.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2108239118> (IF = 12.77)

7. Előadások, poszterek

Az értekezés alapjául szolgáló konferencia szereplések:

Szilárd, Szőcs; Nóra, Henn-Mike; Ágnes, Agócs-Laboda; Zoltán, Petykó; Csaba, Varga: Feedback inhibition in the entorhinal cortex mediated by neurogliaform cells; International Neuroscience Meeting, Budapest, 2022: IBRO Workshop: 27-28 January 2022. Budapest, Hungary: Abstract book (2022) 277 p. p. 126

Szilárd, Szőcs; Nóra, Henn-Mike; Ágnes, Agócs-Laboda; Csaba, Varga: Feedback inhibition in the entorhinal cortex mediated by neurogliaform cells; Society for Neuroscience, San Diego, CA, USA (2022)

Szilárd, Szőcs; Nóra, Henn-Mike; Ágnes, Agócs-Laboda; Csaba, Varga: Down-top inhibition of neurogliaform cells by somatostatin positive interneurons; International Neuroscience Meeting, Budapest 2022: IBRO Workshop: 27-28 January 2022, Budapest, Hungary: Abstract book (2022) 277 p. p. 128

Varga, Cs; Kecskés, M; Henn-Mike, N; Krabóth, Z; Agócs-Laboda, Á; **Szőcs, Sz**; Petykó, Z: Network effects of dendritic inhibition in the medial entorhinal cortex; Society for Neuroscience, San Diego, CA, USA, Paper: 445.02 (2018)

Kecskés, M; Henn-Mike, N; Agócs-Laboda, Á; **Szőcs, Sz**; Petykó, Z; Varga, Cs: Selectivity of dendritic inhibition in the medial entorhinal cortex; Hungarian Anatomical Society, Budapest, Hungary (2019)

Kecskés, M ; Henn.Mike, N; Agócs-Laboda, Á; **Szőcs, Sz**; Petykó, Z; Varga, Cs: Selectivity of dendritic inhibition in the medial entorhinal cortex; Hungarian Society of Experimental and Clinical Pharmacology, Budapest, Hungary (2019)

Az értekezéshez szorosan nem kapcsolódó egyéb konferencia szereplések:

Szilárd, Szőcs; Agócs-Laboda, Ágnes; Peyman, Golshani; Csaba, Varga: Chronic calcium imaging of network activity in freely behaving mice with miniature fluorescent microscope; 16th Meeting of the Hungarian Neuroscience Society (2019) 102 p. p. 92

Márton, Tóth; **Szilárd, Szőcs**; Nóra, Henn-Mike; Ágnes, Agócs-Laboda; Tamás, Dóczi; Zsolt, Horváth; József, Janszky; Csaba, Varga: Altered H-current in cortical interneurons of drug-resistant epileptic patients; International Neuroscience Meeting, Budapest 2022: IBRO Workshop: 27-28 January 2022, Budapest, Hungary: Abstract book (2022) 277 p. p. 125

Nóra, Henn-Mike; Munkh-ulzii, Munkhkhagva; **Szilárd, Szőcs**; Zoltán, Máté; Ferenc, Erdélyi; Ágnes, Agócs-Laboda; Csaba, Varga: Comparison of CCK+ perisomatic inhibition throughout multiple layers of the entorhinal cortex; International Neuroscience Meeting, Budapest 2022: IBRO Workshop: 27-28 January 2022, Budapest, Hungary: Abstract book (2022) 277 p. p. 127

Márton, Tóth; **Szilárd, Szőcs**; Nóra, Henn-Mike; Ágnes, Agócs-Laboda; Tamás, Kovács; Tamás, Dóczi; Zsolt, Horváth; József, Janszky; Csaba, Varga: Altered h-current in cortical

interneurons of drug-resistant epileptic patients; Society for Neuroscience, San Diego, CA, USA (2022)

Szilárd, Szőcs; Tamás, Kovács; Nóra, Henn-Mike; Márton, Tóth; Ágnes, Agócs-Laboda; Tamás, Dóczy; Zsolt, Horváth; József, Janszky; Csaba, Varga: Altered h-current in cortical interneurons of drug-resistant epileptic patients; FENS Forum, Algarve, Portugal (2023)

Kolozsvári, Áron Olivér; **Szilárd, Szőcs;** Nóra, Henn-Mike; Ágnes, Agócs-Laboda; Klaudia, Barabás; Csaba, Varga: Electrophysiological and immunohistochemical comparison of the dentate gyrus projecting cells in the lateral and medial entorhinal cortex; 7th HUNDOC, 24th January 2024, Pécs, Hungary (2024)

Kolozsvári, Áron Olivér; **Szilárd, Szőcs;** Nóra, Henn-Mike; Ágnes, Agócs-Laboda; Klaudia, Barabás; Csaba, Varga: Electrophysiological and immunohistochemical comparison of the dentate gyrus projecting principal cells in the lateral and medial entorhinal cortex; International neuroscience conference, 25-26 January 2024, Pécs, Hungary (2024)

Áron, Olivér Kolozsvári; **Szilárd, Szőcs;** Nóra, Henn-Mike; Ágnes, Agócs-Laboda; Klaudia, Barabás; Barnabás, Rozmán; Csaba, Varga: Medio-lateral H-current gradient in the medial entorhinal cortex; Annual Meeting of the Hungarian Neuroscience Society, MITT 2025, Abstract Book (2025) p. 153

Szilárd, Szőcs; Áron, Olivér Kolozsvári; Nóra, Henn-Mike; Ágnes, Agócs-Laboda; Klaudia, Barabás; Barnabás, Rozmán; Zoltán, Máté; Zsuzsanna, Erdélyi; Ferenc, Erdélyi; Csaba, Varga: Characterisation of the CCK-positive inhibitory cells in the medial entorhinal cortex; Annual Meeting of the Hungarian Neuroscience Society, MITT 2025, Abstract Book (2025) p. 158

Összesített impakt faktor: 30.48

Független citációk: 29

Hirsch-index: 3

8. Köszönetnyilvánítás

Szeretném kifejezni hálámat témavezetőmnek, Varga Csabának, aki végigvezetett és támogatott ezen az úton. Nemcsak a témavezetőm volt, hanem barát és mentor is, mind a laboron belül, mind azon kívül, inspirálva az idegtudományok iránti kíváncsiságomat, érdeklődésemet.

Ez a munka nem jöhetett volna létre számos kiváló tudós, kolléga és barát hozzájárulása és támogatása nélkül. Különösen hálás vagyok az Entorhinális Kérgi Neuronhálózatok Kutatócsoport minden jelenlegi és volt tagjának az összes technikáért, amit tőlük tanultam, és a kísérleteim során nyújtott segítségükért. A laborban töltött minden pillanat ezen csodálatos emberekkel vidám és motiváló volt. Továbbá szeretném kifejezni hálámat a SzabadicsLabor tagjainak az építő jellegű kritikáikért, segítségükért és támogatásukért.

Szeretnék köszönetet mondani az Élettani Intézet és a Szentágothai János Kutatóközpont minden egyes munkatársának, akik támogató és inspiráló környezetet biztosítottak számomra.

Végül, de nem utolsó sorban szeretnék köszönetet mondani barátnőmnek, családomnak, szüleimnek, nagyszüleimnek, testvéremnek és barátaimnak, akik folyamatosan hittek bennem. Szeretetük és támogatásuk nélkül nem tudtam volna befejezni ezt a munkát.

Disszertációmat szeretett édesapám és nagymamám emlékének ajánlom!