

A „Különböző típusú GABAerg interneuronok szerepe a hippocampális gamma oszcillációkban” című

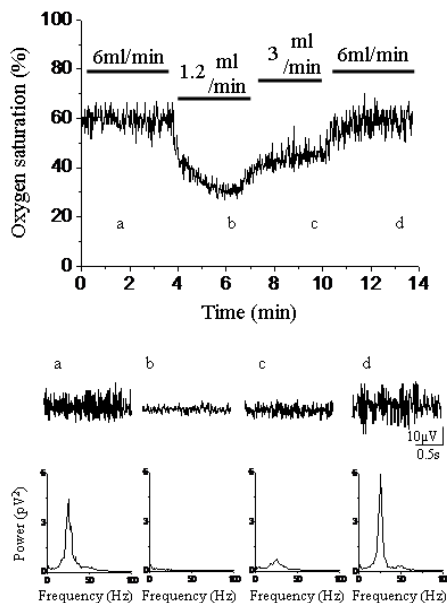
OTKA (T49517 sz.) pályázat zárójelentése

A kérgi neuronhálózatokban a gamma (30-100 Hz) oszcillációk olyan kognitív folyamatok során figyelhetők meg a lokális mezőpotenciálokban, mint pl. a szenzoros információk feldolgozása, a szelektív figyelem vagy a memórianyomok előhívása. A kortikális és hippocampális struktúrák jellemző idegsejttípusai a serkentő fősejtek (piramisisejtek, csillagsejtek, szemcsesejtek). Ezen sejtek működésének időbeli összehangolásában, szinkronizálásában kulcsszerepet játszanak a gátló interneuronok, amelyek az összes idegsejt mintegy 10-15%-át alkotják (Freund and Buzsáki, 1996). A hálózati oszcillációk funkciójának megértéséhez szükséges ismerni mind a serkentő-, mind a gátlósejtek viselkedését, a köztük lévő anatómiai és fiziológiai kapcsolatok természetét és az egyes neurontípusok szerepét. Mindezen ismeretek elvezethetnek a kérgi információfeldolgozás mögött meghúzódó sejtszintű folyamatok megértéséhez, valamint betekintést engedhetnek a hiperszinkronizáció kialakulásába, amely az epileptikus aktivitást jellemzi.

Pályázatunk célja a hippocampális neuronhálózatok szinkronizált működését kialakító sejtszintű mechanizmusok felderítése volt. Ezt a célt három részfeladat elvégzésével kívántuk elérni. Egyrészt meg kívántuk határozni a különböző típusú hippocampális neuronok tüzelési sajátosságait oszcillációk alatt (1. részfeladat), másrészt fel szeretnénk tárni a különféle tüzelési viselkedés mögött rejlő belső ill. külső okokat (2. részfeladat), harmadrészt pedig a szinkronitás kialakításában kulcsszerepet betöltő periszomatikus gátlósejtek típusainak szerepét kívántuk tisztázni (3. részfeladat). A következőkben röviden összefoglalnám a pályázat időszaka alatt elért eredményeinket.

A kísérleti körülmények szükségyszerű optimalizálása. A hálózati oszcillációk sejtszintű folyamatainak felderítésére legalkalmasabbak az *in vitro* mérés technikák, amely vizsgálatoknál az agyszeletben gamma frekvenciájú oszcillációk indukálhatók farmakológiai eszközökkel (pl. kolinerg, glutamérg receptor agonistákkal) (Fisahn et al., 1998; Hajos et al., 2000; Palhalmi et al., 2004; Whittington et al., 1995). Az eddigi kísérletek során csak az ún. *interface* típusú szeletkamrában tartott agyszeletekben tudtak oszcillációkat létrehozni, amely elvezetési körülmények nem kombinálhatóak különböző képalkotó eljárásokkal. A laboratóriumunkban sikeresen megvalósítottuk, hogy az *in vitro* farmakológiailag indukált oszcillációk mechanizmusai vizsgálhatóak legyenek az ún. *submerged* szeletkamrában, ahol alkalmazható a vizualizált patch-clamp mérés technika és a különböző fluoreszcens festékek jeleinek a detektálása. A forgalomba lévő szeletkamrák döntő többsége nem megfelelően van kialakítva, ill. az *in vitro* elektrofiziológiai kísérletekben a tápoldat perfúziós sebessége túl alacsony. A feltételezésünk az volt, hogy a *submerged* szeletkamrákban az általánosan használt folyási sebesség alacsony (2-3 ml/perc), ami nem elégséges az agyszeletek oxigénellátására. A sokak által használt kör alakú szeletkamrában a tápoldat áramlása elsősorban a kamra szélein történik, és nem éri el közvetlenül az agyszeletet. Az újításunk lényege, hogy a szeletkamrát jelentősen leszűkítjük, mintegy „rákényszerítjük” az oxigénáltatott tápoldatot, hogy közvetlenül a szelet felett áramoljon át. Ha ilyen körülmények közt megemeljük a folyási sebességet 5-6 ml/percre, akkor tartós oszcillációkat kapunk a hippocampus-szeletek CA3 régiójában. Kimértük, hogy a mérési körülményeink ilyen jellegű átalakítása azt eredményezi, hogy a szeletkamrában detektált oldott oxigén mennyisége magasabb lesz. Ezen túlmenően megállapítottuk, hogy az oxigén oldott mennyisége egyenes arányban áll az oszcilláció erősségével (**1. ábra**). Tehát sikerült olyan *in vitro* mérési körülményeket kialakítanunk, amelyek biztosítják a hálózati oszcillációk

vizsgálatát agyszelet-preparátumokban, miközben a szeletben lévő sejtek ill. azok nyúlványai vizualizálhatóak (Hájos et al., 2009).

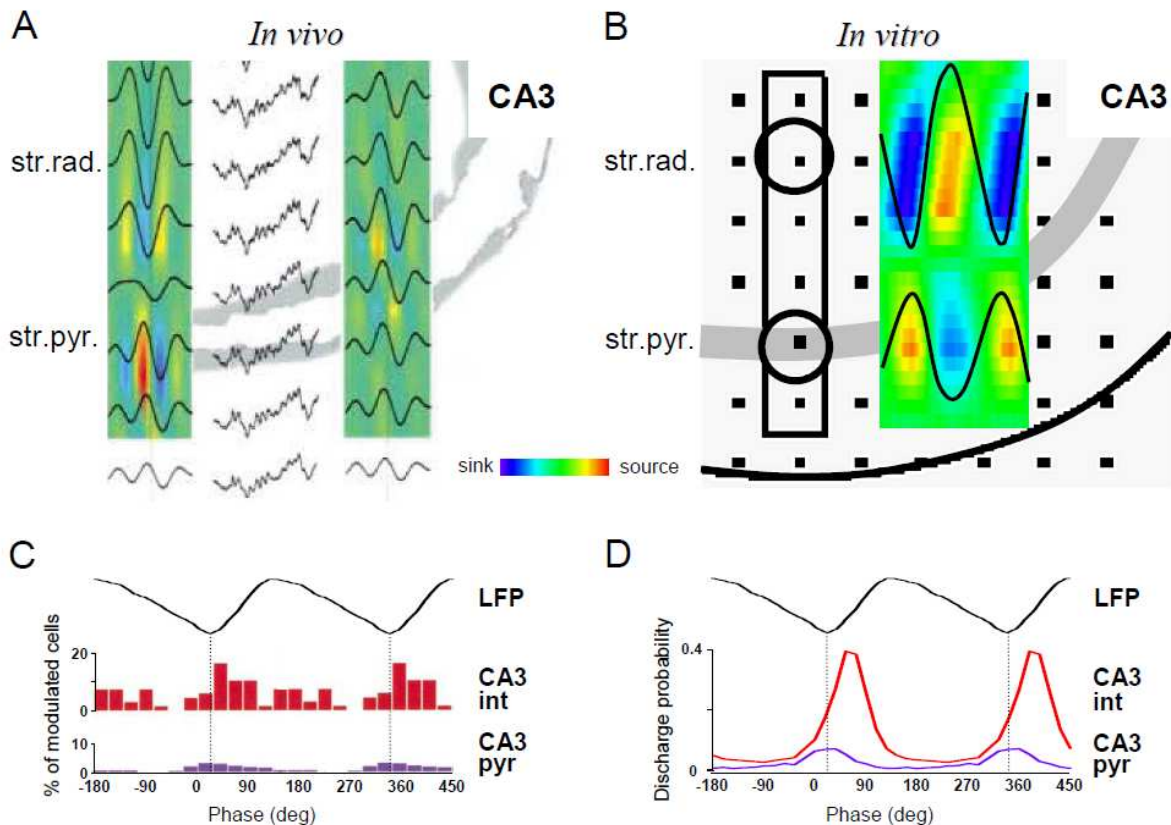


1. ábra. A felső panel mutatja, hogy a tápoldat folyásának sebessége hogyan határozza meg a szeletkamrában mért oxigén koncentrációját. Az alsó részen látható, hogy a párhuzamosan mért oszcilláció erőssége erősen függ a folyási sebességtől, így a lokális oxigén-koncentrációtól. Az oszcilláció erősségét alul a teljesítménysűrűség grafikonok mutatják a betűkkel jelzett időperiódusból számolva. Az oszcillációt 20 μM karbakollal indukáltuk.

Az *in vitro* oszcillációs modellünk összehasonlítása az *in vivo* eredményekkel. Miután kialakítottuk a megfelelő mérési körülményeket az *in vitro* oszcillációk sejt szintű mechanizmusaink tanulmányozásához, megvizsgáltuk, hogy mennyire jól modellezi az *in vivo* regisztrált gamma oszcillációkat az agyszeletben farmakológiailag kiváltott gamma oszcilláció. A kísérleteinket a hippokampuszban végeztük, amely agyterület CA3 régiójának neuronhálózata önmagában képes gamma oszcillációt generálni az eddigi *in vivo* és *in vitro* mérések alapján (Bragin et al., 1995; Fisahn et al., 1998). Ha összehasonlítjuk a szabadon mozgó patkány hippokampuszában mért gamma oszcilláció jellemző tulajdonságait a hippokampusz-szeletben egy kolinerg receptor agonista, a karbakol applikációjával kiváltott gamma oszcilláció tulajdonságaival, akkor azt látjuk, hogy a CA3 régió lokális mezőpotenciáljában regisztrálható gamma oszcilláció fázisainak réteg szerinti változása, az áramsűrűség mintázatának eloszlása ill. a piramissejtek és gátlósejtek tüzelési sajátosságai nagyon hasonlóak, szinte teljesen megegyeznek (**2. ábra**). Ezek a megfigyelések azt sugallják, hogy a hippokampusz CA3 régiójában az *in vitro* körülmények közt kiváltható gamma oszcilláció jó modellezi az ezen agyterületben *in vivo* mért gamma oszcilláció számos tulajdonságát.

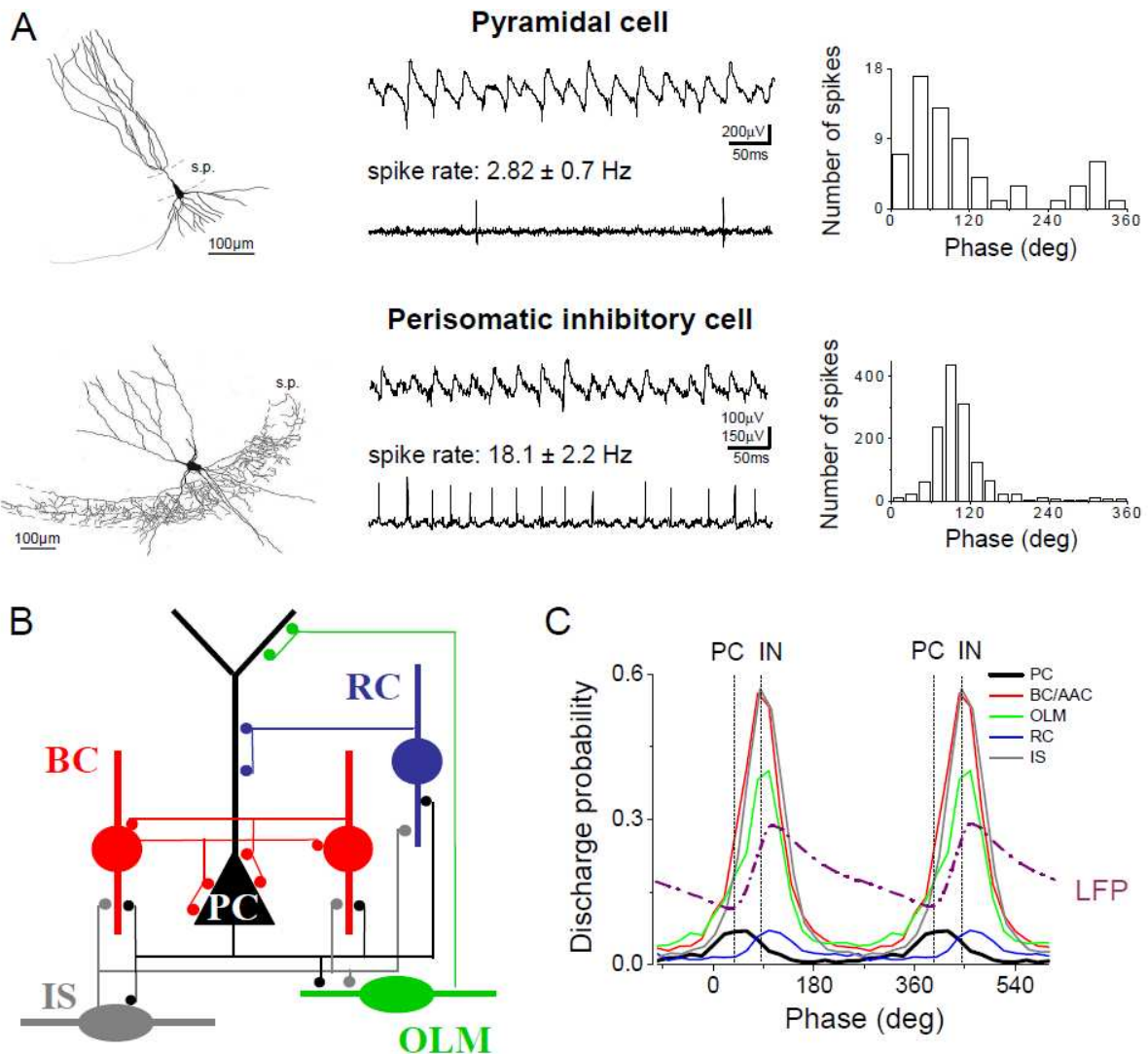
A különböző idegsejt típusok tüzelési tulajdonságai a karbakol indukált gamma oszcilláció alatt a hippokampusz CA3 régiójában (1. részfeladata). Az *in vitro* oszcillációs modellünk alkalmazásának megerősítése után, megvizsgáltuk az egyes idegsejt típusok tüzelési sajátosságait a karbakollal indukált gamma oszcillációk alatt. A kísérleteinkben karbakolt adtunk a tápoldathoz, majd két üvegelektrod segítségével extracellulárisan detektáltuk a ritmikusan változó lokális mezőpotenciált a CA3 piramissejtek rétegéből és, párhuzamosan, vizuális kontroll alatt egy adott idegsejt akciós potenciáljait. Az adatgyűjtés után intracellulárisan *biocytint* juttatunk az elvezetett idegsejtbe, amit immuncitokémiai módszerekkel láthatóvá tettük, majd anatómiailag azonosítottuk a sejteket. Eredményeink azt mutatták, hogy a piramissejtek rétegéből elvezetett mezőpotenciál negatív csúcsán tüzelnek a piramissejtek, amit 2-3 ms késéssel követ a fáziskapcsolt gátlósejtek kisülése. Ez az időbeni késés megfelel a monoszínaptikus transzmisszió idejének. Ezen eredmények alapján

feltételezhetjük, hogy a gamma oszcilláció alatt a piramis sejtek a lokális kollaterálisuk révén aktiválják a gátló interneuronokat, amely idegsejtek visszacsatoló módon szabályozzák a piramis sejtek szinkron kisülését. Tehát a CA3 régióban keletkező gamma oszcillációkat egy visszacsatoló (*feed-back*) szinaptikus gátlás hozná létre. Ezen túlmenően azt állapítottuk meg, hogy szinte az összes gátlósejt típus tüzelése fáziskapcsolt volt a gamma oszcillációhoz. A sejt típusok közti eltérés elsősorban a tüzelési frekvenciában ill. a fáziskapcsoltságban mutatkozott (Hajos et al., 2004) (**3. ábra**), amely jelenségek mögötti mechanizmusokat a következőkben próbáltuk feltárni.



2. ábra. A szabadon mozgó állatban (*in vivo*) és túlélő agyszeletben (*in vitro*) mért gamma oszcillációk összehasonlítása a patkány hippokampuszának CA3 régiójából. A, B, Mindkét esetben az oszcilláció negatív csúcsán a piramis sejtek rétegében (str. pyr.) ún. áramnyelő (*current sink*) figyelhető meg, míg a pozitív csúcsnál ún. áramforrás (*current source*). A piramis sejtek dendritikus régiójában (str. rad.) mind a lokális mezőpotenciál, mind az áram áramlásának iránya tükörképe volt a piramis sejtek rétegében mért jeleknek. A szabadon mozgó állatban az elvezetések szilikon probe-bal történtek, míg a szeletben 64-csatornás sokelektrodás griddel. Ezen jellegzetességeken túl a sejtek kisülése is összevethető volt (C, D). A gamma oszcilláció negatív csúcsán tüzeltek a CA3 piramis sejtek, amit a lokális interneuronok kisülése követett. A, C ábrák Csicsvári et al., 2003 cikkből, míg B, D a Hájos et al., 2004 munkából származik.

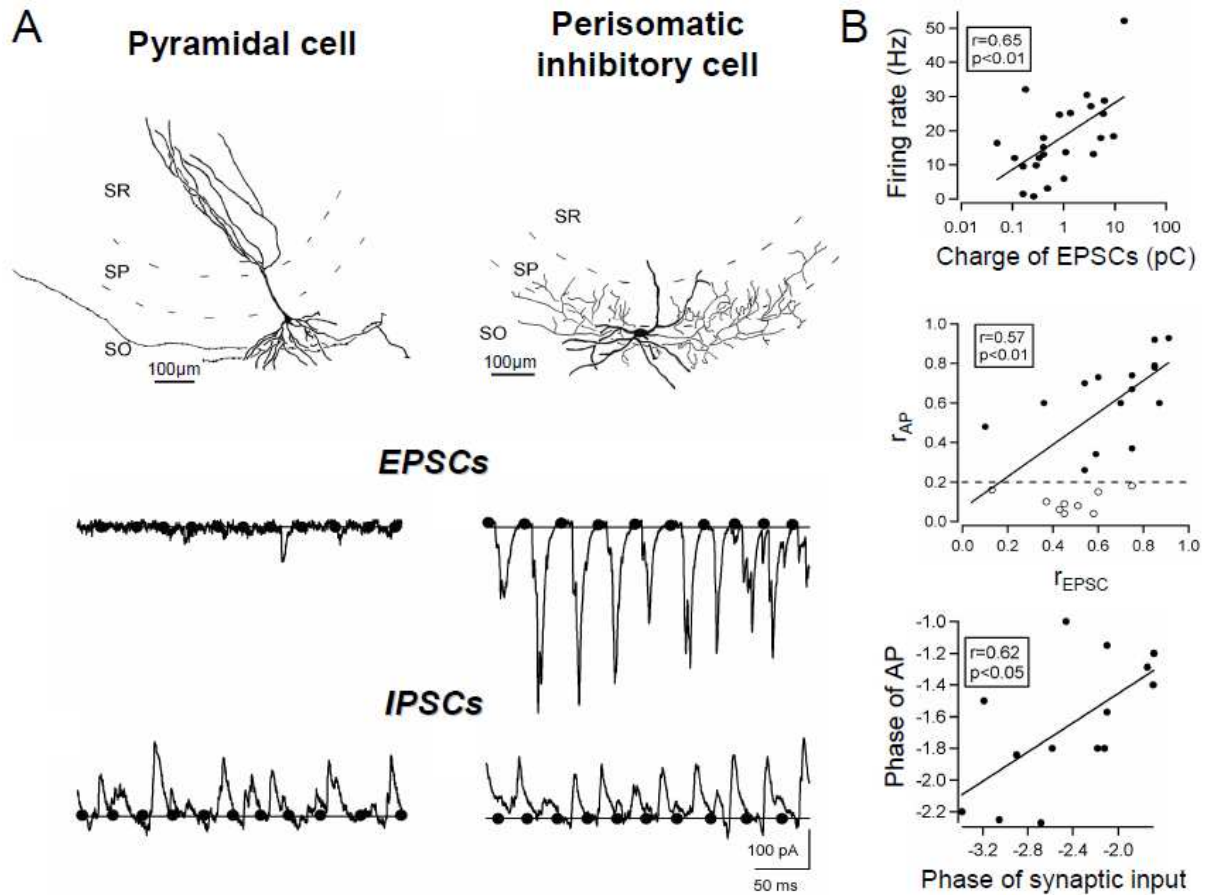
Az idegsejtekre érkező szinaptikus bemenetek jellegzetességei a gamma oszcillációk alatt (2. részfeladat). Az előző kísérleti eredmények azt mutatták, hogy a piramis sejtek tüzelésének fázisa jellemzően eltér a gátlósejtétől, ill. az egyes gátlósejt típusok aktivitásában szintén nagyfokú heterogenitás volt tapasztalható. Ezért a következő kérdésünk az volt, hogy mi az oka az egyes neurontípusok tüzelési viselkedésében mutatkozó különbségeknek az oszcillációk alatt, azaz mi határozza meg a sejtek kisülésének fázisát és fáziskapcsoltságát.



3. ábra. Az idegsejtek eltérő tüzelési tulajdonságai a gamma oszcilláció alatt a hippokampusz-szelet CA3 régiójában. A, Két példa az anatómiailag azonosított idegsejtek eltérő tüzelési sajátosságaira a hozzájuk tartozó fázishisztogrammal. A piramisisejtek alacsony frekvenciával tüzelnek, korábban mint a gátlósejtek egy adott gamma cikluson belül. B, A CA3 neuronhálózat sematikus rajza. C, A különböző típusú, fáziskapcsoltan tüzelő idegsejtek fázishisztogramjainak átlaga a gamma oszcilláció alatt. Minden gátlósejt-típus (IN) a piramisisejtek (PC) kisülése után tüzelt akciós potenciált. BC, kosársejt; AAC, axoaxonikus sejt; OLM, interneuron a stratum oriensben, amely axonja a stratum lacunosum-moleculare-ban arborizál; RC, interneuron, amelynek mind a dendritje, mind az axonfája a stratum radiatum-ra korlátozódik; IS, interneuron-szelektív interneuron morfológiájára hasonlító sejtek; LFP, lokális mezőpotenciál; s.p. stratum pyramidale.

A kérdés megválaszolására először elvezettük az idegsejtek aktivitását extracellulárisan, majd whole-cell patch-clamp technikával intracellulárisan detektáltuk a sejtre érkező serkentő ill. gátló posztzinaptikus áramokat. A sejtek típusát az elvezetés után anatómiailag azonosítottuk. Az elektrofiziológiai elvezetések analizésénél a sejtek tüzelési frekvenciáját és fáziskapcsoltságát korreláltattuk a sejtre érkező áramok amplitúdójával illetve időzítettségével. Azt találtuk, hogy az oszcilláció adott fázisában a sejtre érkező szinaptikus bemenetek különböztek a sejt-típusok között. Míg a piramisisejtek esetében a fáziskapcsolt gátlás dominált, addig a fáziskapcsoltan tüzelő periszomatikus gátlósejtek erős, fáziskapcsolt serkentésben részesültek. Erős pozitív korrelációt találtunk a sejtekre adott fázisban érkező serkentő és gátló áramok aránya és a tüzelési frekvencia között, valamint - interneuronok

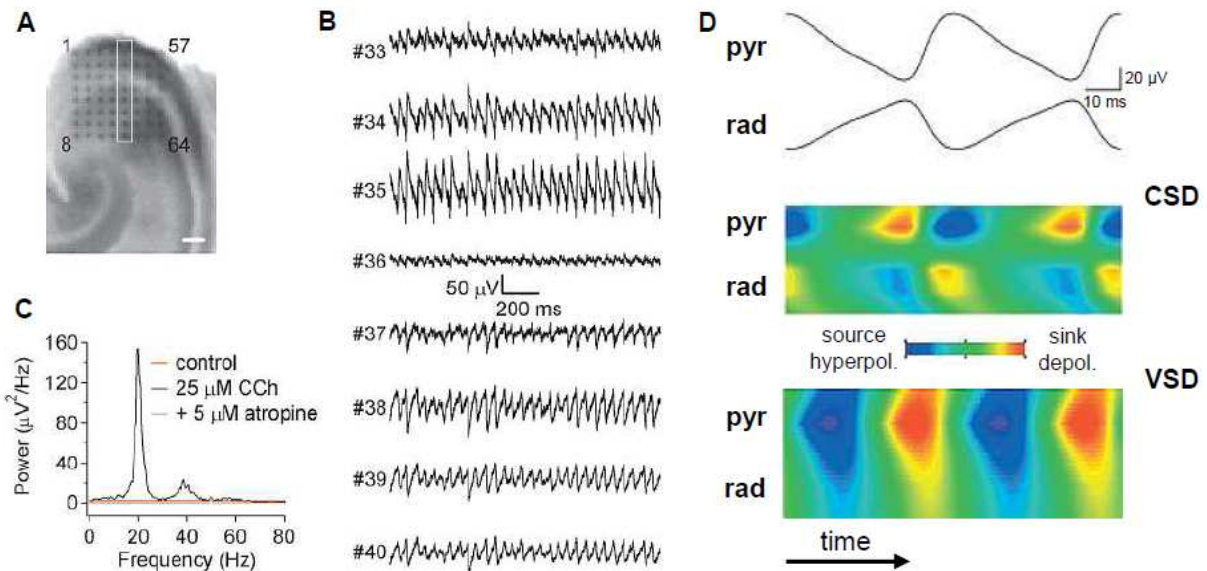
esetén - a sejtre érkező serkentés és az akciós potenciálok fáziskapcsoltságának pontossága között. Ezek az eredmények szintén alátámasztják a hipotézisünket, miszerint a karbakol-indukált gamma oszcillációért a hippokampusz CA3 régiójában egy rekurrens mechanizmus a felelős, ahol a piramis sejtek tüzelését elsősorban a rájuk érkező periszomatikus gátlás, míg a gátló sejtek kisülését a CA3 piramis sejtektől eredő serkentés időzíti (Oren et al., 2006)(4. ábra).



4. ábra. Az idegsejtek eltérő szinaptikus bemenetei a gamma oszcilláció alatt a hippokampusz-szelet CA3 régiójában. A, Két példa az anatómiailag azonosított idegsejtek eltérő serkentő (EPSC) és gátló szinaptikus áramaira (IPSC) az oszcillációk alatt. Alacsony Cl⁻ tartalmú oldattal a pipettában az EPSC-k -65 mV tartófeszültségen, míg az IPSC-k 0 mV tartófeszültségen lettek elvezetve. Amíg az IPSC-k hasonló tulajdonságokkal rendelkeztek, az EPSC-k sokkal kisebbek voltak a CA3 piramis sejteken, mint a gátló sejteken. B, A serkentő szinaptikus jelátvitel meghatározza a sejtek tüzelési frekvenciáját. Továbbá, az akciós potenciálok fáziskapcsoltságát (r_{AP}) megszabja a rájuk érkező serkentő áramok fáziskapcsoltsága (r_{EPSC}). Ezen túlmenően, az akciós potenciálok fázisát a serkentő és gátló áramok együttese szabályozza. A fázis radiánban van megadva.

A periszomatikus gátlásnak meghatározó szerepe van a gamma oszcilláció generálásában (3. részfeladat). Az eddigi eredményeinkből látható, hogy számos gátlósejt-típus fáziskapcsolatlan tüzel az oszcilláció alatt. A következőkben azt a kérdést vizsgáltunk, hogy melyik gátlósejt-típusok játszanak főszerepet az oszcillációk generálásában, azaz a periszomatikus vagy a dendritikus gátlósejtek alakítják ki a ritmikus aktivitást a CA3 régióban, avagy e funkcionálisan elvááló sejtcsoportok együttes működése szükséges ehhez. A kísérletek során az elektrofiziológiai méréseket kombináltuk képalkotó eljárásokkal, ahol feszültségfüggő festékek fluoreszcenciáját analizáltuk az oszcillációk alatt. Megállapítottuk,

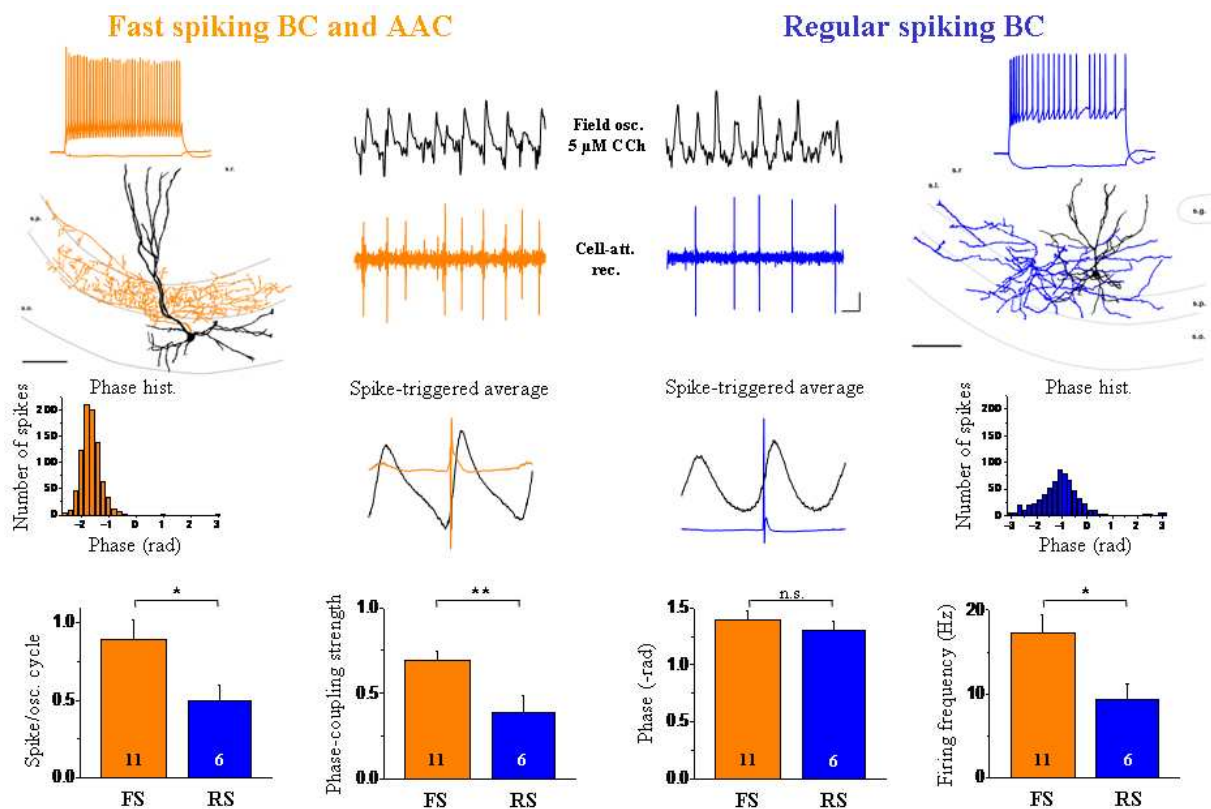
hogy a karbakol-indukált hálózati oszcillációkban az aktív folyamatok (a sejtek tüzelése ill. szinkronizált gátlás) a periszomatikus régióra szorítkoznak. Ezzel párhuzamosan a farmakológiai kísérleteink megerősítették, hogy a dendritikus régió csak passzívan vesz részt az oszcillációban. Összegezve e munka eredményeit elmondhatjuk, hogy a CA3 régióban a kolinerger receptorok aktiválásával kiváltott oszcillációk kialakításáért a piramisisejtek és a periszomatikus gátlósejtek időben összerendezett tüzelése a felelős (Mann et al., 2005) (**5. ábra**).



5. ábra. A periszomatikus gátlás generálja a hálózati oszcillációkat a hippocampusz CA3 régiójában. A, Egy hippocampusz-szeletet a 64-csatornás sokelektrodos griden. A fehér téglalap jelöli az elektród sort, amellyel a B ábrán látható mezőpotenciál-ingadozás volt regisztrálva. Skála, 200 µm. B, 25 µM karbakol (CCh) oszcillációt indukált a szeletben, amely oszcillációnak a polaritása megfordult a stratum lucidumban (#36). C, Az oszcilláció teljesítménysűrűsége jól mutatja, hogy karbakol mellett 20 Hz-nél van az oszcilláció csúcsa egy felharmonikussal 40 Hz-nél. A mérés szobahőmérsékleten történt. Sem karbakol nélkül, sem atropin (egy muszkarin receptor antagonist) jelenlétében nem lehet oszcillációt detektálni a hippocampális-szeletekben. D, Az oszcilláció átlagolt görbéje a piramisisejtek rétegéből ill. a stratum radiatumból a megfelelő áramsűrűség profillal (CSD) és egy feszültség-érzékeny festék jeleinek átlagával. Ezek az ábrák azt mutatják, hogy az aktív áramforrások és nyelők a periszomatikus rétegre lokalizálódnak, tehát ezt a réteget beidegző gátlósejtek felelősek az oszcilláció generálásáért.

A periszomatikus gátlósejtek közül a gyorsan tüzelő kosársejtek önmagukban elégségesek az oszcilláció kialakulásához (3. részfeladat). Miután a fent vázolt kísérleti eredmények tisztán a periszomatikus gátlósejtek kulcsszerepére utaltak, felmerült, hogy a periszomatikus gátlósejtek típusai közül melyek felelősek az oszcilláció generálásáért a hippocampusz CA3 régiójában. A piramisisejtek periszomatikus régióját három típusú gátlósejt idegzi be: (1) a gyorsan tüzelő, parvalbumin expresszáló kosársejtek (FS-BC), amelyek a sejttesteket és a proximális dendriteket innerválják; (2) a gyorsan tüzelő, parvalbumin expresszáló axoaxonikus sejtek (AAC), amelyek a piramisisejtek axon iniciális szegmentumait idegzik be és (3) a szabályosan tüzelő, kolecisztokinin (CCK) tartalmazó kosársejtek (RS-BC), amelyek axonterminálisai elsősorban sejttesteken és proximális dendriteken végződnek (Freund and Buzsáki, 1996). Első lépésként meghatároztuk ezen sejtípusok tüzelési tulajdonságait a karbakollal kiváltott oszcilláció alatt szobahőmérsékleten, amikor az oszcilláció jellemző frekvenciája 15-20 Hz (**5. ábra**). Azt találtuk, hogy a FS-BC-k és az AAC-k az oszcilláció szinte minden ciklusában kiszültek és erős fáziskapcsoltságot

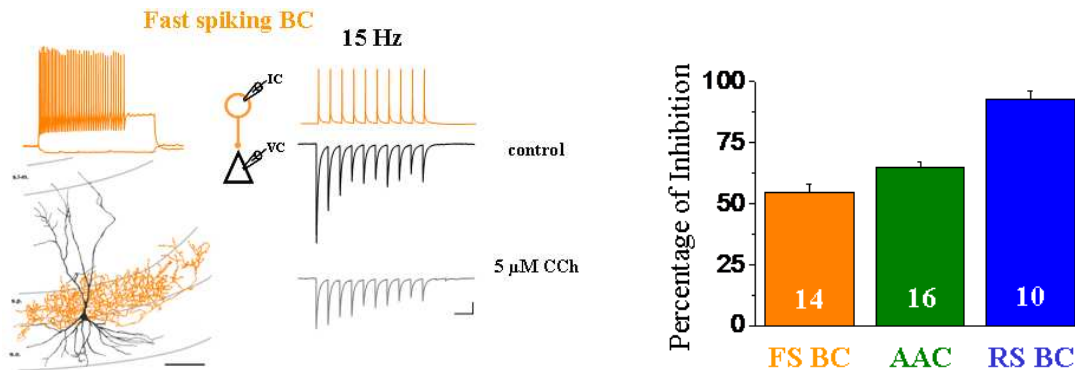
mutattak, míg a RS-BC-k általában minden második ciklusban tüzeltek és szignifikánsan gyengébben voltak fáziskapcsoltak. Minden sejttípus ugyanabban a fázisban tüzelt, a piramis sejtek kisülése után. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy mindhárom sejttípus részt vehet a periszomatikus gátlás kialakításában a karbakol indukált oszcilláció alatt (**6. ábra**). Mivel az oszcilláció erőssége és a gátlós szinaptikus transzmisszió hatékonysága közt szoros összefüggés van, továbbá a FS-BC-k és AAC-k axonvégződésein lokalizálódó M2 muszkarinikus acetilkolin receptorok (Hajos et al., 1998) ill. a RS-BC-k axonterminálisain található CB1 kannabinoid receptorok (Hajos et al., 2000) karbakollal történő aktiválása igen hatékonyan csökkenti a GABA felszabadulását a periszomatikus gátlósejtek axonvégződéseiből (Hefft et al., 2002; Neu et al., 2007), ezért arra voltunk kíváncsiak, hogy vajon milyen mértékű lehet ezen sejtektől eredő gátló szinaptikus áramok (IPSC) csökkenése olyan koncentrációjú karbakol mellett, ami elégséges az oszcilláció kiváltásához. Tehát, ha meghatározzuk az egyes periszomatikus gátlósejtek axonvégződéseiből felszabaduló GABA mértékét adott koncentrációjú karbakol jelenlétében, akkor közelebb kerülhetünk ahhoz, hogy tisztázzuk ezen gátlósejttípusok szerepét az oszcillogenezisben.



6. ábra. A periszomatikus gátlósejtek viselkedése a karbakol indukálta oszcillációk alatt. A felső sorban két példa szemlélteti a FS-BC és RS-BC tüzelésének eltérő gyakoriságát az oszcilláció közben. Az elvezetett sejtek dendritfája (fekete) a CA3 régió számos rétegében megtalálható, ezzel szemben a sejtek axonfája elsősorban a piramis sejtek szomatikus régiójára korlátozódik. A ± 300 pA-es négyzetjelre adott feszültségválasza a sejteknek mutatja, hogy az akciós potenciálok alakja és gyakorisága alapján is jól szegregálható a két sejttípust. A középső sorban az adott sejtek oszcillációk közben regisztrált tüzeléséből számolt fázishisztogramok és „spike-triggered average”-k mutatják, hogy mindkét sejttípus fáziskapcsoltan tüzelt, de a FS-BC-k sokkal pontosabban követték az oszcilláció adott fázisát. Az alsó sorban a tüzelési tulajdonságok vannak összehasonlítva.

Hogy kiderítsük milyen hatékonysággal csökkenti a karbakol az IPSC-k amplitúdóját, párelvezetéseket végeztünk hippocampusz-szeletekben. Kísérleteinkben a preszinaptikus

gátlósejtben 10 akciós potenciált váltottunk ki az oszcillációban tapasztalt, az adott sejt típusra jellemző frekvenciával (FS-BC és AAC esetében 15 Hz-cel, míg a RS-BC esetében 10 Hz-cel), és mértük a poszt-szinaptikus CA3 piramis sejtben kiváltott IPSC-eket, majd a szeleteket karbakollal kezeltük, és összehasonlítottuk a kiváltott IPSC-k amplitúdóját a drogkezelés előtt és után.



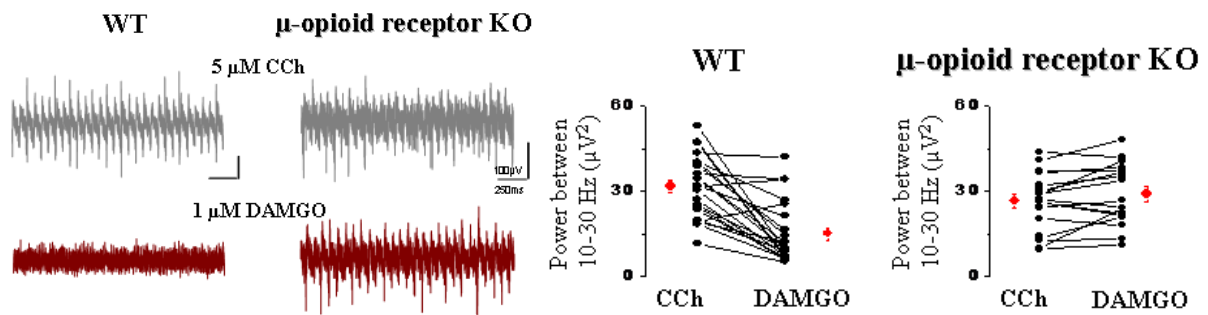
7. ábra. A baloldali rész egy példát mutat be a párelvezetésekre. A preszinaptikus FS-BC-ben 15 Hz-cel 10 akciós potenciált váltottunk ki, és mértük a poszt-szinaptikus piramis sejtben az IPSC-eket. A jellemzően depresszálló szinaptikus kapcsolat mértéke jelentősen csökkent karbakol bemosása után. A jobboldali grafikon mutatja a karbakol hatására bekövetkező gátlás mértékének százalékos csökkenését az egyes periszomatikus gátlósejt típusokban.

Azt találtuk, hogy az egyes sejt típusok ingerlésével kiváltott IPSC-k eltérő mértékben gátolhatók karbakollal. A FS-BC – piramis sejt párokban a gátlás mértéke kb. 50%-os volt, azaz felére csökkent a kiváltott IPSC-k amplitúdója, az AAC – piramis sejt párokban a gátlás mértéke nagyobb volt, míg a RS-BC-kből karbakol hatására a GABA ürülés gyakorlatilag megszűnt (**7. ábra**). Tehát, ezek az eredmények azt mutatják, hogy a karbakollal kiváltott oszcillációk generálásában az RS-BC-k nem vehetnek részt, attól függetlenül, hogy fáziskapcsoltan tüzelnek az oszcillációk alatt, hiszen ilyen körülmények közt az axonvégződéseikből nem szabadul fel GABA.

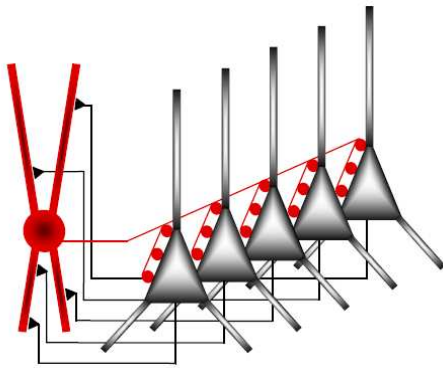
A következőkben azt szeretnénk volna megállapítani, vajon milyen mértékben függ az oszcillogenezis a FS-BC-k és az AAC-k működésétől. Ezt úgy próbáltuk megválaszolni, hogy e sejt axonvégződésein lokalizálódó μ -opioid receptorok aktiválhatóságát vizsgáltuk (Glickfeld et al., 2008). Párelvezetésekben a karbakol kezelés után a szeletekhez DAMGO-t, egy μ -opioid receptor agonistát adtunk, és megmértük az IPSC-k amplitúdójában bekövetkező csökkenés mértékét. Azt kaptuk, hogy amíg a FS-BC-k által kiváltott IPSC-k karbakol jelenlétében tovább csökkentek, de nem gátlódtak teljesen DAMGO hatására, addig az AAC-k által kiváltott IPSC-k amplitúdója nem változott. Tehát, ha karbakol kiváltott oszcillációt a DAMGO megszünteti, akkor a periszomatikus gátlósejt közt az AAC-k önmagukban nem képesek létrehozni az oszcillációt a hippocampus CA3 régiójában, így a FS-BC-k egyedül elégségesek lehetnek a ritmusgeneráláshoz. Ezzel szemben, ha a DAMGO applikációja nem befolyásolja az oszcillációt, akkor a FS-BC-k és az AAC-k közösen generálják a ritmikus aktivitást. A kísérletek során azt állapítottuk meg, hogy a DAMGO megszünteti a karbakol által generált oszcillációt a hippocampus CA3 régiójában (**8. ábra**). Ezekből a kísérletekből azt a következtetést vontuk le, hogy a periszomatikus gátlósejt típusok közt a FS-BC-k szinkronizált működése ebben a neuronhálózatban önmagában elégséges az oszcilláció kialakításához (**9. ábra**).

Ezekről a még nem publikált eredményeinkről meghívott előadóként beszámoltam a FENS 2008. július 12-16 közt Genfben tartott konferenciáján és a MITT 2009. január 22-24-e

közt Budapesten rendezett konferenciáján. A gyorsan tüzelő kosársejtek kulcsszerepéről az oszcilláció kialakításában most készítettünk egy kéziratot (Gulyás et al., kézirat).



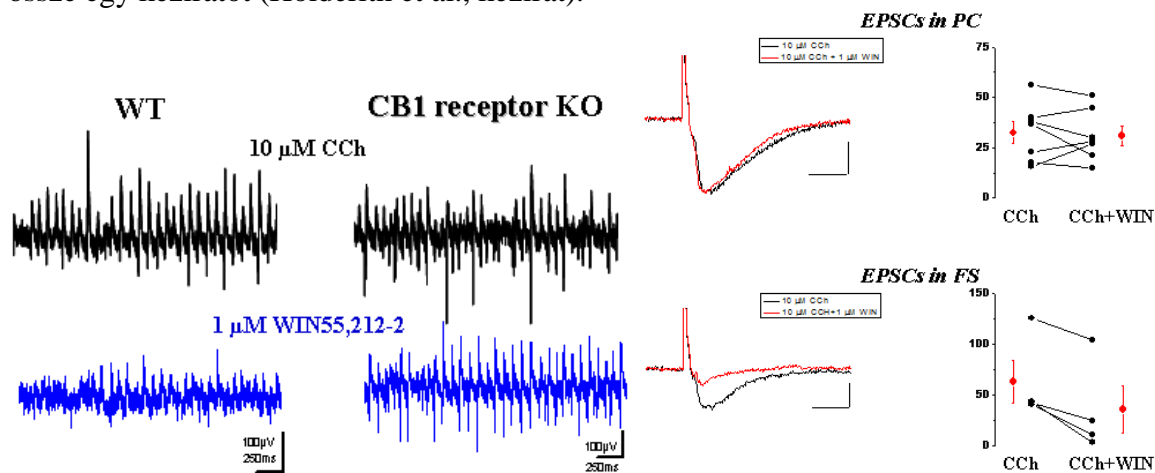
8. ábra. A baloldali ábra mutatja, hogy a vad típusú egér hippocampusz-szeletében karbakollal indukált oszcillációt a DAMGO megszünteti. Ezzel szemben, a mu-opioid receptor génhiányos egérben ez a hatás nem figyelhető meg, ami mutatja, hogy a DAMGO szelektíven a mu-opioid receptorok aktiválásán keresztül csökkenti a szinkron aktivitást. A jobboldali összesítő ábrákon az látható, hogy a vad típusú egérben jellemzően csökkent az oszcilláció ereje DAMGO hatására, míg a KO egérben nem.



9. ábra. A CA3 régió lokális neuronhálózatának sematikus ábrája, amely képes a gamma oszcilláció generálására. A CA3 piramissejtek populációjának szinkron kisülése fázikus szinaptikus serkentésen keresztül kisüti a gyorsan tüzelő kosársejteket, amely gátlósejtek visszacsatoló gátláson keresztül időlegesen elcsendesítik a piramissejtek aktivitását. Amikor a szinaptikus gátlás lecsengett, a piramissejtek aktivitása elér egy küszöböt, amikor újból ki tudják sütni a kosársejteket, és így egy újabb gamma ciklus generálódik.

A CB1 kannabinoid receptorok aktiválása a gyorsan tüzelő kosársejtek serkentő bemenetén keresztül képes a gamma oszcillációk gátlására. A korábbi *in vitro* kísérleteink (Hajos et al., 2000) és *in vivo* mérések (Robbe et al., 2006) eredményei azt mutatták, hogy a CB1 receptorok ingerlése a szinkron idegi aktivitást hatékonyan gátolja, ami magyarázhatja a marihuána káros hatását a rövidtávú memóriafolyamatokra. Hogy megértsük a sejtszintű folyamatokat, amin keresztül a CB1 kannabinoid receptorok aktivációja csökkenti a CA3 régióban keletkezett gamma oszcillációkat, azt vizsgáltuk, hogy a **9. ábrán** bemutatott neuronhálózat melyik szinapszisainak a működését szabályozzák a kannabinoid receptor ligandumok. Ez különösen az előbb leírt eredmények fényében vált izgalmas kérdéssé, miszerint a RS-BC-k axonvégződéseiből, ahol a legnagyobb mennyiségben találhatóak a CB1 receptorok, nem szabadul fel az oszcilláció közben GABA, tehát nem ezen szinapszisok működésének a gátlásán keresztül csökkentik a kannabinoidok a gamma oszcilláció erejét (Hajos et al., 2000). Mivel a FS-BC-k és az AAC-k axonvégződésein nem kimutatható a CB1 receptorok jelenléte (Hajos et al., 2000), ezért feltételeztük, hogy a serkentő idegvégződéseken található CB1 receptorok aktiválása csökkentheti az oszcillációt. Ismert, hogy a piramissejtek egymást innerváló axonterminálisaikon szintén vannak CB1 receptorok (Katona et al., 2006), ill. fiziológiai kísérletek azt mutatták, hogy a gátlósejtekre érkező serkentő szinapszisok nem érzékenyek kannabinoidokra (Hoffman et al., 2003). Ezekből az eredményekből azt vártuk, hogy a piramissejtekre, és nem a FS-BC-kre érkező serkentő

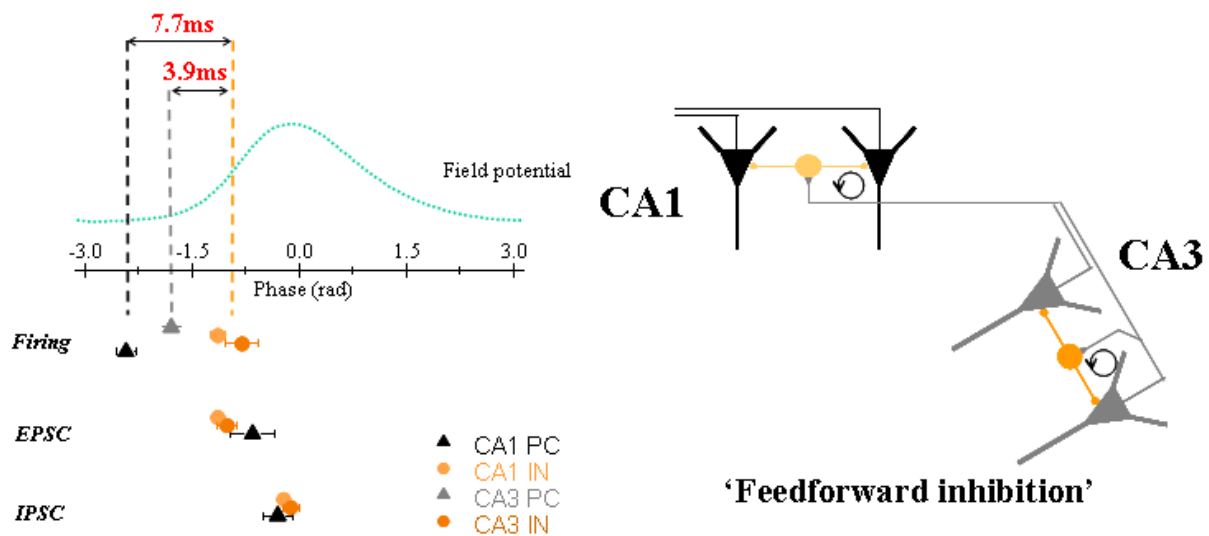
szinaptikus áramok (EPSC) amplitúdóját fogják csökkenteni a CB1 receptor agonisták karbakol jelenlétében, ami megmagyarázná a kannabinoidok az oszcillációkra gyakorolt hatását. A várakozással szemben, a kísérleteink pont az ellentétes eredményt hozták: a CB1 receptorok aktiválása, amely csökkenti a karbakol indukált oszcilláció erejét, csökkenti a serkentő szinaptikus transzmisszió hatékonyságát a FS-BC-ken, de a CA3 piramissejteken nem (10. ábra). Tehát következtetésként levonhatjuk, hogy a FS-BC-k serkentő bemenete olyan mértékben érzékeny kannabinoid ligandumokra, amely képes a hálózati oszcillációkat is csökkenteni, ha az acetilkolin receptorok aktiválva vannak. Erről a munkáról jelenleg állítunk össze egy kéziratot (Holderith et al., kézirat).



10. ábra. A baloldali ábra mutatja, hogy a vad típusú egér hippocampusz-szeletében karbakollal indukált oszcilláció erejét a WIN55,212-2 CB1 receptor agonista (WIN) jelentősen lecsökkenti. Ezzel szemben, a CB1 receptor génhiányos egérben ez a hatás nem figyelhető meg, ami mutatja, hogy a WIN a CB1 receptorok aktiválásán keresztül csökkenti a szinkron aktivitást. A jobboldali ábra azt szemlélteti, hogy a piramissejteken (PC) fokális elektromos stimulálással kiváltott EPSC-k amplitúdója nem csökken WIN applikációja után karbakol mellett, míg a FS-BC-ken kiváltott EPSC-k amplitúdója igen.

A CA3 régióban keletkező gamma oszcilláció előrecsatoló gátlással terjed át a CA1 régióba. Mind az *in vivo*, mind az *in vitro* vizsgálatok azt sugallták (Bragin et al., 1995; Csicsvari et al., 2003; Fisahn et al., 1998), hogy a hippocampusz CA1 régiója önmaga nem képes gamma oszcillációt generálni, hanem az itt regisztrálható gamma oszcillációt más régiókból érkező ritmikus bemenet hozza létre. Egyes *in vivo* kísérleti eredmények azt jósolták, hogy a gamma oszcilláció betérése előrecsatoló gátláson keresztül valósul meg (Csicsvari et al., 2003), azaz a más agyterületről érkező ritmikus serkentés a lokális gátlósejtek közvetlen aktiválásával alakítja ki az oszcillációt. Mások inkább az előrecsatoló serkentést tartották a lehetséges sejt szintű mechanizmusnak, amikor a más agyterületről érkező ritmikus serkentés a lokális piramissejtek tüzelését szinkronizálja, amely idegsejtek serkentik e régió gátlósejtjeit, ami eredményeképp kialakul a gamma oszcilláció (Fries et al., 2007). A következő kísérletsorozatban azt vizsgáltuk meg, melyik mechanizmussal terjed át a gamma oszcilláció a CA3-ból a hippocampusz CA1 régiójába. Több hónapos kísérletezés után Dr. Niedetzky Csabával a Supertech Kft vezetőjével egy olyan új típusú szeletkamrát és oldatfűtőt hoztunk létre, amely segítségével a CA1 régióban fenntartható a gamma oszcilláció (részleteket a kamráról lásd lejjebb). Az így létrehozott kísérleti körülmények segítségével meghatároztuk a CA1 régió különböző típusú idegsejtjeinek tüzelési tulajdonságait ill. a rájuk érkező szinaptikus bemenetek sajátosságait. Az eredményeink azt mutatják, hogy a CA1 piramissejtek csak kevéssé fáziskapcsoltan tüzeltek. Ezzel szemben a lokális gátlósejtek tüzelése erősen fáziskapcsolt volt. Mind a piramissejtekre, mind a gátlósejtekre a szinaptikus

áramok fáziskapcsoltan érkeztek. A piramis sejtekre a domináns szinaptikus bemenet a gátló volt, míg a gátló sejteken a serkentő szinaptikus bemenet volt a jellemző. Az egyes sejtek tüzelésének és a szinaptikus bemeneteinek időzítettségéből azt a következtetést vontuk le, hogy a CA1 régióban keletkezett gamma oszcillációt a lokális gátló sejtek szinkron aktivitása hozza létre, amely szinkron aktivitást a CA3 piramis sejtek időben összehangolt tüzelése biztosítja (11. ábra). Tehát összefoglalva, amíg a CA3 régióban a gamma oszcilláció létrejött visszacsatoló (*feed-back*) szinaptikus mechanizmuson alapul, addig a hippokampusz CA1 régiójában a gamma oszcilláció előretartó (*feed-forward*) gátláson keresztül jön létre. A CA3-ban ill. a CA1-ben a serkentő és gátló sejtek általunk megfigyelt tüzelési sajátosságai összhangban vannak az éber állatból mért eredményekkel (Csicsvári et al., 2003), ami tovább erősíti az *in vitro* modellünk *in vivo* relevanciáját. Erről a munkánkról egy kézirat van készülőben (Zemankovics et al., kézirat).



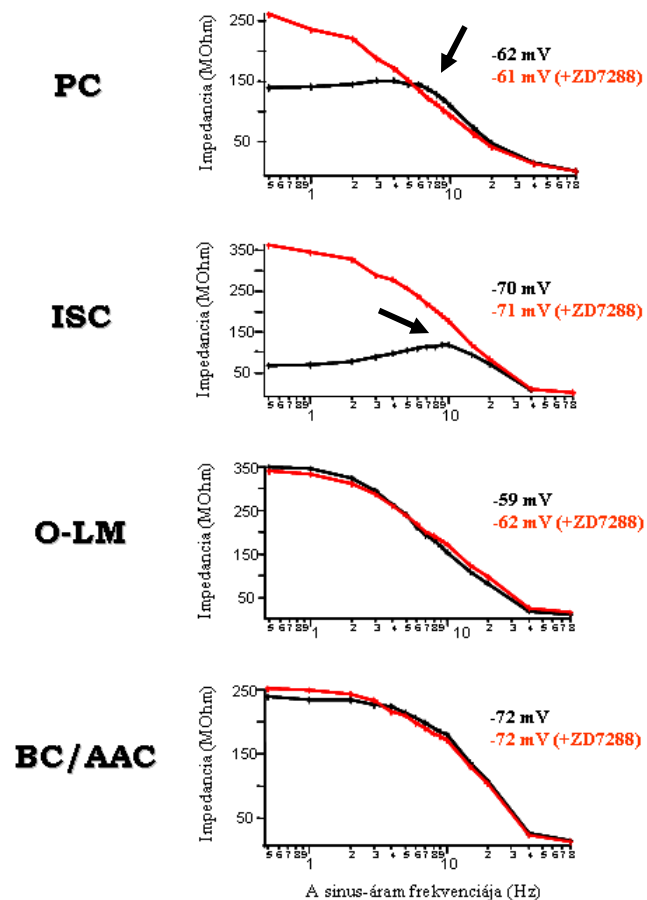
11. ábra. A baloldali ábra szemlélteti a CA1 régióban mért oszcillációhoz képest az egyes sejt típusok mikor tüzelnek ill. melyik fázisban érzékelik rájuk a serkentő és gátló szinaptikus áramok. Jellemzően a szinaptikus áramok minden sejtcsoportra közel azonos fázisba érkeztek. Míg a CA1 piramis sejtek és a CA1 ill. CA3 gátló sejtek tüzelése közti idő közel 8 ms volt, addig a CA3 piramis sejtek és a gátló sejtek kisülése közti idő megfeleltethető egy monoszynaptikus kapcsolatnak (3 - 4 ms). Ezen eredmények alapján azt a következtetést vontuk le, hogy a gamma oszcilláció során a CA3 piramis sejtek ritmikus serkentése határozza meg a CA1 régió gátló sejtjeinek kisülését *feed-forward* módon, és e sejtek szinkronizált aktivitása generálja a CA1 régióban a ritmikus lokális mezőpotenciál-változást gamma frekvenciával (jobb oldali ábra).

Oszcillációk keletkezése a CA1 régió részletes hálózati modelljében. A

neuronhálózatokban megfigyelt ritmikus aktivitások mechanizmusainak mélyebb megértéséhez közelebb kerülhetünk, ha számítógépes modellezés segítségével reprodukálni tudjuk az elektrofiziológiai módszerekkel mért jelenségek számos tulajdonságát. Ezen *in silico* technikák alkalmazásával arra kerestük a választ, hogy a CA1 régió neuronhálózata milyen frekvenciájú ritmust képes generálni. Először piramis sejtek, valamint kosársejtek és O-LM interneuronok morfológiailag egyszerűsített, de biofizikailag részletes modelljeiből létrehoztuk a hippokampusz CA1 régiójának hálózati modelljét. A modell segítségével vizsgáltuk a theta és gamma oszcillációk megjelenésének lehetséges mechanizmusait. Modellünk azt jósolja, hogy a CA1 régió nem képes lokálisan gamma ritmus generálására, viszont hatékonyan képes átvinni a CA3 régióból érkező gamma frekvenciás oszcillációt, és

ebben a folyamatban a periszomatikus interneuronok alapvető szerepet játszanak. A modell szerint viszont a CA1-es hálózat megfelelő moduláló bemenetek jelenlétében képes lehet théta frekvenciás aktivitás létrehozására, és igen összetett módon reagál a különböző pályákon érkező théta frekvenciás bemenetekre. Az elektrofiziológiai kísérleteinkre támaszkodva Káli Szabolcs ezen modellezési eredményeit egy dolgozatban szeretné közzé tenni.

A neuronális morfológia és feszültségfüggő konduktanciák hatása az idegsejtek frekvenciafüggő impedanciájára. Hogy felderítsük, pontosan miként is valósul meg a piramissejtek és a gátlósejtek időben összerendezett aktivitása, tovább vizsgáltuk a sejtek tüzelési tulajdonságai mögött álló mechanizmusokat. Ehhez nélkülözhetetlen az oszcillációk során a sejtekre érkező posztszinaptikus áramok pontos feltérképezése (lásd 2. részfeladat). A sejtek tüzelési tulajdonságait a rájuk érkező szinaptikus bemenetek mellett saját belső sejtélettani folyamataik is meghatározzák. A különféle sejtípusok passzív és aktív membrántulajdonságai eltérhetnek egymástól, és ez hatással lehet az oszcillációban betöltött szerepükre is. Ezért a posztszinaptikus áramok mellett megvizsgáltuk a sejtek ún. rezonancia-tulajdonságait is. A rezonancia azt jelenti, hogy adott frekvencia-tartományban a sejt nagyobb bemenő ellenállással bír, így e frekvenciával érkező jelekre a sejt nagyobb valószínűséggel tüzel. Vizsgálataink azt mutatták, hogy mind a piramissejtekben, mind a gátlósejtek egy csoportjában megfigyelhető rezonancia a 4-10 Hz-es, ún. théta frekvencia-tartományban. A sejtszintű elektrofiziológiai vizsgálataink kimutatták, hogy a jelenség kialakításában fontos szerepet tölt be a hiperpolarizációra aktiválódó h-áram, és a sejtek rezonancia-sajátságai korrelálnak a h-áram tulajdonságaival (12. ábra).

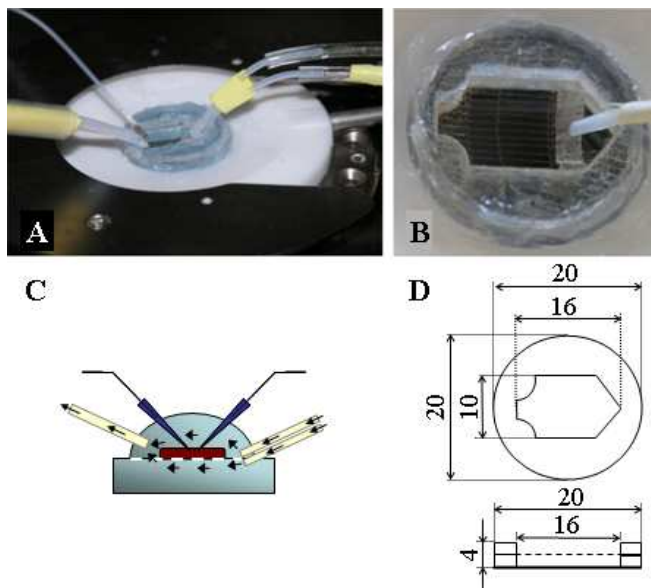


12. ábra. A CA1 régió négy különböző sejtípusának rezonancia-tulajdonságai. Míg a piramissejtekben (PC) és az interneuronszeletív gátlósejtekben (ISC) a szinusz-árammal mért impedancia-görbén jól látható csúcs van a 4-10 Hz-es frekvencia-tartományban (a fekete görbék legmagasabb értékeire mutatnak a nyilak), addig a kontroll állapotban sem figyelhető meg hasonló kicsúcsosodás az OLM ill. a gyorsan tüzelő periszomatikus gátlósejtek esetében (BC/AAC). Az első két esetben az impedancia-görbe alakját teljesen megváltoztatja és a rezonanciát megszünteti a specifikus h-áram blokkoló a ZD7288 applikációja (piros görbék), míg az utóbbi két esetben ez a blokkoló hatástalan volt a rezonancia-görbe lefutására.

Részletes (anatómiailag rekonstruált) és absztrakt idegsejtmodellek segítségével is vizsgáltuk a különböző hippokampális neurontípusok impedancia-tulajdonságait meghatározó

tényezőket. Sikerült zárt alakban felírható matematikai képletet találni a több feszültségfüggő konduktanciát tartalmazó, egyszerű dendritfával rendelkező neuronális modellek impedanciájára. Ennek segítségével megjósolható, hogy az egyes neurontípusok impedanciáját milyen feszültségfüggő konduktanciák határozzák meg, és ezek a sejten belül hol helyezkednek el. Azt találtuk, hogy míg a CA1 piramissejtek impedancia-profilját döntően a dendritekben elhelyezkedő hiperpolarizáció-aktivált vegyes kationáram ($I(h)$) határozza meg, az O-LM sejtek és az interneuron-specifikus gátlósejtek impedanciáját feltehetően az $I(h)$ mellett más feszültségfüggő konduktanciák is lényegesen befolyásolják. Ezekről az eredményekről egy kéziratot állítottunk össze (Zemankovics et al., kézirat).

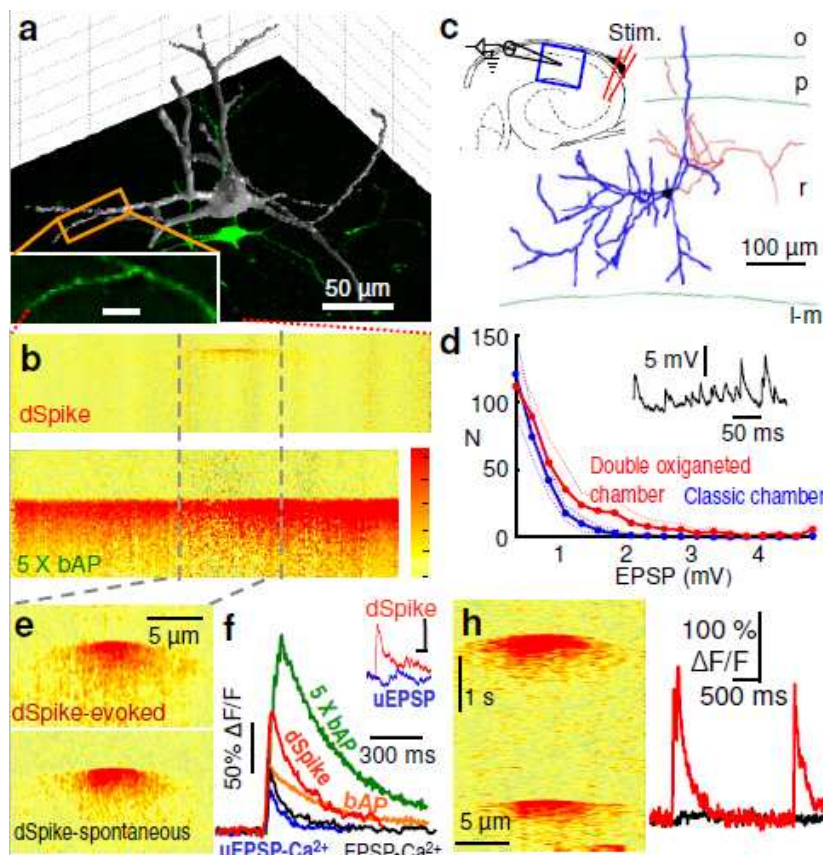
Az eddig összefoglalt eredményeinken túl a pályázat témájához kapcsolódva egy fejlesztést is megvalósítottunk a támogatott időszak alatt. Kialakítottunk egy olyan szövetszeletkamrát, amelyben a szeletek egy hálóra vannak helyezve, és mind a szelet alatt, mind a szelet felett áramlik az oxigenáltatott tápoldat. A kamra behelyezhető a mikroszkóp objektíve alá, így a kamra használható vizualizált patch-clamp elvezetésekhez és imaging technikákhoz is (**13. ábra**). Ezzel a megoldással elegendő oxigént tudunk biztosítani a szövetszeletekben található sejtek nagy energiafelhasználást igénylő működéséhez, mint pl. a szinkron idegi tevékenységének tanulmányozásához (Hajos et al, 2009). Az alábbiakban egy további példát szeretnék bemutatni, ami mutatja, hogy a duplaperfúziós szeletkamrában tartott szövetszeletekben az *in vivo* állapotokhoz közeli idegsejtaktivitás mérhető. Ez lehetővé teszi, hogy az eddig csak egész állatban detektált hálózati jelenségek is megfigyelhetőek legyenek *in vitro*, és ezáltal a sejszintű mechanizmusait részleteiben tanulmányozhassuk.



13. ábra. A, a duplaperfúziós szeletkamra a mérőállomásra szerelve. Jobboldalról két befolyócsövön keresztül érkezik a kamrába a tápoldat, majd baloldalon egy csövön távozik. B, a kamra felülnézetből. Vékony műanyaghálo tartja a kamrában a szeleteket. C, a sematikus rajzon a nyilak mutatják a kamrában a tápoldat áramlását a szövetszelet (bordó téglalap) alatt ill. felett. A két sötétkékszínű háromszög a szeletbe helyezett mérőelektródokat jelképezi. D, a kamra méretei (mm-ben).

A hippokampális idegsejtek spontán hálózati aktivitása képes kiváltani dendritikus spike-t a gátlósejtekben *in vitro* körülmények közt. Hogy megértsük a kérgi hálózatokban zajló sejszintű tanulási mechanizmusokat, ismernünk kell a sejtek dendritfájára érkező serkentő bemenetek összegződésének szabályait. Az egész állatban képkalkító eljárásokkal történt vizsgálatok kimutatták, hogy az idegsejtekre érkező szinaptikus bemenetek a dendritfák különböző szegmenseiben lokális Ca^{2+} spike-kokat váltanak ki. Ez a spike-genezis küszöbszerűen függ a bemenetek számától. A lokális spike-ok hatékonyan betérjednek a sejtek szómájára, ahol elősegítik az akciós potenciálok generálódását. A jelenség mögötti mechanizmusokat számos tanulmány vizsgálta szövetszeletekben, amikor a dendritikus spike-okat elektromos stimulációval vagy glutamát uncaging-gel indukálták. A mi kísérleteink arra

irányultak, hogy egyrészt kiderítsük, hogy a ideghálózat spontán aktivitása képes-e dendritikus spike-okat kiváltani, másrészt, hogy mi a jelenség sejszintű háttere. Az eredményeink azt mutatják, hogy a duplaperfúziós kamrában tartott hippocampusz-szeletekben olyan hálózati aktivitás van, amely spontán képes dendritikus spike-okat kiváltani gátlósejtek dendritjeiben (**14. ábra**). Ezek a spike-ok elsősorban a dendritelágazódásoknál keletkeznek az ún. *hot-spot* szegmenseknél, ahol a Ca^{2+} beáramlás igen masszív mind a hálózati aktivitás által kiváltott dendritikus spike-ok, mind a visszaterjedő akciós potenciálok esetében. A jelenség kiváltásához szükséges az NMDA-típusú glutamát receptorok működése. Tehát ezek az eredmények is azt a feltételezést erősítik, hogy a duplaperfúziós kamrában tartott szövetszeletekben tapasztalt jelenségek jobban közelítik az *in vivo* állapotokat (Murayama et al., 2009). Ez a munka kollaborációban történik Prof. Vizi E. Szilveszter laborjával, ahol a kísérleteket Dr. Rózsa Balázs irányítja.



14. ábra. A gátlósejtekben a dendritikus spike-ok spontán kiváltódnak a hálózati aktivitás eredményeként. A, 3D rekonstrukciója egy gátlósejtnek a CA1 régió stratum radiatumában; a sejt dendritjeit (kék) és axonjait (piros) anatómiai megjelenítés után rekonstruáltuk (C). B, A kijelölt dendritágban mérhető Ca^{2+} tranziensek spontán aktivitással ill. 5 db. akciós potenciál visszaterjedésével kiváltva. Az E ábrán az a kinagyított rész látható, ahol mind elektromos stimulálással (a kísérleti felállást a C ábra mutatja), mind spontán keletkezik dendritikus spike hasonló kinetikával (F). A D ábra szemlélteti, hogy a klasszikus *submerged* kamrához képest (kék), a duplaperfúziós szeptikumkamrában (piros) a spontán keletkező, nagy amplitúdójú serkentő poszt-szinaptikus potenciálok (EPSP) sokkal gyakoribbak. A H ábrarészen egy másik példa arra, hogy az elektromos stimulálással kiváltott dendritikus spike (a baloldali részen a felső, a jobboldali részen az első) tulajdonságai megegyeznek a spontán előforduló (a baloldali részen a alsó, a jobboldali részen a második) dendritikus spike-kal. A Ca^{2+} tranziensek mérése egy új típusú kétfoton-mikroszkóppal történtek prof. Vizi E. Szilveszter laboratóriumában Dr. Rózsa Balázs vezetésével.

A fiziológiai jelenségek tanulmányozásán túl jól hasznosítható a duplaperfúziós szeletkamra olyan kóros folyamatok vizsgálatára is, mint pl. a hipoxiás modellek tesztelése (Dr. Zelles Tibor, MTA KOKI közlése). A fejlesztés alapján 2008. november 19-én P0800703 alapszámú magyar szabadalmi bejelentést tettem „Dual superfusion slice chamber” címmel, ill. egy U0800212 alapszámú magyar használati mintaoltalmi bejelentést is. A közleményünkben (Hajos et al., 2009) megjelent felismerések fontosságát jelzi az adott szakterületen, hogy a Journal of Neuroscience Methods főszerkesztője (Prof. V. Crunelli) felkért egy, a szövetszelet oxigénellátásával kapcsolatos összefoglaló megírására. Megkerestem Prof. Mody Istvánt, aki az *in vitro* szelettechnika szakavatott ismerője, hogy írjuk meg közösen az összefoglalót, amelyben ő a tápoldat összetételének megváltoztatásának fontosságáról értekezik, én pedig a szövetszelet megfelelő oxigénellátásáról írtam meg a tapasztalataimat, gondolataimat. A kézirat elkészült, és beküldtük a folyóirat szerkesztőségébe (Hajos and Mody, 2009).

Összefoglalva, a támogatás folyósításának 4 éve alatt 3 megjelent közlemény született és 7 további kézirat van befejezés vagy beküldés alatt. Ezen kívül egy szabadalmi és egy használati mintaoltalmi bejelentést is tettem. Mivel a pályázattal kapcsolatos számos eredmény közzé tétele még nem történt meg, de várhatóan 1-1,5 éven belül meg fog valósulni, ezért indokoltnak látom, hogy a jelentésben foglaltak alapján született minősítést egy későbbi, kiegészítő eljárásban lehessen módosítani.

Referencia lista:

- Bragin A, Jando G, Nadasdy Z, Hetke J, Wise K, Buzsáki G. Gamma (40-100 Hz) oscillation in the hippocampus of the behaving rat. *J Neurosci*, 1995; 15: 47-60.
- Csicsvari J, Jamieson B, Wise KD, Buzsáki G. Mechanisms of gamma oscillations in the hippocampus of the behaving rat. *Neuron*, 2003; 37: 311-22.
- Fisahn A, Pike FG, Buhl E, Paulsen O. Cholinergic induction of network oscillations at 40 Hz in the hippocampus in vitro. *Nature*, 1998; 394: 186-9.
- Freund TF, Buzsáki G. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, 1996; 6: 345 - 470.
- Fries P, Nikolic D, Singer W. The gamma cycle. *Trends Neurosci*, 2007; 30: 309-16.
- Glickfeld LL, Atallah BV, Scanziani M. Complementary modulation of somatic inhibition by opioids and cannabinoids. *The Journal of neuroscience*, 2008; 28: 1824-32.
- Hajos N, Ellender TJ, Zemankovics R, Mann EO, Exley R, Cragg SJ, Freund TF, Paulsen O. Maintaining network activity in submerged hippocampal slices: importance of oxygen supply. *Eur J Neurosci*, 2009; 29: 319-27.
- Hajos N, Katona I, Naiem SS, MacKie K, Ledent C, Mody I, Freund TF. Cannabinoids inhibit hippocampal GABAergic transmission and network oscillations. *Eur J Neurosci*, 2000; 12: 3239-49.
- Hajos N, Palhalmi J, Mann EO, Nemeth B, Paulsen O, Freund TF. Spike timing of distinct types of GABAergic interneuron during hippocampal gamma oscillations in vitro. *The Journal of neuroscience*, 2004; 24: 9127-37.
- Hajos N, Papp EC, Acsády L, Levey AI, Freund TF. Distinct interneuron types express m2 muscarinic receptor immunoreactivity on their dendrites or axon terminals in the hippocampus. *Neuroscience*, 1998; 82: 355-76.
- Hajos N., and Mody I. (2009) Establishing a physiological oxygen supply for visualized *in vitro* brain slice recordings. *J Neurosci Meth* (submitted).

- Hefft S, Kraushaar U, Geiger JR, Jonas P. Presynaptic short-term depression is maintained during regulation of transmitter release at a GABAergic synapse in rat hippocampus. *J Physiol*, 2002; 539: 201-8.
- Hoffman AF, Riegel AC, Lupica CR. Functional localization of cannabinoid receptors and endogenous cannabinoid production in distinct neuron populations of the hippocampus. *Eur J Neurosci*, 2003; 18: 524-34.
- Katona I, Urban GM, Wallace M, Ledent C, Jung KM, Piomelli D, Mackie K, Freund TF. Molecular composition of the endocannabinoid system at glutamatergic synapses. *J Neurosci*, 2006; 26: 5628-37.
- Mann EO, Suckling JM, Hajos N, Greenfield SA, Paulsen O. Perisomatic feedback inhibition underlies cholinergically induced fast network oscillations in the rat hippocampus in vitro. *Neuron*, 2005; 45: 105-17.
- Murayama M, Perez-Garci E, Nevian T, Bock T, Senn W, Larkum ME. Dendritic encoding of sensory stimuli controlled by deep cortical interneurons. *Nature*, 2009; 457: 1137-41.
- Neu A, Foldy C, Soltesz I. Postsynaptic origin of CB1-dependent tonic inhibition of GABA release at cholecystinin-positive basket cell to pyramidal cell synapses in the CA1 region of the rat hippocampus. *J Physiol*, 2007; 578: 233-47.
- Oren I, Mann EO, Paulsen O, Hajos N. Synaptic currents in anatomically identified CA3 neurons during hippocampal gamma oscillations in vitro. *The Journal of neuroscience*, 2006; 26: 9923-34.
- Palhalmi J, Paulsen O, Freund TF, Hajos N. Distinct properties of carbachol- and DHPG-induced network oscillations in hippocampal slices. *Neuropharmacology*, 2004; 47: 381-9.
- Robbe D, Montgomery SM, Thome A, Rueda-Orozco PE, McNaughton BL, Buzsaki G. Cannabinoids reveal importance of spike timing coordination in hippocampal function. *Nat Neurosci*, 2006; 9: 1526-33.
- Whittington MA, Traub RD, Jefferys JG. Synchronized oscillations in interneuron networks driven by metabotropic glutamate receptor activation. *Nature*, 1995; 373: 612-5.