## DOKTORI DISSZERTÁCIÓ

# Agykérgi interakciók strukturális alapjai: hálózatszerkezettől a szinapszisokig

Négyessy László

Wigner Fizikai Kutatóközpont, Komputációs Tudományok Osztálya, Elméleti Idegtudomány és Komplex Rendszerek Kutatócsoport

Budapest, 2021

## Tartalomjegyzék

Tur turonijegyzek	2
Rövidítések jegyzéke	8
BEVEZETÉS1	0
A. Agykérgi hálózatok1	0
B. A funkcionális integráció és az aktivitás koordinációjának hálózatszerkezeti alapjai az agykéregben1	3
I. Szenzoros helyettesítésért felelős multimodális kérgi hálózat 1	.6
II. A hálózat aktivitásának koordinációja és szerepe a kognitív kontrollban1	17
C. Köztes szintű hálózati motívumok az agykéregben1	.9
I. Az információáramlás funkcionális jellemzői és strukturális tényezői a szomatoszenzoro kéregben, főemlősökben	os 20
II. Összeköttetési mintázatok idegsejt populációk szintjén	22
D. Az élek szerkezete és szerepe az agykérgi kommunikációban	24
I. A jelterjedés sebességét meghatározó alapvető axonmorfológiai jellemzők2	24
II. A szinapszisok szerepe a neurális kommunikációban2	24
1. A talamokortikális afferentáció 2	24
2. A kortiko-kortikális szinaptikus kommunikáció szerkezeti alapjai 2	26
F A szinantikus jelátvitel szabályozásának új módia a nem-szövetsnecifkus alkalikus	
foszfatázon (TNAP) keresztül	27
foszfatázon (TNAP) keresztül	27 50
<ul> <li>CéLKITŰZÉSEK</li></ul>	27 30
<ul> <li>foszfatázon (TNAP) keresztül</li></ul>	27 30 50
foszfatázon (TNAP) keresztül	27 30 30 30 30
foszfatázon (TNAP) keresztül	27 30 30 30 30 30 30 30
foszfatázon (TNAP) keresztül	27 30 30 30 30 30 30 31 5 31
E. A Szindprikus Jeletitler Szusuly Szusuluk uj moleja u nem szovetspecinkus unankus         foszfatázon (TNAP) keresztül       2         CÉLKITŰZÉSEK.       3         A. A funkcionális integráció és az aktivitás koordinációjának hálózatszerkezeti alapjai az agykéregben       3         I. A szenzoros helyettesítésért felelős hálózat a vizuo-taktilis kéregben       3         II. A hálózati aktivitás koordinációja és szerepe a kognitív kontrollban       3         B. Köztes szintű hálózati motívumok feltérképezése az agykéregben       3         I. Az áreán belüli és áreák közötti interakciók funkcionális anatómiája a szomatoszenzoros kéregben       3         II. Idegsejt populációk összeköttetési mintázatai       3	27 30 30 30 30 30 30 31 51 31
E. A Szinaptikas Jelatitel Szabalyozásának aj modja a nem Szövetispecinkas akankas         foszfatázon (TNAP) keresztül       2         CÉLKITŰZÉSEK       3         A. A funkcionális integráció és az aktivitás koordinációjának hálózatszerkezeti alapjai az agykéregben       3         I. A szenzoros helyettesítésért felelős hálózat a vizuo-taktilis kéregben       3         II. A hálózati aktivitás koordinációja és szerepe a kognitív kontrollban       3         B. Köztes szintű hálózati motívumok feltérképezése az agykéregben       3         I. Az áreán belüli és áreák közötti interakciók funkcionális anatómiája a szomatoszenzoros kéregben       3         II. Idegsejt populációk összeköttetési mintázatai       3         C. Az élek szerkezete és szerepe az agykérgi kommunikációban       3	27 30 30 30 30 30 30 31 31 31 31 31
foszfatázon (TNAP) keresztül       2         CÉLKITŰZÉSEK.       3         A. A funkcionális integráció és az aktivitás koordinációjának hálózatszerkezeti alapjai az agykéregben       3         I. A szenzoros helyettesítésért felelős hálózat a vizuo-taktilis kéregben       3         II. A hálózati aktivitás koordinációja és szerepe a kognitív kontrollban       3         B. Köztes szintű hálózati motívumok feltérképezése az agykéregben       3         I. Az áreán belüli és áreák közötti interakciók funkcionális anatómiája a szomatoszenzoros kéregben       3         II. Idegsejt populációk összeköttetési mintázatai       3         C. Az élek szerkezete és szerepe az agykérgi kommunikációban       3         I. Párhuzamos kommunikációs csatornák alapvető axonmorfológiai jellemzői a szomatoszenzoros kéregben, főemlősökben       3	27 30 30 30 30 30 30 30 30 30 30 30 30 30
foszfatázon (TNAP) keresztül       2         CÉLKITŰZÉSEK.       3         A. A funkcionális integráció és az aktivitás koordinációjának hálózatszerkezeti alapjai az agykéregben       3         I. A szenzoros helyettesítésért felelős hálózat a vizuo-taktilis kéregben       3         II. A hálózati aktivitás koordinációja és szerepe a kognitív kontrollban       3         B. Köztes szintű hálózati motívumok feltérképezése az agykéregben       3         I. Az áreán belüli és áreák közötti interakciók funkcionális anatómiája a szomatoszenzoros kéregben       3         II. Idegsejt populációk összeköttetési mintázatai       3         I. Párhuzamos kommunikációs csatornák alapvető axonmorfológiai jellemzői a szomatoszenzoros kéregben, főemlősökben       3         II. A szinaptikus jelátvitel szerkezeti jellemzői főemlősök agykérgében       3	27 30 30 30 30 31 5 1 31 32 32 33
CÍ A Színápítkus jelatvítel szásányozásának aj mouju a nem szövetépéremkes analmas         foszfatázon (TNAP) keresztül       2         CÉLKITŰZÉSEK       3         A. A funkcionális integráció és az aktivitás koordinációjának hálózatszerkezeti alapjai az agykéregben       3         I. A szenzoros helyettesítésért felelős hálózat a vizuo-taktilis kéregben       3         II. A hálózati aktivitás koordinációja és szerepe a kognitív kontrollban       3         B. Köztes szintű hálózati motívumok feltérképezése az agykéregben       3         I. Az áreán belüli és áreák közötti interakciók funkcionális anatómiája a szomatoszenzoros kéregben       3         II. Idegsejt populációk összeköttetési mintázatai       3         C. Az élek szerkezete és szerepe az agykérgi kommunikációban       3         I. Párhuzamos kommunikációs csatornák alapvető axonmorfológiai jellemzői a szomatoszenzoros kéregben, főemlősökben       3         II. A szinaptikus jelátvitel szerkezeti jellemzői főemlősök agykérgében       3         II. A talamokortikális afferentáció szinaptikus szerkezete a prefrontális kéregben       3	27 30 30 30 30 31 51 32 32 33 33

D. A szinaptikus jelátvitel szabályozásának új módja a nem-szövetspecifkus alkalikus	22
	. 33
A Udlázatalmálati mádszarak	. 35
A. Halozatelmeleti modszerek	. 35
I. Agykergi, es molekularis halozatok, kontroll halozatok	. 35
II. Halozati meroszamok	. 36
1. Halozatot jellemzo mertekek	. 36
	. 36
III. Csoportstruktura megnatarozasa: klaszterezes, klikkek	. 37
IV. Palyakovetes feszítofa segítsegevel	. 38
B. Kiserletes modszerek	. 38
I. Kisérleti alanyok	. 38
II. Neuroanatómiai módszerek	. 39
1. Pályajelölés és 3D szinaptometria	. 39
a. Pályajelölő anyagok és beadások	. 39
b. Hisztológia (FM, EM)	. 40
2. Enzimhisztokémia (TNAP, CO, AchE)	. 42
a. Fénymikroszkópia	. 42
b. Elektronmikroszkópia	. 46
3. Immunhisztokémia	. 46
4. Mielin festés	. 46
5. TNAP-KO egerek vizsgálati módszerei	. 47
6. Adatelemzés	. 48
a. A BDA-jelölés elemzése: retrográd sűrűségtérképek készítése és anterográd axonfoltok azonosítása	. 48
b. Szinaptometria	. 52
c. TNAP lokalizáció meghatározása	. 53
III. Monokuláris depriváció	. 55
IV. Neurofiziológiai mérések	. 56
1. Ingerlés	. 56
2. Elektrofiziológiai térképezés	. 56
3. Az intrinzik optikai jel detekciója	. 57
4. fMRI mérések	. 58
EREDMÉNYEK	. 60
A. A funkcionális integráció és az aktivitás koordinációjának hálózatszerkezeti alapjai az	
agykéregben	. 60

I. A vizuo-taktilis integrációban meghatározó szerepet játszó agykérgi áreák és	
összeköttetések azonosítása hálózatelméleti eszközökkel	60
1. A bimodális hálózat jellemzői 6	60
2. Modalitás és modularitás6	61
a. Diszkrét és átfedő klaszterek, híd áreák6	61
b. Klikkek6	63
3. A keresztmodális integrációban központi szerepet játszó pályák azonosítása6	64
a. Pályakövetés a bimodális hálózatban6	64
b. Az összeköttetések szerepe a keresztmodális integrációban	66
II. Konvergencia-divergencia: az összeköttetések és áreák szerepének meghatározása a kérgi jelfolyam szabályozásában6	68
1. Az összeköttetések konvergenciafoka 6	68
a. A konvergenciafok meghatározása6	68
<ul> <li>b. A konvergencia és divergencia reciprok és szimmetrikus szerveződése a kérgi hálózatban6</li> </ul>	69
c. Az áreák szerepe a kérgi aktivitás koordinációjában	70
d. Kéreg-specifikus hálózati struktúra7	73
2. A kognitív kontrollért felelős agykérgi hálózat topológiája	75
a. A hálózat jellemzése centralitás értékek alapján	75
b. A hálózat jellemzése a csoportstruktúra alapján7	77
<ul> <li>B. Az áreán belüli és áreák közötti interakciók funkcionális anatómiája populáció szinten a szomatoszenzoros kéregben</li> </ul>	80
I. Az összeköttetések szomatotópiája 8	80
1. A kéz reprezentáció szomatotópiája és az área határok azonosítása	80
2. A BDA-jelölés jellemzése 8	82
3. A szomatotópiás és az anatómiai térképek illesztése	86
4. Az área 3b összeköttetéseinek eloszlása 8	88
a. Afferens területek: retrográd sűrűségtérképek áreán belül és áreák között 9	90
b. Efferens területek: anterográd jelölt axonfoltok eloszlása áreán belül és áreák között9	92
c. Az afferens és efferens területek átfedése9	93
5. Az área 1 összeköttetéseinek eloszlása9	94
a. Afferens területek: retrográd sűrűségtérképek áreán belül és áreák között 9	97
b. Efferens területek: anterográd axonfoltok eloszlása áreán belül és áreák között . 9	98
c. Az afferens és efferens területek átfedése9	99
6. Struktúra-funkció megfeleltetés a kéz reprezentáció területén	00

b. Idegsejtek tüzelésének korrelációja103
II. Az összeköttetések oldalirányú eloszlásának hierarchikus szerveződése a 3b- és 1 áreákban
1. A specifikus afferens, és efferens területek meghatározása
a. Afferens területek azonosítása 105
b. Az efferens területek meghatározása 107
2. Az afferens területek oldalirányú kiterjedése áreán belül és áreák között
3. Az efferens területek tangencionális kiterjedése112
4. Az afferens és efferens területek viszonya 113
5. Az afferens és efferens területek viszonya a populációs aktivitáshoz
6. Az összeköttetések oldalirányú kiterjedése által reprezentált bőrfelület mérete 117
7. A projekciós neuronok csoportosulása 118
8. Az afferens és efferens területek anizotrópiája120
C. Agykérgi kommunikációs csatornák azonosítása a szomatoszenzoros kéregben
I. Axonmorfológia: csupasz és velőshüvelyes rostok eloszlása a szürkeállományban 123
II. Preszinaptikus boutonok struktúrája az agykéregben
1. Talamokortikális axonvégződések a PFC-en124
2. Kortiko-kortikális szinaptikus boutonok szerkezete a szomatoszenzoros kéregben 129
1. Nagy, BDA-jelölt kortiko-kortikális boutonok eloszlásának fénymikroszkópos meghatározása a szomatoszenzoros kéregben
2. A BDA-jelölt kis és nagy boutonok ultrastrukturális jellemzői área 3b, és área 1-ben 
3. A BDA-jelölt boutonok osztályozása a felület és térfogat korrelációjával
4. A kis- és nagy BDA-jelölt boutonok szinapszisainak alapvető morfológiai jellemzői 
5. A kis- és nagy boutonok 3D ultrastrukturális jellemzőinek összehasonlítása egy- és sokváltozós módszerekkel
D. Az agykérgi hálózat aktivitásának réteg-specifikus modulációja: a nem-szövet specifikus alkalikus foszfatáz TNAP eloszlása és szubcelluláris lokalizációja
I. A TNAP agykérgi lokalizációja főemlősökben148
1. TNAP enzimhisztokémiai-aktivitás az agyban148
2. Rétegeloszlás az emberi agykéregben152
3. Szubcelluláris lokalizáció158
II. A TNAP szerepe az idegsejt aktivitás szabályozásában
1. A TNAP neurális aktivitásfüggő működése162
2. A TNAP szerepe a mielinizációban és a szinaptogenezisben
a A gorinovalő összabasonlító morfológiája a génmédesített állatokban 164

b. Az agykéreg összehasonlító morfológiája a génmódosítást követően	168
3. A TNAP szerepe a másodlagos jelátvitelben, idegsejtekben	171
a. A TNAP pozíciója a szignáltranszdukciós hálózatban	171
b. TNAP-függő szignáltranszdukciós pályák	176
c. A TNAP szerepe funkcionális csoportok interakciójában	178
AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA	183
A. A funkcionális integráció és az aktivitás koordinációjának hálózatszerkezeti alapjai az agykéregben	183
I. Helyettesítéses plaszticitás a vizuo-taktilis kéregben	183
II. A hálózati jelfolyam koordinációja: a konvergenciafok	183
III. A kognitív kontroll hálózatszerkezeti jellemzői	184
B. Köztes szintű hálózati motívumok a szomatoszenzoros kéregben	184
I. Az áreán belüli és áreák közötti interakciók funkcionális anatómiája	184
II. Összeköttetési mintázatok idegsejt populációk szintjén	185
C. Az élek szerkezete és szerepe az agykérgi kommunikációban	185
I. Axonmorfólógia	185
II. Preszinaptikus boutonok osztályozása	185
D. A szinaptikus jelátvitel réteg-specifikus, populáció szintű szabályozása a nem- szövetspecifkus alkalikus foszfatázon (TNAP) keresztül	186
I. A TNAP regionális, és szubcelluláris lokalizációja	186
II. A TNAP szerepe az idegsejt aktivitás szabályozásában	186
DISZKUSSZIÓ	188
A. A funkcionális integráció és az aktivitás koordinációjának hálózatszerkezeti alapjai az agykéregben	188
I. Módszertani megfontolások	188
II. A szenzoros helyettesítésért felelős pályák a vizuo-taktilis kéregben	189
III. A hálózat aktivitásának koordinációja és szerepe a kognitív kontrollban	191
1. Az agykérgi jelfolyam topológiája	191
2. A kognitív kontroll-hálózat topológiája	193
B. Köztes szintű hálózati motívumok az agykéregben	195
I. Módszertani megfontolások	195
1. Kétirányú BDA-jelölés	195
2. A funkcionális térképek és metszetek illesztésének pontossága	196
3. Axonfoltok azonosítása	196
4. Réteg-lokalizáció	196
5. Statisztikai összehasonlítások	197

## dc\_1938\_21

II. Az áreán belüli és áreák közötti interakciók funkcionális anatómiája a szomatosz kéregben, főemlősökben	enzoros:
1. Áttekintés	198
2. Funkcionális következtetések: integráció a kéz reprezentáció területén 3b és áreákban	1 200
III. Összeköttetési mintázatok idegsejt populációk szintjén	201
1. Áttekintés	201
2. A szomatoszenzoros kérgi összeköttetések laterális eloszlásának hierarchikus jellemzői	202
a. Az összeköttetések laterális eloszlása	202
b. A vetítő neuronok klasztereződése	203
3. Az összeköttetések szerepe az RF kialakításában	205
4. A populációs válasz hálózati alapjai az agykéregben	206
C. Az élek szerkezete és szerepe az agykérgi kommunikáció dinamikájában: axonok é axonvégződések strukturális jellemzői	s 208
I. Módszertani megfontolások	208
II. Agykérgi kommunikációs csatornák a szomatoszenzoros kéregben: axonmorfoló	gia. 209
III. Agykérgi kommunikációs csatornák a szomatoszenzoros kéregben: az axonvégz szerkezete	ődések 210
1. A hatékony és adaptív jelátvitel morfológiai jellemzői: a talamokortikális axonvégződés	210
<ol> <li>Párhuzamos kommunikációs csatornák az agykérgi hálózatban: kortiko-kortik axonvégződések morfológiai osztályozása</li> </ol>	ális 211
<ol> <li>A szomatoszenzoros kérgi összeköttetések szinaptikus szerveződésének funkt jelentősége</li> </ol>	cionális 214
D. A szinaptikus jelátvitel réteg-specifikus, populáció szintű szabályozása a nem- szövetspecifkus alkalikus foszfatázon (TNAP) keresztül	216
I. Módszertani megfontolások	216
1. A TNAP enzimhisztokémiai lokalizációja	216
2. A másodlagos jelátvivő molekuláris hálózat elemzése	216
II. A TNAP szerepe az agykéreg aktivitásának szabályozásában	218
III. A TNAP szerepe az idegsejtek aktivitásának szabályozásában	220
KÖVETKEZTETÉSEK	224
A. Nagyléptékű struktúra: integráció, koordináció, plaszticitás	224
B. Köztes szintű hálózatszerkezet: topográfia, hierarchia, pRF	225
C. Az axonvégződések szerepe az élek dinamikájának szabályozásában	226
D. Az agykérgi jelfolyam rétegspecifikus szabályozása a TNAP-on keresztül	226
Köszönetnyilvánítás	228

Irodalomjegyzék 229
Rövidítések jegyzéke <sup>1</sup>
AchE: acetilkolin-észteráz
AF, AFCS: axon folt, axonfolt csoport
AT: alak tényező
<b>BDA</b> : biotinilált dextrán amin
BOLD: vér oxigénszint függő jel (blood-oxygen-level dependent)
<b>CD</b> : konvergenciafok
CDn: csúcsok konvergenciafoka
CF: BDA-jelölt sejtes elemeket nem tartalmazó területek
CMF: kérgi nagyítási faktor
CNM: Clauset-Newman-Moore klaszterezés
CO: citokróm oxidáz
<b>CW:</b> Community Walktrap klaszterezés
<b>D1-5</b> : 1-5 ujjak
DC: sokszínű klub
df: szabadságfok
ecRF: extraklassziks receptív mező
EM: elektronmikroszkóp
EB: élköztiség
F: vetítő rostokat tartalmazó területek
FB: visszacsatolás (feedback)
FF: felszálló pályák (feedforward)
FM: fénymikroszkóp
fMRI: funkcionális mágneses magrezonancia
IOS: intrinzik optikai jel
K/D: konvergencia/divergencia
L4, L5: 4., 5. réteg
MCL: Markov klaszterezés
NB: csúcsköztiség
<b>NBT-BCIP</b> : nitrokek-tetrazolium-klorid (NBT) es 5-bromid-4-klorid-3-indolil-foszfat,
4-toluidin so (BCIP)
Ud: attedes index
<b>OD</b> : optikal denzitas
P: axonioltok
PCA: lokomponens elemzes
PFC: pretrontalis kereg/kergi
<b>PKF</b> : populacios receptiv mezo
NC. gazuagok kiuoja DE: recentív mező
<b>DDD</b> : pszichológiai refraktor periódus
<b>PSD</b> : posztszinantikus membrán specializáció
<b>1 01</b> . posztszmaptikus memoran specializació

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> A rövidítéseket, ahol lehet, az angol nevezéktan alapján használom. Ha másként nem jeleztem, a rövidítéseket a kifejezések ragozott alakjaira is alkalmaztam.

PV: parvalbumin
R: receptor
RC: rich-club
SI: postcentrális szomatoszenzoros kérgi a régió (3a, 3b, 1 és 2 áreák)
TNAP: nem-szövetspecifikus alkalikus foszfatáz
TNAP-KO: TNAP génre null-mutáns egerek
VISd: dorzális vizuális
VISv: ventrális vizuális
WT: vad, kontroll egér

## BEVEZETÉS

## A. Agykérgi hálózatok

A központi idegrendszer, benne a dolgozat tárgyát képező agykéreg egymással interakcióban álló idegsejkből épül fel, így hálózatként történő vizsgálata önként adja magát. A Vizsgálat célja szerint az agykéreg különböző hálózatok formájában írható le: vannak struktúrán vagy funkción alapulók valamint megjelenítheti egyedi idegsejtek, ill. nagyobb egységek, pl. agykérgi áreák hálózatát (Sporns, 2007). Tanulmányomban az agykéreg strukturális hálózatának elméleten és kísérleten alapuló kutatásával kapcsolatos eredményeimet foglalom össze. Vizsgálataim az agykérgi hálózat szerkezetét meghatározó, az idegsejtek durván 80%-át kitevő piramissejtek távoli axonális összeköttetéseire (áreán belüli és asszociációs) összpontosultak.

Strukturálisnak azokat az agykérgi hálózatokat nevezzük, melyeket az idegsejteket vagy régiókat összekötő axonok ill. ezek kötegeiből kialakult pályák elrendeződése határoz meg (Sporns, 2007). Ezzel szemben az agykéreg működését reprezentáló hálózatokat működő egységeinek (idegsejtek, neuron populációk, régiók) koherens aktivitása vagy a közöttük megállapított kauzális interakciók alapján definiálhatjuk (Sporns, 2007). Az agy strukturális hálózata az a váz, amelyen a funkcionális alhálózatok dinamikusan változó mintázata formálódik (Bressler, 2008). Lényeges és jórészt megválaszolatlan kérdés a hálózati struktúra és dinamika közötti összefüggés (Avena-Koenigsberger és mtsi., 2017). A probléma összetettségét jól érzékelteti, hogy egy komplex hálózatban, mint az agykérgi, a funkcionális kapcsoltság nem kívánja meg a fizikai összeköttetés meglétét (pl. V1 effektív<sup>2</sup> kapcsolata magasabb rendű kérgi struktúrákkal: Bányai és mtsi., 2011). Az agy teljes strukturális hálózatát nevezzük konnektómnak (Sporns, 2010). Strukturális hálózatok feltérképezésének két legelterjedtebb módszere a pályajelölés és a diffúziós tenzor-képalkotás (Sporns, 2007, 2010). Az emberi agy vizsgálatára non invazív jellege miatt csak az utóbbi alkalmas. Azonban az axonális összeköttetések az idegsejtek polarizáltsága és a szinapszisok egyirányú jelátvitele miatt irányítottak és súlyozottak, azaz változó számú, ill. vezetőképességű axonból állnak. Ezért a pályajelöléses módszert nélkülözhetetlenné teszi nagy felbontóképessége, amivel egyedi axon nyúlványok is tanulmányozhatók, valamint az, hogy alkalmas a jelterjedés irányának meghatározására (Lanciego és Wouterlood,

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Effektívnek a dinamikus kauzális modellel (DCM) maghatározott ok-okozati funkcionális kapcsolatot nevezzük (Marreiros és mtsi., 2010).

2020; Saleeba és mtsi., 2019). A pályajelöléses módszerekkel feltérképezett hálózatokat nevezzük anatómiainak (Sporns, 2007, 2010). A pályajelöléshez szükséges speciális jelölőanyagok agyszövetbe injektálása, emiatt csak kísérleti állatokon alkalmazható. Az agykéreg beavatkozást igénylő kísérletes tanulmányozásában ezért fontos modell állatnak számítanak az emberi agyhoz komplexitásban legközelebb álló főemlősök. Főemlősökben, ahol tehát lehetőség van az áreák közötti axonális összeköttetések pályajelöléses vizsgálatára, az agykérgi hálózatról legtöbb információval (az áreák számát, az összeköttetések irányát és súlyát tekintve) rézusz majomból rendelkezünk.

Az agykérgi hálózatok a konnektivitás jellegén kívül csoportosíthatók a kölcsönhatásban álló egységek, strukturális alkotók szerint is. Az anatómiai hálózat legelemibb szintjén idegsejtekből áll, míg a nagyléptékű hálózatot az agykéreg nagyobb területeit lefedő agykérgi áreák egymással létesített kapcsolatai reprezentálják (Sporns, 2007, 2010). A rendelkezésre álló módszerek segítségével az idegsejtek szintjén a lokális un. mikrohálózatokról viszonylag alapos ismereteket szerezhettünk, ami lehetővé tette a kanonikus kérgi hálózati modell megalkotását (Douglas és Martin, 2004; Miller, 2016). Legteljesebb formájában viszont csak az agykéreg legnagyobb strukturális egységei, az áreák szintjén ismerjük a hálózat szerkezetét (Sporns és mtsi., 2004). Az első teljesnek mondható agykérgi hálózatok nagyléptékű anatómiai hálózatok voltak<sup>3</sup>, létrehozásukat a felhalmozódott pályajelöléses munkák eredményei tették lehetővé (Felleman és Van Essen, 1991; Young, 1992). Ezek a tanulmányok tekinthetők a kérgi hálózatkutatás alapjainak, ami az évezredfordulóra erőteljes lendületet vett (a teljesség igénye nélkül: Jouve és mtsi., 1998; Young, 2000), majd újabb lökést kapott (pl. Sporns és Zwi, 2004) az informatikai módszerek fejlődésének köszönhetően ugyancsak felvirágzó természetes és mesterséges hálózatok tudományának eredményei által (Watts és Strogatz, 1998; Barabási és Albert, 1999). E munkák legfontosabb célja a kérgi információfeldolgozás, ill. az agykéreg működésének megértése volt (az ezzel kapcsolatos eredményeket ld. Eredmények A.II. fejezetben), de emellett fény derült speciális kérgi struktúrák addig nem ismert tulajdonságaira, bizonyítva a hálózatkutatás fontosságát a felfedező kutatásokban is (pl. FST felosztása: Hilgetag és mtsi., 2000b) (ezzel kapcsolatos eredményeket ld. Eredmények A.I. fejezetben).

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Kisebb figyelem övezte, de a rézusz majom nagyléptékű anatómiai hálózatának kutatásával szinte egy időben jelentek meg az első nagyléptékű funkcionális hálózatelemzések macskákon végzett sztrichnin diszinhibícióval kiváltott aktivitás-térképek adatai alapján (Kötter és Sommer, 2000).

Az agykérgi szerveződés köztes, mezo szintjén a hálózat idegsejt populációk alkotta modulok összeköttetéseiből épül fel. Az agykéregben a modulok strukturális és/vagy funkcionális egységként azonosíthatók, aminek legismertebb példái a kérgi oszlopok (Szentágothai, 1975; Mountcastle, 1997). A hálózatban erről a szerveződési szintről tudunk a legkevesebbet és annak ellenére, hogy nagy viták övezik e populációs egységek azonosítását és azonosíthatóságát, a rendelkezésre álló funkcionális és morfológiai adatok alapján meglétük széles körben elfogadott (Mountcastle, 1997; Kaas, 2012, Roe, 2019). Ugyancsak erőteljes bizonyíték a moduláris szerkezet mellett az agykéregre jellemző topografikus kapcsolateloszlás, szemben a diffúz, nehezen lokalizálható összeköttetésekkel (Markov és mtsi., 2014b). Idegsejtek funkció szerinti csoportosulásának legismertebb példáit az érző kérgi területeken találjuk, de moduláris aktivitás jellemző a magasabb szintű asszociációs területeken is (pl. Wang és mtsi., 1996). Az összeköttetések moduláris szerkezetét az un. axonvégződési foltok (Lund és mtsi., 1993; hasonlóan a macskafélékben: Buzás és mtsi., 2006) valamint a projekciós neuronok klaszteres eloszlása jellemzi (Markov és mtsi., 2014b). A kérgi oszlopok összeköttetéseiről leginkább az elsődleges, ill. másodlagos látókéreg kutatási eredményeiből tudunk képet alkotni (Roe, 2019; magasabb szinten ld. még Roe és mtsi., 2012; Vanni és mtsi., 2020). Ez a szintű struktúra-funkció megfeleltetés más kérgi területeken alig vagy egyáltalán nem ismert. A köztes szintű hálózat feltérképezésének fontosságát jelzi a The BRAIN Initiative ez irányú határozott célkitűzése (BRAIN 2025 Report). A köztes szintű hálózat feltérképezésének aktualitását és szükségességét ezen túl több szerző is kiemeli (Bassett és Sporns, 2017; Betzel és Bassett, 2017; Roe, 2019). Azon túl, hogy mit tekintünk modulnak egy adott kérgi területen, a köztes szintű hálózat szerkezetének megismerését bonyolítja, hogy a neurális hálózatok összeköttetései nem pontszerűek, hanem valamilyen fokú konvergencia és divergencia jellemzi őket (Angelucci és Bressloff, 2006; Buzás és mtsi., 2006). Ennek mértéke meghatározó a hálózat funkcióját illetően és feltárása az agykéreg egészét tekintve javarészt még előttünk álló feladat. (A témával kapcsolatos eredményeket ld. Eredmények B fejezetben.)

Az anatómiai hálózatot tehát természetes formájában, az idegsejteket és populációit reprezentáló csúcsok valamint a csúcsok viszonyát jellemző axonokat, ill. kötegeik alkotta pályákat reprezentáló élek együttesével határozzuk meg. A csúcsok viszonyának meghatározásában ugyanakkor fontos egy harmadik celluláris kompartment, a szinapszisok szerepe. A szinapszisok meghatározzák az interakciók jellegét, így pl.

serkentő vagy gátló tulajdonságait, erősségét valamint a rövid, és hosszú idejű dinamikai jellemzőit (Somogyi és mtsi., 1997; Zador és Dobrunz, 1997; Feldman, 2009). A szinapszisok strukturális és funkcionális sokszínűsége és változékonysága alapvető szerepet játszik az agykéreg komplex dinamikai tulajdonságainak kialakításában (Froemke, 2015; Duarte és mtsi., 2017; Meunier és mtsi., 2017; Wang, 2020). Ahhoz, hogy az agykérgi hálózat működésében játszott szerepüket jobban megértsük fontos kideríteni vannak-e a szinapszisok működését meghatározó általános szabályszerűségek, ami lehetőséget ad rendszerezésükre (Somogyi és mtsi., 1997; Markram és mtsi., 1998; Tsodyks és mtsi., 1998; Song és mtsi., 2005; Cossel és mtsi., 2015; Wang, 2020). A szinapszisok működése és szerkezete szorosan összefügg (ld. alább Bevezetés D.II. fejezet), így morfológiájuk alapján is elkülöníthetővé válnak különböző funkciójú pályák. Ennek jó példáit találjuk pl. a kisagyban (moha, kúszó és parallel rostok szinapszisai), hippokampuszban (szemcse- és piramissejtek axonvégződései) vagy a talamuszban (szenzoros afferensek az elsőrendű magokban, ill. a kortikotalamikus végződések) (Arbib és mtsi., 1997; Shepherd, 2004).

Az agykéregben az asszociációs, kallózális és kéreg alatti pályákat meghatározott rétegben található, jellegzetes morfológiájú piramissejtek axonjai alkotják (Harris és Shepherd, 2015; Rockland, 2019). Neurokémiai és genetikai kutatási eredmények további idegsejt altípusokat azonosítottak, és jelen értekezés szempontjából különösen érdekes, hogy a piramissejtek összeköttetéseik alapján is tipizálhatók (Molnár és Cheung, 2006; Molyneaux és mtsi., 2007; Hevner, 2007; Lodato és Arlotta, 2015; Zeng és Sanes, 2017; Radnikow és Feldmeyer, 2018; Xu, 2020). A piramissejtek sokfélesége felveti a különböző projekciós pályák azonosíthatóságának kérdését a szinapszisok morfológiája alapján. (A témában elért eredmények az Eredmények C és D fejezetekben kerülnek bemutatásra.)

A továbbiakban sorra veszem a nagyléptékű hálózatszerkezettel, a populáció szintű szerveződés hálózati motívumaival és a szinaptikus szerveződéssel kapcsolatos, dolgozatom szempontjából releváns alapvető ismerteket és kérdéseket.

## B. A funkcionális integráció és az aktivitás koordinációjának hálózatszerkezeti alapjai az agykéregben

Munkám során súlyozatlan, bináris (az összeköttetések megléte, ill. hiánya), irányított hálózatokkal foglalkoztam, így e rövid áttekintés is erre szorítkozik. Az agykéreg nagyléptékű anatómiai hálózatát a csúcsok gyors elérhetősége (az élek számával meghatározott úthosszban mérve) és az inhomogén élsűrűségből adódó klaszteres szerkezet jellemzi, amit kisvilág architektúrának nevezünk (Watts és Strogatz, 1998; Sporns és mtsi., 2004; Bullmore és Sporns, 2012; Sporns, 2013). Emellett, bár egyenletesen lecsengő a fokszám (csúcsok ki- és bemeneteinek száma) eloszlása, az agykéreg a skálamentes hálózatok jellegzetességét is mutatja, amennyiben vannak nagy fokszámú csomópontjai un. "hub"-ok, ami a hálózatot sérülékennyé teszi (Barabási és Albert, 1999; Sporns és mtsi., 2004, 2007; Kaiser és mtsi., 2007; Markov és mtsi., 2014a). Bár az agykérgi hálózatokban mindkét hálózat-topológia elemei kimutathatók, az egymásra épülő neuronhálózati szerveződési szintek hierarchikusan moduláris szerkezete jobban jellemezhető az un. nagyvilág hálózat meghatározással, amit az újabb kutatások által feltárt és az egyszerűsítő kisvilág vagy skálamentes architektúráktól eltérő kapcsolatsúly és élsűrűség eloszlások is alátámasztanak (Hilgetag és Goulas, 2016, 2020).

Rézusz majomban a magas szintű anatómiai hálózatban az áreák száma elérheti a százat, az összeköttetések száma az összes lehetséges kétharmadát is kiteheti, a fokszámok pedig 1-2 tucatra rúgnak azzal, hogy az eloszlás szélein az áreák között többszörös a különbség (Markov és mtsi., 2013a; Markov és mtsi., 2014a). Komplex hálózatokban a kölcsönhatásokat már nem lehet intuitív módon követni. A hálózat szerkezetének és ezzel szorosan összefüggő működésének megértését különböző mérőszámok, indexek segítik (Newman, 2003; Rubinov és Sporns, 2010; Kaiser, 2011; Sporns, 2018). Az indexek vonatkozhatnak élekre vagy csúcsokra, ill. megjeleníthetnek közvetlen szomszédsági viszonyokat vagy pedig globális hálózati tulajdonságokat. A lokális mérőszám legismertebb példája a csúcsok fokszáma, a vele direkt összeköttetésben álló un. szomszédos csúcsok száma. Globális mérőszámoknak azokat tekintjük, amelyek egy csúcs vagy él pozícióját akár a teljes hálózat figyelembe vételével határozzák meg. Elterjedt példája a köztiség index, ami azt méri, hogy egy csúcson (csúcsköztiség, NB) vagy élen (élköztiség, EB) hányszor haladunk át, ha minden lehetséges csúcspárost a legrövidebb utakkal kötünk össze. A legrövidebb út fontos megkötés, hiszen különböző hosszúságú utak azonosítása komputációsan nehéz kombinatorikus feladat a komplex hálózatokban. Funkcionális szempontból pedig, mint pl. az ingerület terjedése, a legrövidebb utak jelentik a leggyorsabb, igaz nem feltétlenül a leghatékonyabb és legvalószínűbb pályákat (Avena-Koenigsberger és mtsi., 2017). A hálózati mérőszámok sokasága ellenére nem rendelkezünk a globális agykérgi jelfolyam megértését segítő hatékony mutatóval.

A látókéreg nagyléptékű anatómiai hálózatának elemzése már a kutatások korai fázisában rámutatott a struktúra-funkció szoros kapcsolatára (Young, 1992; Jouve és mtsi., 1998; Young, 2000). Lényeges felismerés volt, hogy az áreák döntően (~80%) a közvetlen és az eggyel távolabbi térbeli szomszédjukkal létesítnek neurális kapcsolatot (Young, 1992). Megerősítve a látókéregre vonatkozó megfigyeléseket későbbi, teljes agykéregre vonatkozó elemzések kimutatták, hogy a sűrű lokális kapcsolathálózat egyik következménye a térben közeli áreák szoros funkcionális kapcsolata, ami erőteljes klaszteresedést eredményez, egyúttal robusztussá teszi a hálózatot a sérülésekkel szemben (Young, 1992; Kaiser és mtsi., 2007). Ugyanakkor a hálózat gyors átjárhatóságát a kisebb arányban jelenlevő távoli asszociációs kapcsolatok, un. átkötések biztosítják (Sporns és Zwi, 2004, Hilgetag és Goulas, 2020). Felmerült azonban, hogy a távoli összeköttetések kis anatómiai súlya által inkább a specificitás (ellentétben pl. a random hálózatokkal) és a dinamikai diverzitás kialakításában tűnnek fontos tényezőnek (Markov és mtsi., 2013a; Betzel és Bassett, 2018). Újabb kutatások kimutatták, hogy a magas szintű asszociációk kérgi áreák által létesített távoli összeköttetések között több kivételesen nagy anatómiai súllyal rendelkezik és meghatározó szerepet játszik az agykéreg dinamikai jellemzőinek formálásában (Deco és mtsi. 2021). Visszatérve a legrövidebb utak jelentőségére érdemes megemlíteni, hogy az agyban a rövid és hosszú idegi összeköttetések (előbbi javára nézve) aránytalan eloszlásának fontos funkcionális oka a hatékony jelfeldolgozást (az információ gyors, minél kevesebb átkapcsolással történő terjedése) megvalósító optimális axonhossz (ellentétben az axonhossz minimalizálás törvényével) kialakulása a hálózat, nem pedig egyedi pályák szintjén (Kaiser és Hilgetag, 2006). Újabb kutatási eredmények szerint funkcionális hálózatban az egyes áreák közelségi indexszel (closeness, kiszámítása szintén a legrövidebb utak segítségével történik) meghatározható elérhetősége is befolyásolja az aktív agykérgi lókuszok közötti anatómiai összeköttetések úthosszát, ami így egy kis, de nem elhanyagolható arányban (~10%) meghaladja a legrövidebb úthosszat (Csoma és mtsi., 2017). Az agykérgi hálózatkutatás fontos hozománya, hogy a rendelkezésre álló adatmennyiség és minőség valamint az általános hálózatszerveződési elvek megismerése lehetőséget adnak az agyműködés normális és klinikailag fontos kérdéseinek megválaszolására (Bassett és Bullmore, 2009; Liu és mtsi., 2017; Arnatkevičiūtė és mtsi., 2019).

### I. Szenzoros helyettesítésért felelős multimodális kérgi hálózat

Az agykéregben a multimodális integrációért felelős területek főként, mint magas szintű asszociációs kérgi áreák ismertek a parietális és temporális lebenyben (Sepulcre, 2014; Yau és mtsi., 2015). Mára azonban elfogadottá vált, hogy multimodális interakciók már az elsődleges szenzoros kérgi áreák szintjén is megjelennek (Ghazanfar és Schroeder, 2006). Ugyancsak ismert, hogy korai szenzoros deprivációt követőn az érintett primer szenzoros kérgi área részt vesz az épen maradt heteromodális szenzoros információ feldolgozásában az un. helyettesítéses plaszticitásnak köszönhetően (Toldi és mtsi., 1996; Bavelier és Neville, 2002; Toldi, 2008). A szenzoros helyettesítést elsődlegesen a kéreg alatti pályák fejlődés során, a depriváció hatására lezajló átrendeződésének tulajdonították (pl. Négyessy és mtsi., 2000). Későbbi kutatások eredményei ezzel szemben a kifejlett agykérgi hálózat plaszticitásának lényeges szerepét bizonyították (Hamilton és Pascual-Leone, 1998; Sadato és mtsi., 1998, 2002; Bavelier és Neville, 2002). E szerint a depriváció hatására addig működésüket tekintve látens neurális pályák váltak funkcionálissá (Theoret és mtsi., 2004). Ezzel összhangban látásukat korai életkorban elveszített emberekben a primer szomatoszenzoros és látókéreg között funkcionális kapcsoltság mutatható ki, feltehetően az infraparietális régión áthaladó poliszinaptikus pályán keresztül (Wittenberg és mtsi., 2004). A szenzoros helyettesítés funkcionális jelentőségét bizonyította, hogy korai vakokban a látókéreg működésének átmeneti gátlása vagy léziója megakadályozta a Braille olvasást (Cohen és mtsi., 1997; Hamilton és mtsi., 2000). Az azonban továbbra is kérdéses volt, hogy mely pályákon át jut taktilis információ a vizuális kéregbe és mi lehet a deprivált látókéreg újonnan szerzett funkciója. Így azt sem lehetett tudni, hogy milyen az eredeti bemenetétől megfosztott elsődleges látókéregbe jutó információ feldolgozottsági szintje.

Ezekre a kérdésekre szenzomotoros és látókérgi áreákból álló bimodális anatómiai hálózat elemzésével kívántunk választ kapni. Kerestük azt a legrövidebb pályát a primer szomatoszenzoros és látókéreg között, ami a legnagyobb valószínűséggel felelős a szenzoros helyettesítésért. A V1 tapintásban játszott funkciójának alaposabb megértéséhez vizsgáltuk a szorosan együttműködő áreák kompartmentjeit és a két szenzoros modalitás között kapcsolatot létesítő, primer szenzoros áreákat összekötő pályákat. Korábbi tanulmányok kimutatták az occipito-parietális áreák erőteljes klaszteresedését, ezért feltételeztük e régiók elsődleges szerepét a vizuo-taktilis helyettesítésében (Young, 1992; Jouve és mts., 1998).

### II. A hálózat aktivitásának koordinációja és szerepe a kognitív kontrollban

Az uni- és multimodális áreákon keresztül megvalósuló szenzoros integráció az agykéreg működésének fontos, de nem az egyetlen szerepe. A változó körülmények között adott adekvát, célszerű magatartás szabályozása az un. kognitív kontrollhoz köthető. A kognitív kontroll sok funkció összjátékának eredménye, magába foglalja a viselkedés monitorozását, a helytelen hajlamosító (predomináns) magatartás gátlását, a döntéshozatalt, feladat ütemezést, tervezést, figyelmi és érzelmi kontrollt, stb. (Gazzaniga és mtsi., 2009; Banich és Compton, 2011). Lényegi eleme a munkamemória modellben azonosított központi végrehajtó működés (Baddeley, 2000). A végrehajtó működésben a szupramodális prefrontális kérgi (PFC) struktúrák központi szerepet játszanak (Goldman-Rakic, 1996; Fuster, 1997). A PFC a frontális lebeny tekintélyes részét kitevő, nagyobb régiókra és több áreára osztható, funkcionálisan is összetett struktúra (Négyessy, 2003). A PFC egyes áreái sűrűn összekötött hálózatot képeznek és a régió a legmagasabb szintű szenzoros és motoros kérgi áreákkal áll összeköttetésben (Barbas és Pandya, 1989; Barbas, 1995; Pandya és Yeterian, 1998; Kötter é mtsi., 2001; Ramnani és Owen, 2004 Kötter és Stephan, 2003; Kötter és mtsi., 2007; Barbas és mtsi., 2018). A PFC kapcsolatrendszerén át szabályozza, koordinálja az agykérgi információáramlást így valósítva meg a végrehajtó funkciók neurobiológiai alapját (Négyessy, 2003; Barbas és mtsi., 2018).

A hálózati topológia alátámasztja a PFC integratív-koordinatív szerepét a kérgi információáramlásban (Honey és mtsi., 2007). Főemlősök anatómiai hálózatában a prefrontális kérgi área 46 nagy fokszámmal rendelkező, funkcionális klasztereket összekötő csomópont un. konnektor hub (szemben a szintén nagy fokszámú, de csak saját klaszterében kapcsolatokat kialakító provinciális csomópontokkal) (Sporns és mtsi., 2007). A konnektor csomópontok a hatékony információáramlás kulcsszereplői, hiszen a távoli asszociációs axonális összeköttetések, a hálózati átkötések rajtuk keresztül valósulnak meg (ld. még Griffa és Van den Heuvel, 2018). Különböző prefrontális kérgi struktúrák ugyancsak meghatározó résztvevői az un. "gazdagok klubjának" (rich-club, RC) (Sporns és mtsi., 2007; Harriger és mtsi., 2012; Markov és mtsi., 2013b). A RC az agykérgi hálózat magja, amit nagy fokszámmal rendelkező csomópontok, egymással kialakított szoros (a fokszámok alapján számolt valószínűséget meghaladó számú összeköttetés) kapcsolata képez (Sporns és mtsi., 2007; Harriger és mtsi., 2012; Markov és mtsi., 2013b; egy friss összefoglaló: Griffa és Van den Heuvel, 2018). A RC alapvető szerepet játszik a különböző klaszterekben folyó specifikus, de szegregált információfeldolgozás integrációjában és ezáltal különféle agyműködéssel kapcsolatos klinikai kórképekben is (Sporns, 2013; Collin és mtsi., 2014). Újabb kutatások kimutattak a globális kérgi integrációban ugyancsak meghatározó, de a RC-al komplementer alhálózatot az un. "sokszínű klubot" (diverse club, DC), amit konnektor csúcsok változatos összeköttetései alapján lehet definiálni (Bertolero és mtsi., 2017). A "sokszínű klub" pontosabb szerepének meghatározása és a két strukturális mag-hálózat (RC és DC) kölcsönhatásának megértése a jövő feladata.

A kérgi hálózat magja funkcionálisan heterogén szerkezet, struktúráinak sűrű hálózata ellenére különböző magatartási feladatokban az egyes áreák eltérő mértékű aktivitással vesznek részt (Griffa és Van den Heuvel, 2018). A hálózat dinamikájára általában jellemző, hogy az agykérgi összeköttetések csupán a kereteket biztosítják, de az aktivitásmintázatokat nem determinálják (Honey és mtsi., 2007; Hütt és mtsi., 2014; Avena-Koenigsberger és mtsi., 2017). Megfelelő módszerekkel kimutatható, hogy a hálózat-topológia nagyfokú funkcionális rugalmasságot biztosít az alkotóelemek hálózati pozícióját illetően (pl. Hilgetag és mtsi., 2000b; Honey és mtsi., 2007; Mejias és mtsi., 2016; Hilgetag és Goulas, 2020). A csoportstruktúra kimutatására pl. az elterjedt klaszterezési eljárások fix összetételű csoportokat határoznak meg, szemben a valós hálózatokban dinamikusan alakuló csoportösszetétellel. Erre a problémára átfedő klaszterezési eljárások alkalmazása nyújt segítséget (Palla és mtsi., 2005). Továbbá, az átfedés mértékén túl lehetőség van az egyes csúcsok szerepének pontosabb behatárolására a csoportstruktúra kialakításában azok klaszter elköteleződésének és ezzel együtt klasztereket összekötő hídság értékének valamint adott klaszterre vonatkozó centralitás értékének meghatározásával (Nepusz és mtsi., 2008). Kísérletes vizsgálatokból ismert, hogy a kognitív kontroll különböző PFC-áreák, különösen a dorzolaterális PFC és az elülső cinguláris kérgi területek együttműködésén alapul (Constantinidis és Procyk, 2004). A kísérletes eredmények a prefrontális kéreg hierarchikus szerveződésére utalnak (Badre és D'Esposito, 2009; Badre és Nee, 2018; magyar nyelven ld. Négyessy, 2003 átdolgozott verziója), mégis keveset tudunk az egyes PFC-áreák funkcionális specializációjáról. Ennek jobb megértése céljából a PFC egyes területeinek pozícióját többek között az átfedő klaszterszerkezet és a hídság értékek meghatározásával kívántuk meghatározni. A klaszter elköteleződés és hídság érték meghatározása segíti az egyes PFC-áreák koordinatív hálózati szerepének pontosabb megértését.

Az agykérgi hálózat elemzésében az irányítottság viszonylag elhanyagolt tulajdonság annak ellenére, hogy az agykéreg működését felszálló kapcsolatokra és visszacsatolásokra épülő, hierarchikusan szerveződő, párhuzamos pályarendszerek aktivitásának tulajdonítják, melyek magasabb szinteken integrálódnak (Felleman és Van Essen, 1991; Fuster, 2004; Murray, 2014). Ahhoz, hogy az integrációról, ill. koordinatív funkciókról pontosabb képet kapjunk szükség volt olyan mérőszámok kidolgozására, amivel jellemezhető a hálózatban az információáramlás. A kérgi integráció meghatározó módon függ az összeköttetések konvergenciájától és az ezzel komplementer divergenciától (Tononi és mtsi., 1998; Sporns és mtsi., 2004; Friston, 2005; Meyer és Damasio, 2009). Ez könnyen belátható a csúcsok szintjén, melyek komplex hálózatokban számos be- és kimenettel rendelkeznek. A kérgi hálózatot jellemző nagyarányú reciprocitás azonban látszólag az integráció, ill. konvergencia/divergencia ellen ható tényező a ki- és bemenet átfedése miatt. Megbízható mérőszámok kidolgozását tovább nehezíti a nagyléptékű anatómiai hálózat kis mérete: a csúcsok centralitás értéke pl. érzékeny a hálózat változására (Kötter és Stephan, 2003). Éltulajdonságok vizsgálatával ugyanakkor a csúcsok viszonyát jellemző plusz információhoz juthatunk. Az éltulajdonságok, tipikusan az élköztiség az agykérgi hálózat jellegzetességeinek érzékeny mérőszáma (Kaiser és Hilgetag, 2004). E megfontolások alapján az élköztiségre alapozva a globális konvergencia/divergencia meghatározásával kívántuk jellemezni a hálózati szintű irányított jelfolyamot valamint az egyes csúcsok (kérgi áreák) szerepét ennek koordinációjában. Az így kidolgozott mértékek segítségével kívántuk a PFC-áreák koordinatív szerepének további jellemzőit feltárni.

## C. Köztes szintű hálózati motívumok az agykéregben

A motívumok a hálózat meghatározó építőelemeit képező kis, néhány elemből álló alhálózatai, amelyekben az összeköttetések az adott hálózatra jellemző (azaz nagy számban kimutatható) konfigurációt mutatnak (Milo és mtsi., 2002). Köztes szinten, főemlősökben<sup>4</sup> az irányított anatómiai hálózat teljes kéregre kiterjedő tanulmányozására sem alkalmas módszerrel, sem elegendő adattal nem rendelkezünk (Roe, 2019). A köztes szintű hálózat megismerésének egyik útját tehát az agykéreg moduláris szerkezetét (ld.

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> A teljesség kedvéért: rágcsálókban és emberben rendelkezünk a köztes szintű hálózat feltérképezésére alkalmas módszerekkel, de emberben ennek felbontása messze elmarad az axon nyúlvány méretétől és a jelterjedés irányának azonosítása sem lehetséges (pl. *rágcsálók*: Friedmann és mtsi., 2020; Reimann és mtsi., 2019; Oh és mtsi., 2014; *ember*: Irimia és Van Horn, 2016; Taylor és mtsi., 2017).

dc\_1938\_21

kérgi oszlopok) hálózatba szervező domináns összeköttetési mintázatok azonosítása jelenti. A köztes szintű hálózat lényegesen különbözik a magas, área szintű reprezentációtól abban, hogy a rétegek közötti információáramlást leíró kanonikus mikrohálózaton túl tartalmazza az áreán belüli laterális interakciókat is (ld. Hilgetag és mtsi., 2019 és hivatkozásai).

Kísérleteinket a főemlősökben a látókéreggel összehasonlítva kevésbé ismert szomatoszenzoros kéregben végeztük; azon belül is a sulcus centralisban és a tőle kaudálisan elhelyezkedő SI kérgi régióban, ami tanulmányunk célterületein, az área 3b és 1-en kívül magába foglalja a szomatoszenzoros kérgi área 3a és 2-t is (Brodmann nómenklatúra). A főemlősök közül a mókusmajom ideális kísérleti alany, mert fejlett, mégis viszonylag kisméretű és lissencephalikus agykérge könnyen hozzáférhető a vizsgálatok számára (Royo és mtsi., 2021). A mókusmajmokban a szomatoszenzoros kéreg az emberéhez hasonló felépítést mutat beleértve a testfelszín szomatotópiás vetülését (Chen és mtsi. 2001, 2005).

## Az információáramlás funkcionális jellemzői és strukturális tényezői a szomatoszenzoros kéregben, főemlősökben

A szomatoszenzoros kérgi área 3b és área 1 az inger paraméterek feldolgozásával kritikus szerepet játszik a diszkriminatív tapintáson alapuló percepcióban (Murray és mtsi., 2014; Sathian, 2016; Yau és mtsi., 2016; Delhaye és mtsi., 2018; Romo és Rossi-Pool, 2020). Mára elfogadottá vált, hogy az área 3b tekinthető az elsődleges szomatoszenzoros kéregnek, az área 1 pedig ezt követő, magasabb feldolgozási szintet képviselő terület a szomatoszenzoros kérgi hierarchiában (Kaas, 1983, 2004 Iwamura, 1998; Tabot, 2013; Rossi-Pool és mtsi., 2021). A hierarchikus viszony megjelenik az afferensek eloszlásában, a receptív mező (RF) tulajdonságokban és az intrinzik integrációs időállandók hosszában. A perifériás információt szállító talamokortikális bemenet elsősorban área 3b-ben végződik (Shanks és Powell, 1981; Jones, 1983); ugyanakkor área 1 legerősebb bemenetét área 3b-ből kapja (Jones és mtsi., 1978; Vogt és Pandya, 1978; Shanks és mtsi., 1985). Ezzel összhangban área 3b léziója megszünteti área 1 bőr ingerlésre adott válaszát, míg ugyanerre área 1 irtás nem befolyásolja área 3b válaszkészségét (Garraghty és mtsi., 1990). Ugyancsak összhangban a kérgi hierarchiával área 1-ben a RF nagyobb méretű és összetettebb inger tulajdonságokra érzékeny, mint ára 3b-ben (Sathian, 2016; Yau és mtsi., 2016; Delhaye és mtsi., 2018). Továbbá, a RF méretével összefüggésben área 1-ben kisebb a kérgi nagyítási faktor (CMF), mint área dc\_1938\_21

3b-ben (Sur és mtsi., 1980; Friedman és mtsi., 2008). Újabb eredmények szerint a szomatoszenzoros kéreg hierarchikus működése az áreákra jellemző integrációs időállandóval egyértelműen kimutatható (Rossi-Pool és mtsi., 2021). Ennek megfelelően egymáshoz képest área 3b-ben az intrinzik időállandó rövidebb, míg área 1-ben hosszabb.

A disztális ujjbegyek bőre kiugróan magas receptor sűrűséggel rendelkezik, látókérgi analógiával a tapintás "foveális szervének" tekinthetjük, amit a disztális ujjbegy reprezentációt jellemző nagy kérgi nagyítási faktor is igazol (ld. homunculus, és főemlős megfelelői), azaz más testrészek bőrfelületéhez képest nagy kérgi terület dolgozza fel a disztális ujjbegyből érkező információt. A szomtotópiának köszönhetően área 3b-ben és área 1-ben is pontosan lokalizálhatók az ujjak és azok különböző részeinek reprezentációi. Az ujjak kérgi leképeződése, ismételten látókérgi példával, hasonló az okuláris dominancia oszlopok csíkos elrendeződéséhez V1-ben. A két área hasonlóságának további példája, hogy a disztális ujjbegy reprezentációban az orientáció szelektív oszlopok eloszlásmintájához hasonló küllő-szerű (pinwheel) taktilis almodalitás térkép mutatható ki (Sur és mtsi., 1980; Chen és mtsi., 2001, Friedman és mtsi., 2004). A Merkel receptorokból induló 1-es típusú lassan adaptálódó, nyomás érzésért felelős SA, a Meissner receptorokból induló, 1-es típusú gyorsan adaptálódó remegés-ráz(kód)ás (flutter) érzésért felelős RA, valamint a 2-es típusú gyorsan adaptálódó Vater-Paccinitestekből eredő, rezgés, finom, intenzív rángás érzésért felelős PC csatornák együttes reprezentációja képez hiperkolumnát az ujjbegy reprezentáción belül.

Újabb fiziológiai tanulmányok kimutatták, hogy área 3b-ben a jellemzően egyetlen ujjra lokalizált RF-el rendelkező idegsejtek szomszédos ujjak ingerlésekor is aktiválódnak (Iwamura és mtsi., 1983; Chen és mtsi., 2003; Friedman és mtsi., 2008; Reed és mtsi., 2008, 2010a,b; Lipton és mtsi., 2010; Thakur és mtsi., 2012). Azaz az ujjbegyekből eredő taktilis információ integrációja már área 1, ahol a RF tipikusan több ujjra kiterjed, előtt área 3b-ben elkezdődik, és legalábbis részben magyarázhatja área 1-ben az idegsejtek nagyobb RF méretét. Ugyanakkor área 1-ben az idegsejtek RF komplexitásának eredete továbbra sem ismert és az általánosan elterjedt nézet szerint área 3b konvergens bementének tulajdonítható (Mountcastle és Powell, 1959; Hyvarinen és Poranen, 1978; Costanzo és Gardner, 1980; Sur és mtsi., 1980, 1982, 1985; Iwamura és mtsi., 1983a, 1993; Sripati és mtsi., 2006; Hsiao, 2008). A rendelkezésre álló pályajelöléses munkák eredményei összhangban voltak a fiziológiai mérési eredményekkel.

Korai pályajelöléses munkák kiterjedt diffúz és folt-szerűen koncentrált neuronális összekötetési mintázatokat is kimutattak főemlősökben a szomatoszenzoros kéregben (Juliano és mtsi., 1990; Krubitzer és Kaas, 1990a; Burton és Fabri, 1995; Manger és mtsi., 1997; Fang és mtsi., 2002), ami alapjául szolgálhat a 3b és 1 áreákban tapasztalt ujjak közötti integrációnak. Jelzett tanulmányok főleg a nagyobb testrészek reprezentációjának összeköttetéseit, valamint a különböző áreák egymással létesített kapcsolatait tanulmányozták a ma elérhetőknél kevésbé érzékeny jelölőanyagokkal. Burton és Fabri (1995) nagy esetszámon végzett sokszoros pályajelöléses munkájuk eredményének konklúziói között leírta a szomszédos ujjak reprezentációi közötti összeköttetéseket 3b és 1 áreákon belül. A két área összeköttetését illetően szintén megállapították annak topografikus, homotóp (azonos testrész reprezentációjú területek) eloszlását. Az área 3b és 1 áreán belüli intrinzik, és inter-áreális összeköttetéseinek funkcionális jelentőségét Juliano és mtsi. (1990) vizsgálta elektrofiziológia, pályajelölés és metabolikus aktivitáson alapuló 2-dezoxiglükóz (2DG) technikák kombinálásával. A mechanikus ingerlés hatására megnövekedett glükóz felvétel folt-szerű mintázatot mutatott a szomatoszenzoros kéregben és a hasonló funkcionális reprezentációt jelölő foltok átfedtek a pályajelölő anyag folt-szerű eloszlásával. Eredményeik szerint az área  $3b \rightarrow$  área 1 összeköttetés a hasonló választulajdonságú kérgi oszlopok között létesül, míg a reciprok kapcsolat esetében área 3b-ben nem fedett át a kétféle jelölőanyag. A kéz reprezentáció nagy részét kitevő disztális ujjbegy reprezentációk összeköttetésére ezek a munkák nem helyeztek különösebb hangsúlyt, így eloszlásának és funkcionális jelentőségének pontos meghatározása áreán belül és azok között további kísérleteket igényelt. Ugyancsak kérdéses az área 3b-ből eredő afferentáció konvergenciájának szerepe a RF-komplexitásának kialakításában área 1-ben. Végül, a pályajelöléssel kapott eredményekre alapozva célul tűztük ki az áreán belüli és azok közötti összeköttetések szerepének megértését az információáramlásban fMRI és elektrofiziológiai módszerek segítségével.

## II. Összeköttetési mintázatok idegsejt populációk szintjén

Az idegsejt populációk közötti avagy kolumnáris interakciók kutatásának leghatékonyabb és elterjedt módszere az elektrofiziológiai térképezés, optikai képalkotás (jellemzően intrinzik jel, IOS) és a pályajelölés kombinálása (pl. Malach és mtsi., 1993; Kisvárday és mtsi., 2000; Buzás és mtsi., 2006). E módszertan lehetővé teszi a funkcionális szenzoros térképek moduláris egységeinek azonosítását és összeköttetéseik

feltérképezését. Főemlősökben agykérgi modulok kapcsolati elrendeződéséről elsődlegesen vizuális kérgi tanulmányokból tájékozódhatunk (Roe, 2019; Vanni és mtsi., 2020). Populáció szinten kétféle hálózati motívum különül el: 1) áreán belül csillag-szerű mintázatot képezve az egyes oszlopok a környező oszlopok egy csoportjával állnak összeköttetésben, míg 2) az áreák közötti összeköttetések seprű-szerű konvergens ("vessző seprű") vagy divergens ("cirokseprű") mintázatot mutatnak. E mintázatok oka, hogy az área egy lokalizált területe a szomszédos área kérgi oszlopainak egy csoportjából eredő konvergens afferentációt kap ill., vice versa efferensei szétágaznak a szomszédos área moduljai felé. Funkcionálisan a látókéregben a kolumnáris összeköttetések (főleg a piramissejtek axonjai) áreán belül és azok között is erős szelektivitással jellemezhetők (a téma rövid és friss áttekintését adja Roe, 2019; Vanni és mtsi., 2020). A szelektivitás egyik következménye az összeköttetések anizotrop eloszlása, amint azt V1-ben az orientáció szelektív kolumnák esetében kimutatták (Sincich és Blasdel, 2001). Az áreán belüli összeköttetések alapvető szerepe az összekapcsolás (binding), ami lehet azonos tulajdonságot reprezentáló oszlopok közötti kapcsolat (pl. V1) vagy különböző tulajdonságokat reprezentáló, de azonos látótérbeli lokalizációt reprezentáló modulok összekötése (pl. V2). A látókérgi V1 és V2 között modulok szintjén az összeköttetések a funkcionális hasonlóság alapján oszlanak el almodalitás-specifikus pályákat alkotva. Ugyanakkor a konvergencia/divergencia jelzi, hogy az inter-áreális pályák lényeges szerepet játszanak a kérgi hierarchiában egyre absztraktabb funkciók, mint pl. látás esetén színnel, fényességgel, orientációval és mozgással kapcsolatos térlátással, а reprezentációk kialakításában (előbbiekhez ld. még Roe és mtsi., 2012). Az agykéregben az összeköttetések laterális, modulokat összekötő kiterjedése fontos a hierarchikus jelfeldolgozásban és jól azonosítható a RF térbeli szerkezetének kialakításában is. A vizuális kéregben az erősen lokalizált felszálló pályák<sup>5</sup> (FF) felelősek a RF centrumának kialakításáért, míg a diffúzabb visszacsatolások<sup>6</sup> (FB) az áreán belüli összeköttetésekkel együtt hozzák létre a RF perifériás területeit beleértve az un. extraklasszikus (ecRF) részt (Angelucci és Bressloff, 2006; Angelucci és mtsi., 2017). Az agykérgi hálózatkutatás nagy kihívása annak feltárása, hogy a látórendszerben megismert hálózati motívumok jellemezik-e más szenzoros, motoros és kognitív rendszerek kapcsolati struktúráját. E

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> Az agykérgi hálózatban egy alacsonyabb szintű áreából egy magasabb szintű áreába irányuló összeköttetés.

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup> Az agykérgi hálózatban egy magasabb szintű áreából egy alacsonyabb szintű áreába irányuló összeköttetés.

dc\_1938\_21

tekintetben új és reményteli eljárás a populációs választ adó kérgi terület (ld. populációs RF (pRF)), és interakcióik meghatározása (Harvey és Dumoulin, 2011; Wandell és Winawer, 2015). Mindezek alapján tanulmányozni kívántuk a tapintás perceptuális folyamataiban meghatározó szerepet játszó szomatoszenzoros kérgi 3b és 1 áreákban a populációs válasz IOS segítségével történő azonosítását, majd e kérgi terület afferens és efferens pályáinak áreán belüli és azok közötti horizontális eloszlásának feltérképezését pályajelöléses módszerrel. Az így kapott eredmények segítségével kirajzolódó konvergencia/divergencia meghatározásával kívántuk vizsgálni a látókéregre jellemző köztes szintű hálózati motívumok általánosíthatóságát.

### D. Az élek szerkezete és szerepe az agykérgi kommunikációban

I. A jelterjedés sebességét meghatározó alapvető axonmorfológiai jellemzők

Az anatómiai hálózat éleit az axonok és azok végződései, a preszinaptikus kapcsolóstruktúrák alkotják. A jelterjedés sebessége erősen függ az axon átmérőjétől és mielinizáltságától. Az agykéregben vezetési sebességét tekintve nagy különbség van a szürkeállományban futó áreán belüli összeköttetések és a fehérállományban kötegekbe szerveződő asszociációs összeköttetéseket létesítő rostok között (Liewald és mtsi., 2014; Vanni és mtsi., 2020). Nagy általánosságban kijelenthető, hogy a szürkeállományban az aktivitás viszonylag lassan terjed, mert itt az axonok vékonyak és nem mielinizáltak. Ezzel szemben a fehérállományt döntően mielinizált axonok alkotják, melyek átmérője nagy szórással, de átlagában jóval meghaladja a szürkeállományban futó axonokét. Ez a szerkezet nagyon gyors áreák közötti információcserét biztosít, ami az áreák távolságától is függő mértékben sokszorosa lehet az áreán belüli információátadásnak (Vanni és mtsi., 2020). Mindemellett fontos tudni, hogy az axonális tulajdonságok változatossága meglehetősen összetett, sokszintű időbeliséggel jellemezhető agykérgi kommunikációt eredményez (Buzsáki és mtsi., 2013; Innocenti és mtsi., 2014). Tekintettel a kérdés fontosságára, kvalitatív vizsgálatot végeztünk annak eldöntésére, hogy a látókéregben leírt mielinizált és csupasz axonok áreán belüli és azok közötti eloszlására vonatkozó séma érvényes-e a szomatoszenzoros kéregben is.

## II. A szinapszisok szerepe a neurális kommunikációban

#### 1. A talamokortikális afferentáció

A jelátvitel erősségének és hatékonyságának szabályozásában a szinapszisok döntő szerepet játszanak. A szenzoros kéregben jól ismert a középső rétegeket célzó talamokortikális afferensek erőteljes, neurális köröket meghajtó hatása az idegi aktivitást módosító, moduláló funkciójú kortiko-kortikális szinapszisokkal ellentétben (Crick és Koch, 1998; Sherman és Guillery, 1998; Amitai, 2001). A talamo-kortikális afferensek kis számát nemcsak az erős posztszinaptikus aktvitást kiváltó hatás, hanem a megbízható jelátviteli dinamika is kompenzálja, amivel képes a 4. rétegi aktivitás-erősítő lokális neuronális hálózatokat működésbe hozni (Douglas és mtsi., 1995; Amitai, 2001). Ráadásul a talamo-kortikális szinapszisok aktivitását gyors lecsengés jellemzi - egy energiaigényes, gyors újratöltődésen alapuló, állandó "készenléti" állapot -, ami változó környezetben biztosítja az információ hű továbbítását (Castro-Alamancos, 1997; Chung és mtsi., 2002). Működéséhez a talamo-kortikális axonvégződés megfelelő apparátussal rendelkezik: jelentős számú mitokondriumot és szinaptikus vezikulumot tartalmaz valamint több, a neurotranszmitter felszabadulást biztosító aktív zónát létesít (pl. Freund és mtsi., 1985, 1989; Staiger és mtsi., 1996). A preszinaptikus apparátus befogadásának szükségéhez alkalmazkodva a talamo-kortikális axonvegződés nagy méretével is elkülönül az agykérgi neuropilben (Pierce és Lewin, 1994; Zikopoulos és Barbas, 2007).

Az elsődleges érzőkérgi területek működését alapvetően meghatározó talamokortikális afferentáció a talamusz elsőrendű magjaiból ered (Sherman és Guillery 1998; a témában egy újabb összefoglaló: Halassa és Sherman, 2019). Az asszociációs kérgi áreák azonban a magasabb rendű magokból kapják a középső rétegeket célzó talamokortikális bemenetet (Sherman és Guillery, 1998; Halassa és Sherman, 2019). Felmerül a kérdés, hogy a szenzoros kéregben a talamokortikális afferentáció szerkezetéről és funkciójáról szerzett ismereteink érvényesek-e az asszociációs kérgi talamokortikális afferentációra? Erre a kérdésre a PFC tanulmányozásával kívántunk választ kapni a talamokortikális axonvégződések ultrastrukturális jellemzőinek meghatározásával. A PFC meghatározó talamokortikális afferentációja a talamusz mediodorzális magjából ered, amellyel szoros strukturális (Goldman-Rakic és Porrino, 1985; Giguere és Goldman-Rakic, 1988; Schwartz és mtsi., 1991; Siwek és Pandya, 1991) és funkcionális kapcsolatban áll (Alexander és Fuster, 1973; Fuster és Alexander, 1973; Isseroff és mtsi., 1982; Sommer és Wurtz, 2002, 2004a, 2004b; Wurtz és Sommer, 2004). A pálya klinikai szempontból is fontos, ugyanis szkizofréniában a PFC középső rétegeiben csökken a parvalbumin (PV) tartalmú, feltehetően mediodorzális magból eredő talamokortikális axonvégződések száma (Melchitzky és mtsi., 1999; Lewis és mtsi., 2001). Neurokémiai tulajdonságok és axonvégződésük preferenciális rétegeloszlása alapján a talamuszban kétféle kéregbe vetítő relé neuron különböztethető meg: 1) a mátrixot alkotó calbindin tartalmú, diffúzan a felső rétegbe vetülő és 2) a mátrixba beágyazódó mag régiót alkotó, középső rétegekbe nagy topografikus precizitással vetítő PV tartalmú neuronok (Jones és Hendry, 1989; Jones, 1998). Az előzőkben bemutatott elsődleges érzőkérgi területek talamokortikális afferentációját szintén a PV tartalmú relé sejtek létesítik. Mindennek bizonyítása a PFC-ben további vizsgálatokat igényelt.

#### 2. A kortiko-kortikális szinaptikus kommunikáció szerkezeti alapjai

Lehet-e a talamuszhoz hasonlóan a szinapszisokat strukturális jellemzőik alapján osztályozni az agykéregben? Az agykérgi hálózatot rendkívül változatos tulajdonságú (morfológiai, fiziológiai, összeköttetésbeli és molekulárbiológiai) idegsejtek csoportjai alkotják (Lodato és Arlotta, 2015; Zeng és Sanes, 2017). Az idegsejt típusok összeköttetéseiben megfigyelhető szabályszerűségek limitálják a kombinatorikusan lehetséges kapcsolatféleségek számát: a hierarchikusan beágyazott "hálózat-a-hálózatban" jellegű moduláris nagyvilág architektúra meghatározott pre- és posztszinaptikus idegsejt típusok alkotta sztereotip kapcsolási motívumokra épül (pl. Somogyi és mtsi., 1998; Brown és Hestrin, 2009; Harris és Shepherd, 2015; Jiang és mtsi., 2015; Xu, 2020). A hálózati motívumokban az aktivitás terjedését jellegzetes morfológiai és fiziológiai tulajdonságokat mutató szinaptikus kapcsolatok szabályozzák (pl. Lee és Reid, 2011; Qi és mtsi., 2020; Wang, 2020). Továbbra is nyitott kérdés azonban, hogy, hasonlóan a talamuszhoz, az agykérgi szinapszisok, különös tekintettel a preszinaptikus axonvégződésre, besorolhatók-e néhány morfotípusba?

Petrof és Sherman (2013) rágcsálókon végzett kísérleteiben azt találta, hogy a talamuszhoz hasonlóan az agykéregben az áreák közötti kommunikáció is alapvetően kétféle, az 1. és 2. típusba tartozó axonvégződésen keresztül történik. Az 1. típust gyorsan lecsengő dinamika (páros impulzusú szinaptikus depresszió) és nagy méret jellemzi, funkcióját tekintve meghajtó um. detonátor tulajdonságú. A 2. típust ezzel szemben rövid távú szinaptikus érzékenyítés (páros impulzusú szinaptikus facilitáció) és kis méret jellemzi, funkcióját tekintve moduláló hatású. A megfigyeléseket alátámasztja, hogy lokális mikrohálózatokban szintén megkülönböztethetők erős és gyenge szinaptikus interakciók (Song és mtsi., 2005; Cossel és mtsi., 2015). Az áreák közötti reciprok összeköttetésekben rágcsálókon (Covic és Sherman, 2011; Petrof és mtsi., 2015) kívül főemlősökben a látókéregben (Anderson és mtsi., 1998; Anderson és Martin, 2006, 2009) írtak le kis, és nagyméretű axonvégződések által létesített szinapszisokat. Anderson és Martin (2009) arra is rámutattak, hogy a posztszinaptikus denzitás (PSD) mérete és

formája valamint a mitokondrium tartalom az axonvégződés méretével változik. E meglátás fontosságát az adja, hogy a bouton mérete és ultrastrukturális jellemzői összefüggenek a szinapszis fiziológiai tulajdonságaival (Pierce és Lewin, 1994). Főemlősökben a látókérgen kívül az áreák közötti szinaptikus kapcsolatok hasonló morfológiai karakterizálása nem ismert. Hasonlóan, áreán belül több információval rendelkezünk a lokális axon kollaterálisok fiziológiai tulajdonságairól, célsejt, ill. céldendrit szelektivitásáról (Lewis és mtsi., 2002; Somogyi és mtsi., 1998; White, 2007), de az összeköttetések szinaptikus morfológiájára, ultrastrukturális jellemzőire kisebb figyelem összpontosult.

A szinaptizáló boutonok kvantitatív tulajdonságaik alapján történő klasszifikálása nagymértékben hozzájárulna a különböző kortiko-kortikális összeköttetések szerepének megértéséhez (DeFelipe, 2010). Kombinált fiziológiai és morfológiai munkák alapján ismert, hogy a mitokondrium megléte valamint a PSD nagy mérete és komplex, perforált, más néven lebenyes alakja és/vagy sokszoros (több szigetből álló) jellege hatékony szinaptikus jelátvitelt és plaszticitást indikál (Devine és Kittler, 2018; Holderith és mtsi., 2012; Nikonenko és mtsi., 2002; Vos és mtsi., 2010). Bár számos tanulmány leírta a preszinaptikus boutonok eltérő mitokondrium és vezikulum tartalmát valamint a PSD szerkezetét, az axonvégződések kvantitatív morfológiai jellemzők alapján történő egységes osztályozása nem ismert (Eyre és mtsi., 2007; Germuska és mtsi., 2006; Hsu és mtsi., 2017; Rodriguez-Moreno és mtsi., 2018; Wang és Barbas, 2018; Zikopoulos és Barbas, 2007). Ezt a hiányt pótlandó kísérletet tettünk főemlősökben a szomatoszenzoros kérgi összeköttetések szinaptikus kapcsolatot létesítő axonvégződéseinek kvantitatív ultrastrukturális módszerek alkalmazásával történő osztályozására, különös tekintettel azok két, 1. és 2. típusba sorolására.

## E. A szinaptikus jelátvitel szabályozásának új módja a nem-szövetspecifkus alkalikus foszfatázon (TNAP) keresztül

A foszfatázok, így az alkalikus foszfatázok csoportjába tartozó TNAP alapvető szerepet játszanak a sejtek és következésképpen a szövetek és szervek számos funkciójának szabályozásában (Millán, 2015; Mornet, 2015; Cruz és mtsi., 2017; Liedtke és mtsi., 2020). A TNAP több szövetben és szervben (csont- és idegszövet, endotélium, máj, vese) kimutatható, széles spektrumú szubsztrát specificitással bír és sokféle sejtfunkció szabályozásában játszik szerepet. A TNAP különböző szövetekre jellemző izoformái közül emlősökben, az idegrendszerben, beleértve az idegszövetet és az

endotéliumot is a csont típusú fejeződik ki, neuron típusú izoforma nem ismert (Brun-Heath és mtsi., 2011). Ez alól kivétel az egér, ahol a máj típusú izoforma is jelen van (Brun-Heath és mtsi., 2011). A súlyos hipofoszfatázia az élettel összeegyeztethetetlen állapot (Mornet, 2015; Narisawa, 2015; Salles, 2015). A TNAP idegrendszeri funkciójára korai klinikai és hisztológiai munkák eredményei alapján lehetett következtetni. Mind a túlzott (hiperfoszfatázia), mind pedig az alacsony (hipofoszfatázia) TNAP aktivitás az idegrendszer fejlődésének és működésének nem ritkán végzetes zavarát okozza (Taketani, 2015, Hofmann és mtsi., 2015). Így pl. a hipofoszfatázia egyik meghatározó tünete az epilepszia, amit részben a GABAerg rendszer csökkent aktivitásának tulajdonítanak (Waymire és mtsi., 1995). Majmokban enzimhisztokémiai módszerekkel szintén sikerült az idegszövet TNAP aktivitását kimutatni tbk. az agykéregben, ami előrevetítette e struktúrának az említett ritka betegségekben játszott lehetséges szerepét (Robins és mtsi., 1956; Friede, 1966). A súlyos hipofoszfatázia állatmodellje az Akp2 génre null mutáns Akp2<sup>-/-</sup> TNAP-KO egértörzs (Narisawa és mtsi., 1997). A TNAP-KO egerek a születést követő 1-2 hétig életképesek, ami lehetőséget ad az enzim idegrendszer fejlődésében játszott szerepének tanulmányozására (Narisawa és mtsi., 2001; Waymire és mtsi., 1995).

A TNAP ektoenzim, az extracelluláris térben fejti ki feltehetően sokoldalú és alig ismert idegi funkciókat szabályozó hatását (Mornet, 2015; Salles, 2015). A TNAP a B6 vitamin, az un. B6-enzimek ko-faktorának sejtbe jutását segítve biztosítja pl. több neurotranszmitter szintézisét, így a GABA szintézist a glutaminsav-dekarboxiláz (GAD), és a biogén aminok szintézisét az aromás-aminosav-dekarboxiláz (AADC) enzimeken keresztül (Coburn, 2015). A TNAP, mint monofoszfatáz az ATP adenozinig történő átalakításával szabályozza a purinerg jelátvitelt az extracelluláris térben (pl. Zimmermann és Langer, 2015; Millan, 2015; Street és Sowa, 2015; Diaz-Hernandez és mtsi., 2015). Ugyancsak az agykérgi jelátvitelben játszott szerepére utal, hogy a fejlődő idegrendszerben a TNAP szükséges tbk. az axon növekedéshez (Zimmermann és Langer 2015; Diaz-Hernandez és mtsi., 2015), ami felveti szinaptogenetikus funkcióját is. A TNAP agykérgi aktivitás szabályozásában játszott pontos szerepéről mindezzel együtt keveset tudunk. Fontos lenne ismerni aktivitásának pontos célterületeit mind regionális és szubcelluláris szinten valamint, hogy más enzimekhez, mint pl. a citokróm oxidáz (CO), hasonlóan befolyásolja-e működését az idegi aktivitás (Wong-Riley, 1989). Klinikai vonatozásai miatt kiemelten fontos kérdés a TNAP-aktivitás szempontjából kitüntetett területek meghatározása az emberi agyban. Végül pedig figyelemmel az enzim szerteágazó interakcióira, szükséges átlátnunk a globális molekuláris jelátviteli és metabolikus mechanizmusokban játszott szerepét ahhoz, hogy ezek közötti összefüggésekből kóros aktivitásának következményeit pontosabban megértsük.

## CÉLKITŰZÉSEK

 A. A funkcionális integráció és az aktivitás koordinációjának hálózatszerkezeti alapjai az agykéregben

I. A szenzoros helyettesítésért felelős hálózat a vizuo-taktilis kéregben

Hálózatelméleti eszközök segítségével kívántuk meghatározni az elsődleges látókéregbe vetülő taktilis információ eredetét, feldolgozottsági szintjét és ezáltal lehetséges funkcióját rézusz majom bimodális, látó és szenzomotoros áreákat tartalmazó (továbbiakban vizuo-taktilis) agykérgi hálózatában. Először is irodalmi adatok és adatbázisok segítségével létrehoztuk az aktuális tudásunkat reprezentáló bimodális, irányított anatómiai hálózatot. A hálózat csoportszerkezetének elemzésével kívántuk meghatározni a szorosan együttműködő klikkeket formáló, és a bimodális interakciókat lehetővé tevő klasztereket összekötő áreákat. A klikkeket képező áreákat globális centralitás értékük (csúcsköztiség) szerint rangsoroltuk. A lehetséges összeköttetések halmazából a legrövidebb utak meghatározó szerepét feltéve azonosítottuk az SI-ből V1-be irányuló, keresztmodális plaszticitásért felelős pályákat és ezek viszonyát a csoportstruktúrához. A legrövidebb utakat megerősítéses tanulásos algoritmussal generált V1 gyökerű feszítőfa segítségével rangsoroltuk. A helyettesítéses plaszticitásban szerepet játszó összeköttetések halmazát élköztiség értékük valamint ennek segítségével azonosított bemeneti és célterületeinek szenzoros modalitása alapján tovább szűkítettük.

## II. A hálózati aktivitás koordinációja és szerepe a kognitív kontrollban

agykérgi jelfolyam koordinációját élköztiség alapján Az az számolt úi konvergencia/divergencia-mérték bevezetésével kívántuk jellemezni mind az élek, mind pedig a csúcsok szintjén a vizuo-taktilis kérgi hálózatban. Az élek konvergenciafokának segítségével vizsgáltuk a nagyarányú reciprocitás szerepét a hálózati szintű konvergenciában és divergenciában. A csúcsok be- és kimeneteire kiszámolt konvergenciafok alapján jellemeztük az áreák szerepét a jelfolyam koordinációjában. Vizsgáltuk, hogy az áreákra vonatkoztatott konvergenciafok hogyan viszonyul a kérgi hierarchiában alacsony szinten álló információ forrásként, ill. a hierarchia csúcsán álló információ elosztóként azonosítható, jelfolyamot koordináló szerephez. Végül a konvergenciafok segítségével különböző hálózatok összehasonlításával kívántuk meghatározni az agykéregi információáramlást jellemző egyedi hálózati tulajdonságokat. Célzottan tanulmányoztuk a kognitív kontrollért felelős prefrontális kérgi struktúrák koordinatív szerepét a hálózat-szintű információáramlásban rézusz majom teljes agykérgi hálózatában. Két hipotézist teszteltünk: 1) a kognitív kontrollban jól ismert dorzolaterális és elülső cinguláris kérgi területek globális konvergencia állomások, melyek ugyanakkor célzottan továbbítják a hálózatban az információt; 2) a prefrontális kéreg különböző áreái hierarchikusan szervezett, egymást kiegészítő szerepet játszanak az információáramlásban és integrációban. A konvergencia/divergencia meghatározása mellett átfedő klaszterezéssel vizsgáltuk az egyes PFC-áreák, különösen a dorzolaterális és elülső cinguláris kérgi áreák magas szintű koordinatív funkcióját jellemző híd szerepét.

B. Köztes szintű hálózati motívumok feltérképezése az agykéregben

 Az áreán belüli és áreák közötti interakciók funkcionális anatómiája a szomatoszenzoros kéregben

Legfőbb célunk volt meghatározni a tapintás integratív folyamatának első kérgi lépéseit lehetővé tevő oldalirányú neurális hálózatot, különös tekintettel az áreán belüli és azok "csillag" ill. "seprű"-szerű mintázatot mutató kolumnáris-szintű közötti összeköttetésekre. Ehhez a tapintásban kitüntetett szereppel bíró disztális ujjbegy reprezentációk összeköttetéseit extracelluláris elektrofiziológia, IOS és pályajelölés kombinálásával térképeztük fel a szomszédos 3b és 1 áreákban mókusmajmokban. A kitüntetett afferens és efferens területeket a kéz-reprezentáció szomatotópiás térképein kétirányú pályajelöléssel, a jelölés sűrűségeloszlásával határoztuk meg. A reciprocitást az afferens és efferens területek egymásra vetítésével vizsgáltuk. Az így kapott összeköttetési mintázatok összehasonlításával kívántunk választ kapni az área 3b és área 1 eltérő fiziológiai, elsősorban RF tulajdonságainak hálózati alapjairól. Végül, a feltérképezett anatómiai hálózat funkcionális jelentőségét egysejt tüzelés, és fMRI-BOLD jel korrelációs mintázataival azonosított funkcionális hálózatokkal összevetve vizsgáltuk.

## II. Idegsejt populációk összeköttetési mintázatai

Az előző pontban leírt módszerekkel és kísérleti állatokban tanulmányoztuk a köztes szintű, oldalirányú hálózati motívumokat a 3b és 1 áreákban. Főként a következő kérdésekre kerestünk válaszokat: 1) megfigyelhető-e a szomatoszenzoros kéregben a látókéregből ismert áreák közötti összeköttetések laterális kiterjedésében a hierarchikus szerveződést jellemző FF-konvergencia és FB-divergencia, 2) hogy viszonyul ehhez az

dc\_1938\_21

áreán belüli kapcsolateloszlás, 3) hogyan járulnak hozzá e pályák a populációs aktivitáshoz? Vizsgálataink alapjául a disztális ujjbegy reprezentációkban kolumnáris méretű idegsejt populációk jelölése szolgált, míg a populációs választ a pRF-et megjelenítő IOS jellel azonosítottuk. A konvergencia és divergencia viszonyokat a legnagyobb sűrűségű jelöléssel azonosított afferens és efferens területek tangencionális kiterjedésének segítségével az áreán belüli, valamint az azok közötti FF és FB kapcsolatok összehasonlításával határoztuk meg. Az így kapott köztes szintű anatómiai hálózat populációs aktivitásban játszott szerepének megértése céljából az összeköttetések oldalirányú kiterjedését összevetettük az IOS jelével. A hálózatszerkezet feltételezett hierarchikus szerveződését az egyes pályák (intra- és inter-áreális afferens és efferens területek) oldalirányú kiterjedése által reprezentált bőrfelület nagyságának kérgi nagyítási faktor segítségével történő meghatározásával is meg kívántuk erősíteni. Hasonlóan, a hierarchikus szerveződés esetleges szerepét vizsgáltuk a különböző pályák eredőjéül szolgáló projekciós neuronok kevéssé ismert klasztereződésének maghatározásával. Továbbá, a látókéreg áreán belüli összeköttetéseinek specificitását jellemző anizotrópia szomatoszenzoros kérgi jellegén túl kíváncsiak voltunk ennek mértékére az áreák közötti FF és FB kapcsolatokban, mind az anterográd (efferens területek) és retrográd (afferens területek) jel tekintetében.

## C. Az élek szerkezete és szerepe az agykérgi kommunikációban

I. Párhuzamos kommunikációs csatornák alapvető axonmorfológiai jellemzői a szomatoszenzoros kéregben, főemlősökben

Bizonyítani kívántuk, hogy hasonlóan a látókéreghez a szomatoszenzoros kéregben is létezik egy gyors, főként mielinizált axonok alkotta kommunikációs csatorna az áreák között. A pályajelöléssel azonosított mielinizált axonok jelenlétét elektronmikroszkóppal kívántuk kimutatni a szürkeállományban. Ezt követően, ugyancsak a szürkeállományban kvalitatív fénymikroszkópos módszerrel külön jelöltük a vastag, boutonokat nem képező, feltehetően mielinizált rostokat a pályajelöléssel azonosított és feltérképezett axon szegmensek között. A mielinizált rostok alkotta pályák jellemző irányának meghatározásához az egyes egyedek térképeit beadási áreánként (3b és 1 áreák) közös polárkoordináta rendszerben ábrázoltuk és az így kirajzolódó orientációt összevetettük az általános axon-térképekkel, amelyeken külön jelöltük az área határokon belül maradó, ill. azokat átlépő nyúlványokat.

## II. A szinaptikus jelátvitel szerkezeti jellemzői főemlősök agykérgében

#### 1. A talamokortikális afferentáció szinaptikus szerkezete a prefrontális kéregben

Kvantitatív elektronmikroszkópos módszerrel, pályajelölést és PV-immunhiszokémiát alkalmazva kívántuk bizonyítani, hogy a PFC-ben a magasabb rendű magokból eredő talamokortikális axonvégződések hasonló ultrastrukturális tulajdonságokkal és ezáltal jelátviteli dinamikával rendelkeznek, mint az elsődleges talamusz magok szenzoros kérgi végződése. A szinapszisok jelátviteli dinamikájának morfológiai jellegzetességeit az axonvégződések, különböző sejtalkotóik és a posztszinaptikus membrán specializáció méretével és formájával jellemeztük. Az összehasonlításokhoz kontrollként jelöletlen, feltehetően nagyrészt kortiko-kortikális axonvégződések hasonló paramétereit használtuk.

## 2. Kortiko-kortikális szinaptikus boutonok szerkezeti jellemzői a szomatoszenzoros kéregben

A kortiko-kortikális szinaptikus kommunikációt illetően bizonyítani szándékoztunk, hogy a fiziológiai adatokkal egyezően a detonátor és a moduláló hatású szinaptikus axonvégződések mintájára két, morfológiailag is megkülönböztethető axonvégződés Továbbá, meg kívántuk határozni a két csoportot leginkább azonosítható. morfológiai jellemzőket. megkülönböztető Mindenekelőtt pályajelöléssel és fénymikroszkópos térképezéssel kívántuk azonosítani a nagy boutonok meglétét és szerepét az áreán belüli valamint áreák közötti kommunikációban. Ezt követően elektronmikroszkópos szinten a pályajelöléssel azonosított, különböző méretű szomatoszenzoros kérgi szinaptikus boutonok sorozatmetszeteinek rekonstruálásával 3D ultrastrukturális jellemzőket analizáltunk egy, és többváltozós statisztikai módszerekkel. Megközelítésünkkel lehetővé vált előre meghatározott valamint adatvezérelt módon azonosított bouton-csoportok jellemzőinek az összehasonlítása.

## D. A szinaptikus jelátvitel szabályozásának új módja a nem-szövetspecifkus alkalikus foszfatázon (TNAP) keresztül

A TNAP agyban és szinaptikus jelátvitelben játszott szerepét tisztázandó meg kívántuk határozni a regionális és szubcelluláris lokalizációját főemlősökben. Ezekhez a vizsgálatokhoz TNAP-specifikus enzimhisztokémiai módszert alkalmaztunk fény, és elektronmikroszkópos szinteken. A TNAP feltételezett szerepét az idegi aktivitás szabályozásában indirekt módon szenzoros deprivációval kívántunk kideríteni a látórendszerben. Az emberi agyban feltételezett szerepének bizonyítására enzimhisztokémiai módszerrel lokalizáltuk a TNAP aktivitást *post mortem* és műtéti mintákon. Továbbá, összehasonlító kvantitatív elektronmikroszkópos vizsgálatokkal kerestünk választ arra a kérdésre, hogy a hipofoszfatázia állatmodelljében rágcsálókban a TNAP gén inaktivációja befolyásolja-e a mielinizációt és a szinaptogenezist a fejlődés során. Arra a kérdésre pedig, hogy mi a TNAP pontos szerepe a szinaptikus, és idegsejt aktivitás szabályozásában hálózatelemzéssel kerestük a választ idegsejt-specifikus másodlagos jelátvitel molekuláris hálózatában.

## KÍSÉRLETI ALANYOK, ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

## A. Hálózatelméleti módszerek

## I. Agykérgi, és molekuláris hálózatok, kontroll hálózatok

Tanulmányainkban bináris (ahol csak az élek meglétét és hiányát vesszük figyelembe súlyok nélkül) és irányított hálózatokat vizsgáltunk. Kétféle valós hálózatot elemeztünk, az agykéreg magas szintű szerveződését reprezentáló, áreák közötti axonális összeköttetéseken alapuló anatómiai hálózatokat valamint a hippokampális CA1 piramissejt másodlagos jelátviteli rendszerének molekuláris hálózatát. Kontrollként a valós hálózatokon kapott eredményeket azok randomizált hálózatainak megegyező elemzésével kapott eredményekkel hasonlítottuk össze, ahol ez indokolt volt (Eredmények, A.II fejezet). Az elemzés elsősorban az *igraph* (<u>https://igraph.org/</u>) programcsomaggal történt.

Valós hálózatok. Az agykérgi hálózatok rézusz majomban és macskában végzett pályajelöléses munkák eredményeinek összegzésével kerültek összeállításra részben az e célból létrehozott CoCoMac adatbázis segítségével (www.cocomac.org) (Stephan és mtsi., 2001; Kötter, 2004), másrészt az irodalmi adatok felkutatásával a NCBI PubMeden (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/) keresztül. Az agykérgi hálózatokban a hiányzó élek csupán egy része volt bizonyítottan nem létező, a többi esetben meglétükről nem volt adat. Rézusz majom "teljes" agykérgi hálózatának tanulmányozásához a Sporns (2002) által közölt, szabadon hozzáférhető változatot használtuk, ami 71 csúcsból és 746 élből állt. Macska esetében a Hilgetag és mtsi. (2000a) által közölt 55 csúcsból és 892 élből álló agykérgi hálózatot vizsgáltuk. A vizuo-taktilis interakciók elemzéséhez látókérgi, szomatoszenzoros, motoros és prefrontális kérgi áreákat tartalmazó hálózatot (a továbbiakban vizuo-taktilis hálózat) állítottunk össze a Felleman és Van Essen (1991) valamint Hilgetag és mtsi. (2000b) által közölt adatok frissítésével a CoCoMac és NCBI PubMed segítségével. A teljes rézusz majom agykérgének alhálózatát képező vizuotaktilis hálózat 45 csúcsból és az őket összekötő 463 élből állt. Így az általunk elsősorban heteromodális kapcsolatokkal kiegészített vizuo-taktilis hálózat 30 látókérgi és 15 szenzomotoros áreát, valamint 335 látókérgi, 85 szenzomotoros kérgi és 43 heteromodális összeköttetést tartalmazott.

A molekuláris hálózat alapját a Ma'ayan és mtsi, (2005) által közzétett, szintén szabadon hozzáférhető, másodlagos jelátviteli interaktóm képezte. Ebbe a hálózatba integráltuk a TNAP-ot és általunk azonosított interakcióit, amit a ResNet 9 Mammalian

Database (Elsevier Life Science Solutions) adatbázisból a Pathway Studio 9.0 alkalmazással nyertünk ki, majd közölt adatok NCBI PubMed-en végzett felkutatásával igazoltunk.

<u>Kontroll hálózatok: áthuzalozás és randomizálás</u>. Kontroll hálózatokat két különböző módszerrel generáltunk: 1) áthuzalozással és 2) randomizálással. 1) Az újrahuzalozást az élek véletlenszerű mozgatásával végeztük a reciprok élek arányának (82%) megtartásával a rézusz majom vizuotaktilis hálózatában. Az eljárás nem engedélyezte két csúcs között többszörös, azonos irányú él behúzását valamint az erős összefüggőség megsértését. 2) Az összehasonlításhoz használt Erdős-Rényi (ER) véletlen gráfok a valós kérgi hálózattal megegyező számú csomóponttal és éllel rendelkeztek. Az elemzést 100 áthuzalozott, ill. randomizált hálózaton az eredmények kiátlagolásával végeztük.

#### II. Hálózati mérőszámok

#### 1. Hálózatot jellemző mértékek

A hálózatok alapvető jellemzőit az élsűrűség, a reciprocitás, a klaszterezési együttható vagy tranzitivitás, az átlagos úthossz és az átmérő kiszámításával határoztuk meg. A hálózat *élsűrűsége* a kapcsolatok teljes száma osztva az összes lehetséges összeköttetés számával. A *reciprocitást* a kölcsönös kapcsolatok százalékos arányában határoztuk meg. Egy csúcs *klaszterezési együtthatóját* vagy *tranzitivitását* a szomszédos csúcsok közötti kapcsolatok számának a köztük lehetséges összes kapcsolathoz képest vett aránya adja meg; a teljes gráf klaszterezési együtthatója az egyes csúcsok együtthatóinak átlaga (Watts és Strogatz, 1998). A két csúcs közötti *távolság* az őket összekötő legrövidebb út hossza (azaz a legrövidebb utat alkotó élek száma); a legnagyobb távolságot nevezzük a hálózat *átmérőjének*.

#### 2. Hálózati elemek mértékei

A hálózatban egy csúcs *fokszáma* az általa létesített közvetlen kapcsolatok száma, azaz a vele szomszédos csúcsok száma. Irányított hálózatban megkülönböztethetjük a bemenő fokszámot és a kimenő fokszámot. A hálózatban *köztiség centralitás* számítása a legrövidebb útak azonosításán alapul. Először megkeressük az összes legrövidebb utat az a csomópontok összes lehetséges párja között. Minden pár esetében meghatározzuk a köztük lévő legrövidebb utak számát, amelyek egy adott csomóponton (*csúcs köztiség*, NB) vagy egy adott élen (*él köztiség*, EB) áthaladnak, és elosztjuk őket a csúcspárok közötti összes legrövidebb út számával. Végül ezeket az arányokat összegezzük az összes
párra. Azaz, a köztiség centralitás a hálózatban az adott csúcson vagy élen áthaladó legrövidebb utak száma, de ha az s és t csomópontok között k különböző legrövidebb útvonal van, mindegyik csak 1/k súllyal számít a végső értékben. (Az EB nem keverendő az él gyakorisággal (Kaiser és Hilgetag, 2004), ami egyszerűen az adott élen áthaladó legrövidebb utak száma.) Azon legrövidebb utakat, melyek kiindulási és cél csúcsa megegyezik ciklusnak, vagy körnek hívjuk. A kör minden csúcson csak egyszer haladhat át. Amennyiben az élek iránya mentén bejárható kört találunk, a hálózat erősen összefüggő. Gyengén összefüggő a hálózat, ha az irányokat figyelmen kívül hagyva lehet csak kör(öke)t bejárni. *Huroknak* azon köröket hívjuk, melyek mindkét irányban átjárhatók.

A konvergenciafok (CD) az Eredményekben az A.II.1.a fejezetben kerül meghatározásra. Amennyiben egy élen áthaladó legrövidebb utak köröket alkotnak, úgy a forrás ( $In_{i,j}$ ) és cél ( $Out_{i,j}$ ) csúcsok halmaza át fog fedni. Ennek mértékét adja meg az *átfedés index* (O<sub>d</sub>) a két, ki- és bemeneti halmaz metszetében található csúcsok számának a 2 halmazban található csúcsok teljes számához képest vett arányával (Bányai és mtsi., 2011):

$$O_d = \frac{|In_{i,j} \cap Out_{i,j}|}{|In_{i,j} \cup Out_{i,j}|}$$

Megjegyzendő, hogy sem a CD, sem az O<sub>d</sub> nem veszi figyelembe a távolságot, azaz az szóban forgó csomópontokat összekötő legrövidebb utak hosszát. A hídság érték alább, a fuzzy klaszterezésnél kerül meghatározásra.

III. Csoportstruktúra meghatározása: klaszterezés, klikkek

A hálózat kompartmentalizációját klaszterek és klikkek azonosításával tanulmányoztuk. Diszkrét klaszterek azonosítására többféle eljárást alkalmaztunk külön vagy kombinálva. A *Markov-klaszterezés* (MCL) irányított, súlyozott gráfban szimulált sztochasztikus áramláson alapul (Van Dongen, 2008); az eljárás alapötlete a "*communit walktrap*" (CW), miszerint a véletlen bolyongás nagyobb valószínűséggel marad egy sűrűn összekötött komponensben, minthogy átáramlana más komponensekbe (Enright és mtsi., 2002). Az élek súlyát az EB-értékekkel adtuk meg. A klaszterek azonosításához 3,3 inflációs (granularitás) értéket alkalmaztunk. Az ábrázoláshoz az aisee szoftver erővezérelt rendezési algoritmusát használtuk, ami az éleket rugóknak, a csomópontokat

fizikai tömegeknek tekintve határozza meg az erőegyensúlyi konfigurációt. Ugyancsak használtk *Clauset-Newman-Moore* (CNM) hierarchikus agglomerációs algoritmusát, amelyet nagy gráfokra fejlesztettek ki (Clauset és mtsi., 2004). Ez a hierarchikus klaszterező algoritmus a területeket összeköttetésük szerinti, páronkénti hasonlóságuk alapján egymás után nagyobb klaszterekbe egyesíti.

A klaszterek átfedését *fuzzy klaszterezéssel* határoztuk meg, ami lehetővé teszi, hogy a csomópontok (agykérgi területek) több klaszterhez is tartozzanak (Nepusz és mtsi., 2008). A fuzzy klaszterezéssel meghatározható egy csomópont különböző klaszterekhez való "kötődésének" mértéke. Ez a tagsági fok, amit egyetlen valós érték [0, 1] határoz meg minden egyes csúcs és közösség számára. A tagsági értékek mátrixa segítségével definiálható a csúcsokra egy hasonlósági mérték. A hasonlóságok gradiens alapú módszerekkel optimalizálhatók, hogy az összekapcsolt csúcsok hasonlók, a nem összekapcsolt csúcsok pedig különbözők legyenek. A tagsági fok alapján azonosíthatók a kívülálló, magányos csúcsok, a több klaszterhez is jelentős mértékben asszociálható híd csúcsok és a reguláris csúcsok, melyek interakciókat csak a saját csoportjukon belül létesítenek. A *hídsággal* mérhető, hogy egy csúcson milyen mértékben osztoznak a klaszterek. Fuzzy klaszterezéssel a csúcsok domináns klaszterre vonatkoztatott centalitása is kiszámolható.

## IV. Pályakövetés feszítőfa segítségével

Az SI-t a V1-gyel összekötő legrövidebb utak fontossági sorrendjét egy megerősítéses tanulási algoritmussal határoztuk meg (Sutton, 1988; Stuart és Norvig, 2002). Első lépésként kiszámítottuk az áreák hasznossági függvényét, amely azt méri, hogy a hálózaton keresztül mennyire könnyű belőlük V1-be jutni. Ezt követően létrehoztunk egy V1-gyökerű megerősítéses tanulási fát, amely az összes áreát tartalmazta, de az áreáknak csak azt az egy V1 felé irányó összeköttetését, amelyik a legnagyobb hasznossági értékkel rendelkezett. Az így kapott feszítőfa intuitív módon úgy képzelhető el, ami azokat az utakat tartalmazza, amin egy racionális ágens áthaladva maximalizálná a jutalmát (bármelyik áreából V1-be jutva).

## B. Kísérletes módszerek

# I. Kísérleti alanyok

Kísérleteink a megfelelő etikai engedélyek birtokában kerültek elvégzésre, így mind az állatok tartása és a beavatkozások az előírások szerint történtek. Az értekezés

dc\_1938\_21

tárgyát képező eredmények a szükséges engedélyeket megkövetelő szaklapokban kerültek közzétételre. A szomatoszenzoros kérgi összeköttetéseket 6 felnőtt mókusmajomban (Saimiri sciureus) vizsgáltuk, a talamokortikális szinapszisokat 2 felnőtt rézusz majomban (Macaca mulatta), a temporális kérgi szinaptikus boutonokat pedig 13 emberi agyból származó mintán. A TNAP enzimhisztokémiai lokalizációját 10 felnőtt selyemmajomban (Callithrix jacchus), 4 változó postnatális korú fiatal selyemmajomban, 3 felnőtt rézusz majomban és 10 felnőtt humán agyból származó mintán (8 post mortem és 2 műtéti, 1. Táblázat) végeztük el. A TNAP mielinizációban játszott szerepét fénymikroszkópos szinten 16 vad és ugyanennyi génmódosított egéren tanulmányoztuk, melyek életkora a születést követő 1-10 napot ölelt fel (2. Táblázat). Elektronmikroszkópos szinten a mileinizációt és a szinaptogenezist további 4-4 (születést követő 2, 4 és 8 napos korú) vad és génmódosított állaton tanulmányoztuk. A génmódosítás egerekben az Akp2 gén inaktiválásával (TNAP-KO) történt Narisawa és mtsi. (1997) módszerével. Az állatok genotipizálására dedikált primerek szolgáltak (mTNAP-3': 5'-AGT CCG TGG GCA TTG TGA CTA-3', mTNAP-5': 5'-TGC TGC TCC ACT CAC GTC GAT-3'). A kísérleti alanyok vegyesen mindkét nemből származó egyedeket tartalmaztak.

- II. Neuroanatómiai módszerek
- 1. Pályajelölés és 3D szinaptometria
- a. Pályajelölő anyagok és beadások

A 6 mókusmajmot ketamin-hidrokloriddal (10 mg/kg) elaltattuk, intubáltuk és az emiatt fellépő nyáktermelést atropinnal (0,05 mg/kg) csökkentettük. A koponyát sztereotaxis készülékbe rögzítettük, majd ezután az altatást izoflurán (0,9-1,3%) inhalációval tartottuk fent. Az életjelek (vér oxigén-telítettsége (SpO<sub>2</sub>), pulzusszám, EKG, EEG, kilégzésvégi CO<sub>2</sub>, (ET-CO<sub>2</sub>), légzési frekvencia, hőmérséklet) folyamatos megfigyelés alatt álltak. A testhőmérsékletet 37,0-38,5 °C között tartottuk keringő víztakaró segítségével (Gaymar Industries, Orchard Park, NY, USA). Az állatok kiszáradás ellen intravénásan Ringer-laktát (2,5%-os dextróz) oldatot kaptak a műtét alatt (3 ml/kg/h). A kraniotómia (Bregmától antero-posterior irányban 6 mm és mediolaterálisan 15 mm) és a durotómia során a pre- és posztcentrális gyrussal homológ területet (M1, área 3a, 3b, 1 és 2) tártuk fel. A további tájékozódás az agyfelszíni vérerek alapján történt. A beadások pontos helyét elektrofiziológiai térképezéssel és intrinzik optikai jel segítségével határoztuk meg. Kétirányú pályajelöléshez két különböző, 10K (anterorográd jelölési preferencia) és 3K (retrográd jelölési preferencia) molekulasúlyú biotinilált dextrán amin (BDA) 1:1 arányú keverékét foszfát pufferben (PB, 0,01M, pH 7,4) oldottuk (végső cc. 10% (vegyes)) (Rockland és Knutson, 2000, 2001; Li és mtsi., 2003). A BDA keveréket 3 µA árammal, 7 másodperces be/ki ciklussal área 3b-ben a kéreg-felszín alatt 350 µm-re, 20 percen át, míg área 1-ben 350 és 750 µm mélységben, 10-10 percen át adtuk be iontoforézissel, üvegkapillárison keresztül. A BDA beinjektálása után a feltárt területet mesterséges durával lefedtük, a leválasztott koponyacsontot visszacementeztük, végül a bőrt összevarrtuk. Az állatok ébresztése után a posztoperatív fájdalom kezelése helyi érzéstelenítéssel történt. Az állatokon 10-20 nap túlélési idő elteltével (az egyes esetek részletezve: J: 10 nap, M: 14 nap, Mc: 14 nap, Mo: 16 nap, P: 10 nap, R: 14 nap, T: 15 nap, V: 20 nap) mélyaltatásban transzkardiális perfúziót végeztünk. Fiziológiás sóoldattal (0,9 % NaCl desztillált vízben) történő átmosás után 40 percig 4 % paraformaldehidet, 0,1% glutáraldehidet és 0,2% pikrinsavat tartalmazó PB-t (0,1 M, pH 7,3) áramoltattunk az agyban. A vizsgálni kívánt területet ezután kivágtuk a kéregből és 4%-os paraformaldehid oldatban (0,1 M PB, pH 7,3) egy éjszakán át enyhe nyomással kiterítve utófixáltuk.

Egy rézusz majom koponyájáról mélyaltatásban (nátrium-pentobarbital, 40 mg/kg) közvetlenül a műtét előtt MRI felvételeket készítettünk, majd a felvételek alapján meghatározott koordináták szerint a sztereotaxis készülékben rögzített koponyát az injektálás helyén fúróval megnyitottuk. A talamusz mediodorzális magjába egyik oldalon iontoforézissel (5 μA, 7 s be/ki, 20 perc), a másikon nyomással, Hamilton mikroinjekcióval (0,06 μl) BDA-t injektáltunk (10%, PB-ben (0,05 M, pH 7,4), MW 10K, Sigma Chemical Co., St Louis, MO). Két hét túlélést követően az injektált állatot és egy másik, nem injektált rézusz majmot, összesen tehát 2 állatot pentobarbitállal túlaltattunk (150 mg/kg i.v.), majd az agyszövetet a fentiekkel megegyező módon szíven át áramoltatva fixáltuk. Az agyat két órán át utófixáltuk, majd a kívánt területeket további feldolgozásra kimetszettük. A nem műtött állatban parvalbumin (PV) immunjelölést végeztünk (ld. alább) a talamokortikális axonvégződések azonosítása céljából.

## b. Hisztológia (FM, EM)

A mókusmajmokból származó SI-et tartalmazó agykérgi blokkokból tangencionális síkú metszetsorozatokat készítettünk vibratómmal. A blokkok felszínéről a lágyagyhártyát, benne az agyfelszínnel párhuzamosan futó ereket tartalmazó 2x100 μm vastagságú metszetet gyűjtöttünk a funkcionális és anatómiai térképek illesztése céljából.

Ezt követően a BDA-jelölés térképezéséhez a blokkokból 50 µm vastagságú metszetekből 110 µm kihagyásával sorozatokat metszettünk. A BDA-jelölés kimutatására a standard Avidin és Biotinilált peroxidáz komplex (ABC) protokollt (Elite kit, Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA) alkalmaztuk nikkel-intenzifikált diamino-benzidin (NiDAB) (Sigma-Aldrich Kft, Budapest) kromogénnel. A sorozatokat először borohidrid (1% NaBH<sub>4</sub> 0,1 M PB-ben, 30 percig), majd H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1%, 0,1 M PB-ben 30 percig) oldatokkal kezeltük a szabad aldehid csoportok és az endogén peroxidáz aktivitás blokkolása céljából. Ezt követően a krioprotektánssal (30%-os cukor 0,1 M PB-ben, pH 7,4) átitatott metszetek penetrációját fagyasztásos-olvasztásos technikával növeltük, majd a metszeteket egy éjszakán át 4 °C-on ABC-ben inkubáltuk (1:200 PB-ben, 0,1 M, pH 7,4). A NiDAB reakció elvégzése után a metszeteket ozmiummal kezeltük (1% OsO4 és 5% szacharóz 0,1 M PB-ben 40 percig) és felszálló alkohol sorban dehidráltuk, majd propilénoxid kezelés után műgyantába ágyaztuk (Durcupan, Sigma-Aldrich Kft., Budapest). A beágyazás jelentősen csökkenti a metszetek torzulását és ezáltal segíti az egymással, ill. a funkcionális térképekkel történő pontos illesztést (Kisvárday és mtsi., 2000). A műgyantával átitatott metszeteket Hobbytime-al (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) bevont tárgylemezre helyeztük, majd a szintén mártott fedőlemezzel lefedtük.

A két rézusz majom prefrontális kérgéből (PFC) 60 µm vastag koronális síkú metszeteket készítettünk vibratómmal. A BDA beadás kimutatására ugyancsak koronális, 60 µm vastag metszeteket gyűjtöttünk a mediodorzális magból. A prefrontális kéregből és mediodorzális magból készített metszetek kezelése megegyezett a fent leírtakkal. A BDA-val nem injektált, kezeletlen majomból származó metszeteken immunhisztokémiai módszert alkalmaztunk a PV kimutatására (ld. alább).

<u>Elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz</u> a metszetekből a BDA-jelölést tartalmazó mikro-blokkokat vágtunk ki, majd műgyanta blokkokra ragasztottuk és ultramikrotommal (Reichert) 60 nm vastag (ezüstös színű) ultravékony metszeteket készítettünk. A metszeteket Formvar-al hártyázott gridekre gyűjtöttük és ólom-citráttal utófestettük. A szomatoszenzoros kéregből teljes boutonokat tartalmazó sorozatokat készítettünk. A PFC-ből egyesével gyűjtött metszeteken dolgoztunk.

A 3D-ben rekonstruált szinaptikus boutonok összehasonlításához használt humán minta gyógyszer rezisztens halántéklebenyi epilepsziában szenvedő férfi és női betegek műtéti anyagából származott (6 beteg Yakoubi és mtsi., 2019a tanulmányából és 7 beteg a Yakoubi és mtsi., 2019b tanulmányából). A vizsgált minta az epileptogén területtől távoli, alsó temporalis tekervény temporo-laterális és temporo-bazális régióiból lett kimetszve. A szövetblokkokat jéghideg, 4% paraformaldehidet és 2,5% glutáraldehidet tartalmazó, 0,1 M PB-ben (pH7,4) hígított oldatban 24-48 órán át 4°C-on merítetve fixálták. A fixálás után vibratómmal 150-200 µm vastagságú koronális metszeteket készítettek és a fent leírtakhoz hasonlóan OsO<sub>4</sub>-el történő posztfixálást, majd dehidrálást követően tárgylemezen a Durcupan ACM-be ágyazták. Ezután ultravékony sorozatmetszeteket készítettek a célterületből, majd uranil-acetáttal és ólom-citráttal kontrasztozták.

#### 2. Enzimhisztokémia (TNAP, CO, AchE)

#### a. Fénymikroszkópia

*Állatkísérletek.* Az enzimaktivitás kimutatásához az állatokat pentobarbitállal túlaltattuk, majd szíven keresztül 0,1%-os heparint tartalmazó 0,9%-os sóoldatot követően 4%-os paraformaldehiddel (0,1M PB-ben, pH 7,4) perfundáltuk. A koponyából kivéve az agyakat növekvő koncentrációjú (10%, 20% és 30%) cukoroldattal infiltráltuk, majd fagyasztómikrotómmal paraszagittális vagy frontális sorozatmetszeteket (40 µm vagy 30 µm vastagságban) készítettünk. Két selvemmajomban és két rézusz majomban a látókérget lefejtettük és enyhe lapítással kiterítettük, majd 30 µm vastagságú metszeteket készítettünk az agykérgi rétegekkel párhuzamosan. A metszeteken alternálva alkalikus foszfatáz, citokróm-oxidáz (CO), acetilkolinészteráz (AchE) aktivitás kimutatására és krezil-ibolya festésre került sor. A festéseket az área-határok azonosítására használtuk az Ó és Újvilági majmokban a látó, halló és szomatoszenzoros kéregben leírták alapján (Luethke és mtsi., 1989; Krubitzer és Kaas, 1990b; Spatz és mtsi., 1994; Barone és mtsi., 2000; Lewis és Van Essen, 2000b; Huffman és Krubitzer, 2001; Lyon és Kaas, 2001). A TNAP elektronmikroszkópos lokalizációjához egy fiatal selyemmajmot (posztnatális 61. nap) 0,1%-os heparint tartalmazó, 0,9%-os sóoldatot követően 4%-os paraformaldehid és 0,5%-os glutáraldehid keverékével (0,1M PB, pH 7,4) perfundáltunk. Az agy kiválasztott részeiből 50 µm vastagságú metszeteket készítettünk vibratómmal.

<u>Humán minták</u>. A humán minták feldolgozását és egyéb adatait az 1. táblázat foglalja össze. Nyolc mintánk boncolásból származott (39-75 éves férfiak és nők) az Institut Médico-Légal of Lyon (Franciaország), az egykori Országos Pszichiátriai és Neurológiai Intézet Agybankja (Budapest) és a Semmelweis Egyetem, II. Patológiai Tanszék intézetekből a család beleegyezésével vagy kutatási célú felajánlásként. Mintáink neurológiai rendellenességektől (HM1, 20100429/1NI, 20100519MM minták) vagy neuro-patológiai elváltozásoktól mentes (HM2, 9173, 9308, 9978, 20100429/2JP minták) páciensekből származtak. Az agyszövetet 2-4%-os paraformaldehidbe (HM2, 9308, 9978, 9173), 0,1%-os glutáraldehidbe (20100429/1NI, 20100519MM, 20100429/2JP) vagy 10%-os formalinba (HM1) egy éjszakán át merítve rögzítettük. A diagnosztikai célú neuropatológiai vizsgálatok különböző anatómiai területekről párhuzamosan gyűjtött, formalinban fixált és paraffinba ágyazott minták elemzésével történtek. Kisagyi bevérzésen (9978-as eset), a hippokampuszt érintő enyhe hipoxiás/ischaemiás elváltozáson (9308-as eset) és vaszkuláris enkefalopátián (9173-as eset) kívül neurodegeneratív, gyulladásos vagy egyéb morfológiai elváltozás nem volt látható.

Két esetben (246- és 248-s számú, 37 és 40 éves férfi beteg) a minták a jobb féltekei temporális kérget és hippokampuszt érintő reszekcióból származtak. A műtéteket a Pécsi Tudományegyetem Idegsebészeti Klinikáján végezték. A betegektől előzetes írásbeli beleegyezést kaptunk. Minden eljárást a Pécsi Tudományegyetem Regionális Tudományos és Kutatási Etikai Bizottsága hagyott jóvá. A betegek gyógyszerre nem reagáló meziális halántéklebenyi epilepsziában valamint a hippokampuszt érintő szklerózisban szenvedtek, amit nagy felbontású (3T) MRI-vel igazoltak. Az epileptogén gócot videós, elektroenkefalográfiás (skalp-elektródákon keresztül) mérésekkel azonosították a mediobazális temporális területen. A pontos diagnózishoz invazív eljárások alkalmazására nem volt szükség. Közvetlenül az eltávolítás után a mintákat 1,5-2,0 mm vastag koronális szeletekre vágták, és 2%-os paraformaldehidben egy éjszakán át fixálták. A tanulmányunkkal párhuzamosan ugyanazon minták különböző szeletein hisztopatológiai vizsgálatokat végeztek<sup>7</sup>. Az általunk feldolgozott minták az alsó és középső halántéklebenyi tekervényekből származtak. A hisztológiai feldolgozást 60 µm vastag vibratóm, ill. 30-50 µm vastag kriosztát metszeteken végeztűk.

Fénymikroszkópos szinten az <u>endogén TNAP-aktivitás</u> enzimhisztokémiai kimutatásához a metszeteket 100 mM Tris-HCl-oldatban (pH 9,5) inkubáltuk, ami 100 mM NaCl-t, 50 mM MgCl<sub>2</sub>-t, 0,53 mM nitrokék-tetrazolium-kloridot (NBT) és 0,38 mM

<sup>&</sup>lt;sup>7</sup> A 246. esetben a szövettani vizsgálat a CA1 piramissejtek számának jelentős csökkenését és a szomszédos prosubiculum pusztulását mutatta ki. End-folium szklerózis és szemcsesejt pusztulás valamint a parahippokampális gyrus cytoachtektúrájának változása nem volt megfigyelhető. A 248. esetben a halántéklebenyi kéreg szürkeállományának szerkezete többnyire normálisnak tűnt, bár foltokban mérsékelt sejtveszteség volt látható. A szürke és a fehérállomány közötti határ elmosódott, és számos neuron volt megfigyelhető a fehérállomány mélyén. Egy preszinaptikus fehérje marker jelenléte arra utalt, hogy e neuronok szinaptikus összeköttetéseket létesítettek. Sejtpusztulás a hippokampuszban is megfigyelhető volt. A hilusban a neuronok normálisnak tűntek, és nem volt észlelhető gliózis. A szemcsesejtek pusztulására vagy diszperziójára utaló jelek nem voltak.

5-bromid-4-klorid-3-indolil-foszfát, 4-toluidin sót (BCIP) tartalmazott. Szobahőmérsékleten a reakciót 10-30 perc után 1 mM EDTA-t és 10 mM levamisole-t tartalmazó 10 mM Tris oldatban (pH 7,5) leállítottuk. A metszeteket Trisben öblítettük és tárgylemezre húztuk.

A <u>citokróm oxiáz aktivitás</u> kimutatására a metszeteket egy éjszakán át szobahőmérsékleten, sötétben, folyamatos keverés mellett 100 ml PB-re számolva 50 mg diamino-benzidin (DAB), 35 mg citokróm C-t, 20 mg katalázt és 4 g D-(+)-szacharózt tartalmazó oldatban inkubáltuk, majd PB-ben mostuk. Kontroll metszeteken a reakciót nátrium-cianiddal (65 mg/100 ml reakcióoldat) gátoltuk.

Az acetilkolin-észteráz aktivitást Mesulam és Geula (1994) módszerét követve mutattuk ki. Először elkészítettük az inkubációs oldatot, ami 17,186 g maleinsav (dinátrium só), 147 mg nátrium-citrát, 75 mg réz-szulfát és 16,4 mg káliumferricianid feloldásával készült 1000 ml desztillált vízben. A pH8-at 10N nátrium-hidroxiddal állítottuk be. Ezután az oldathoz 53-106 mg acetilkolin-jodidot (MW 289,2) adtunk. Az optimális koncentrációt próbametszeteken állítottuk be. A nem specifikus kolinészterázokat 7,2 mg ethopropazin (MW 348,9) hozzáadásával gátoltuk. A metszeteket 5-10 percig 0,1 M maleát pufferben (pH 8,0) öblítettük, majd 1-5 órán át (a pontos időtartamot kontroll metszeteken állítottuk be) a kolinészteráz oldatban inkubáltuk. Az inkubáció után a metszeteket 0,1 M Tris pufferben (pH 7,6) mostuk. Ezután 10 perces intenzifikáció következett Tris pufferben oldott 0,008%-os (tömeg százalék) kobalt-kloriddal. Mosást követően 15 perces inkibáció következett 100 ml Tris pufferre mért 50 mg DAB-ot és 3,3 ml 0,3%-os (térfogat százalék) hidrogén-peroxidot tartalmazó oldatban. Végül mosást követően a metszeteket tárgylemezre húztuk és lefedtük. További hisztokémiai kontrollként specifikus AChE (BW285CSI) és nem gátlókat  $10^{-4}$ specifikus butirilkolin-észteráz (Iso-OMPA) használtunk Μ koncentrációban.

# dc\_1938\_21

Eset	Kor (év)	Nem	Félteke	Área (blokk sz.)	Post- mortem idő (óra)	Fixatív	Metszet vastagság (μm)	Festés	Halál oka/ patológia
HM1	45	na	J	área 6 (1)	10-14	Formalin 10%	50	AP	na
HM2	Fel- nőtt	na	na	área 46 (1)	10-14	PFA 4%	30	AP Nissl My	na
9173	39	F	В	área 9 (1); área 17 (1)	14	PFA 4%	40	AP Nissl My	Agyi ödéma jobb oldal törzsdúcok. Magas vérnyomásos kisérbetegség általi agyvérzés.
9308	53	N	J,B	área 19 (2); área 24, 32 (2)	8	PFA 4%	60	AP	Bronchopneumo nia/ CA1 enyhe ischaemiás lézió
9978	69	F	В	área 9 (1); área 46 (1)	9	PFA 4%	40	AP Nissl My	Agyvérzés, légzési elégtelenség/ korai szenilis neurofibrilláris degeneráció, Braak l
20100 429/1 NI	63	N	na	área 17, 46, gyrus precentr.	12	PFA 4%, Glu 0.1%	60	AP Nissl NF	Tüdőembólia
20100 519 MM	75	F	J,B	área 17, 24, gyrus precentr. gyrus postcent.	12	PFA 4%, Glu 0.1%	60	AP Nissl NF	Kétoldali tüdőgyulladás
20100 429/2 JP	63	N	na	área 17, 46	12	PFA 4%, Glu 0.1%	60	AP Nissl NF	Hepatorenális elégtelenség
246	40	F	J	Temp. kéreg: alsó és középső gyr. (4)	Post- exeresis idő: 2-6	PFA 2%	40	AP Nissl My	Ld. szöveg
248	37	F	J	Temp. kéreg: alsó és középső gyr. (2)	Post- exeresis idő: 2-6	PFA 2%	40	AP Nissl My NF	Ld. szöveg

1. táblázat. A kísérletben szereplő esetek részletes adatai.

*F:* férfi; N: nő; J: jobb; B: bal; PFA: paraformaldehid; Glu: glutáraldehid; AP: TNAP aktivitás; My: mielin; na: nincs információ

#### b. Elektronmikroszkópia

Elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz a TNAP-aktivitást Mayahara és munkatársai (1967) módosított módszerével mutattuk ki. Szabadon úszó metszeteket 30-60 percig 1,4 ml Tris-HCl puffert (0,2 M, pH 8,5), 2,0 ml nátrium β-glicerin-foszfátot (0,1 M), 2,0 ml magnézium-szulfátot (15 mM) és 4,0 ml telített ólom-citrátot (pH 10,0) tartalmazó oldatban inkubáltuk, aminek a pH-ját 0,1 M NaOH-al 9,4-re állítottuk be. Az ólom-citrát reakció után a metszeteket alaposan mostuk PB-ben, majd a korábban leírtak szerint ozmiummal kezeltük, felszálló alkohol sorban víztelenítettük és tárgylemezen műgyantába ágyaztuk (Durcupan ACM, Fluka, Buchs, Switzerland). A selyemmajomban V1 área középső, infra- és szupragranuláris rétegeiből ultravékony metszeteket készítettünk, végül ezeket ólom citráttal kontrasztoztuk.

#### 3. Immunhisztokémia

Immunhisztokémiai módszerrel a parvalbumint és a nem foszforilált neurofilamentum SMI-32-t mutattuk ki egérben előállított monoklonális elsődleges anititestekkel (PV: 1:10000, Sigma; SMI-32: 1:800, Covance, Rueil Malmaison, France). A PV-jelölést a PFC-ben a nem injektált rézusz majomban végeztük el, az SMI-32 festést a humán mintákon. A másodlagos antitest lóban termeltetett, biotinilált egér elleni IgG volt (1:500, Vector Laboratories). A reakciót szabadon úszó metszeteken végeztük. A borohidrides majd peroxidos kezelést (a fent leírtak szerint) és PB-ben történő mosást követően a nem specifikus kötőhelyeket PB-ben higított, 2% normál ló szérummal blokkoltuk, majd intenzív mosást (PB-ben), és a másodlagos antitestet tartalmazó PB oldatban történő inkubációt követően a kötőhelyeket a fent részletezett ABC-DAB protokoll szerint tettük láthatóvá. A majomból származó metszeteket ezután a korábban leírt módon műgyantába ágyaztuk. A humán mintákból származó metszeteket ugyancsak a már említett módon tárgylemezre húztuk.

#### 4. Mielin festés

Milein festést a Gallyas által módosított protokoll szerint végeztük el (Gallyas, 1979). A metszteket 1 órán át ezüst-nitrát oldatban inkubáltuk, majd 0,5%-os ecetsavoldatban öblítettük, ezután frisen készített hívó oldatban hagytuk, ami után ismét 0,5%-os ecetsavoldatban öblítettük mielőtt 0,2%-os kálium-ferrocianidban differenciáltuk. Ezt a lépést háromszor megismételtük, mielőtt a reakcióterméket tioszulfátban fixáltuk, majd a metszeteket dehidratáltuk és tárgylemezre húztuk.

#### 5. TNAP-KO egerek vizsgálati módszerei

A gerincvelő fénymikroszkópos vizsgálatához 16 vad típusú (WT) és ugyanennyi génmódosított (KO) egeret, amelyek születés utáni kora 1-10 nap volt (P1-P10; 2. táblázat), transzkardiálisan perfundáltaunk 0,1 M foszfátpufferben (PB; pH7,4) oldott 4 % paraformaldehidet tartalmazó fixálószerrel. A nyaki gerincvelői szakaszból 40 μm vastag koronális metszeteket készítettünk fagyasztó mikrotómmal. Szomszédos metszeteken milein és krezil-ibolya festést, valamint TNAP enzimhisztokémiai kimutatást alkalmaztunk.

Az elektronmikroszkópos elemzésekhez 4-4 különböző posztnatális korból származó (P2, P7 és P8) vad és TNAP-KO állatot használtunk, amelyeket transzkardiálisan perfundáltunk 4% paraformaldehidet és 2% glutáraldehidet tartalmazó fixálószerrel (0,1M PB, pH7,4). A nyaki gerincvelőből koronális, míg a parietális kéregből paraszagittális síkban 60 μm-es metszeteket készítettünk vibratómmal. A metszeteket PB-ben mostuk, ozmifikáltuk, felszálló etanol sorban dehidratáltuk, és Durcupan ACM-be (Fluka, Buchs, Svájc) ágyaztuk be tárgylemezen. A vizsgálatokat ultramikrotómmal (Reichert) készített 1 μm vastagságú fél- és ~60 nm vastagságú ultravékony metszeteken végeztük toluidin-kék azúr II-vel (félvékony metszeteken), illetve ólom-citráttal (ultravékony metszeteken) történő festést követően.

**2. táblázat**. A fénymikroszkópos mérésekhez különböző posztnatális életkorban (P1-P10) használt egerek és metszetek (zárójelben) száma. WT: vad típus, KO: TNAP gén (Akp2-/-) inaktiváció

Kor	WT	KO
P1	1 (4)	1 (4)
P2	2 (11)	2 (15)
P4	2 (20)	3 (30)
<b>P6</b>	2 (19)	2 (16)
<b>P7</b>	3 (28)	3 (29)
<b>P8</b>	4 (46)	3 (27)
P10	2 (19)	2 (18)
Össz.	16 (147)	16 (139)

További hagyományos fénymikroszkópos festési eljárásokat, így krezil-ibolya és toluidine-kék azúr II festéseket alkalmaztunk fent leírt hisztológiai módszerekkel kezelt párhuzamos metszeteken az agykérgi áreák és -rétegek valamint a gerincvelő határának azonosítására.

## 6. Adatelemzés

a. A BDA-jelölés elemzése: retrográd sűrűségtérképek készítése és anterográd axonfoltok azonosítása

A BDA-jelölést Neurolucida (MicroBrightField Europe, E.K. Magdeburg, Németország) programmal térképeztük fel egy motorizált tárgyasztallal (MultiControl 2000, Märzhäuser Wetzlar, Wetzlar, Németország) felszerelt Olympus kutató mikroszkóp segítségével. A retrográd jelölt sejttestek eloszlását 10x és 20x, míg az axonális rostokat (anterográd jelölés) 20x és 40x objektív nagyítással rekonstruáltuk. A terminális axon elágazódási foltokat (AF) 10x és 20x nagyítással, egyesével azonosítottuk, és minden egyes metszeten külön-külön körvonalaztuk. Az AF-k méretét a Neurolucida Explorerrel mértük a Feret maximum és Feret minimum függvények segítségével. A Feret-átmérő egy zárt kontúr átmérője, mintha mérőkörzővel mérnénk; szabálytalan alakzatok méretének jellemzésére alkalmas. Az összehasonlító elemzéshez az átlagot az AF legkisebb átmérője által meghatározott Feret-minimum és a legnagyobb átmérő által meghatározott Feret-maximum értékekből számoltuk. A boutonok sűrűségeloszlásának kvantitatív elemzése rendkívül hasznos módszer az agykérgi kapcsolatok funkcionális specificitásának feltárására (Kisvárday és mtsi., 1997; Buzás és mtsi., 2006). A hivatkozott tanulmányokban a jelölt boutonok teljes száma meghatározásra került a lokális, horizontális axonok mentén. Ez a megközelítés azonban nem kivitelezhető nagy területeken végzett mérések esetében, mint amilyeneket mi végeztünk; ezért a boutonok sűrűségét meghatározott régiókban, amelyek vagy potenciális célterületek voltak, vagy nem tartalmaztak BDA-jelölést, mintavételezéssel mértük.

A boutonok sűrűségét a BDA-jelölés szempontjából 3 különböző régióban hasonlítottuk össze: 1) axonfoltokban, 2) távoli összeköttetéseket létesítő axonnyúlványokat tartalmazó területeken és 3) és olyan területeken, ahol sem retrográd sem anterográd jelölést nem találtunk a metszeteken. Az így azonosított területeken három szomszédos 50 µm<sup>2</sup>-es négyszögben (azaz 150 µm<sup>2</sup>-en), 100x-os objektívvel a metszet teljes mélységében megszámoltuk a boutonokat. Az axonfoltokban a sorozatmetszeteken átfedő területen végeztük a mintavételezést az erek, perikaryonok és dendrit nyúlványok elkerülésével. Ezeket a kritériumokat a többi régióban is figyelembe vettük a mintavételezés során. Az SI-ben área 3b beadást követően 18624 boutont számoltunk meg 49 régióban (18 AF, 16 átmenő rost, 15 retrográd jelölés nélkül), míg área 1 beadást követően 3712 boutont számoltunk 37 régióban (19 AF, 14 átmenő rost, 4 retrográd jelölés nélkül). Az alapvonal meghatározásához a mintavételek több mint fele AF-on kívüli területről származott. A boutonok sűrűségét az átlaggal és szórással (SD) hasonlítottuk össze a különböző régiók és áreák között.

A retrográd sűrűségtérképeket Voronoi-tesszellációjával hoztuk létre 2 dimenzióban (Minciacchi és mtsi., 2009) (rövid áttekintésért ld. http://mathworld.wolfram.com/VoronoiDiagram.html vagy

<u>http://en.wikipedia.org/wiki/Voronoi\_diagram</u>), saját Python programozási nyelven írt szoftverrel. Egy ponthalmaz (BDA-jelölt neuronok) esetében ez az eljárás egy területet poligonokra oszt, ahol a poligon határa közelebb van egy "magponthoz" (retrográd jelölt neuron), mint bármely másik pont (BDA-jelölt neuron); az idegsejt-sűrűséget ezután e poligonok területe alapján számoltuk ki. A sorozatmetszetek közötti távolságot figyelmen kívül hagytuk, és a feltérképezett jelölést egyetlen síkba vetítettük. A Voronoi-területek fordítottan arányosak a BDA-jelölt neuronok sűrűségével. A kétdimenziós sűrűség-térképek összehasonlításához a Voronoi-területek logaritmusait átlagoltuk, majd az átlagtól való eltérést a nagy egyedi eltérések kiküszöbölése érdekében szórásegységekben (SD) ábrázoltuk szürkeárnyalattal, vagy színkóddal. A BDA beadási hely körüli 250 µm átmérőjű jelölést kihagytuk az elemzésekből. A BDA-val jelölt struktúrákról Olympus BX51 mikroszkópra szerelt digitális kamerával (Olympus DP50) készítettünk képeket. A kontrasztot és a fényerőt szükség szerint állítottuk, és a képeket Adobe Photoshop (Adobe Systems, San Jose, CA) programban szerkesztettük ábrákká. A képeket a kontraszt és fényerő javításán kívül más módon nem manipuláltuk.

<u>A retrográd jelölés oldalirányú kiterjedése</u>. A Voronoi-sűrűségtérképek foltos, szigetszerű megjelenése nem tette lehetővé az azonos sűrűségű területek egyértelmű lehatárolását és így pozíciójuk és kiterjedésük pontos meghatározását. A retrográd jel kiterjedésének mérésére Gauss-eloszláson alapuló kernel-simítást alkalmaztunk. A Gauss-simítást saját és mások megfigyeléseire alapozva választottuk, miszerint a jelölt neuronális struktúrák sűrűsége beadási hely körül Gauss-szerű eloszlást mutat (Barone és mtsi., 2000; Buzás és mtsi., 2006; Horvát és mtsi., 2016). Hasonlóképpen a távoli interáreális kapcsolatok retrográd jelölése is Gauss-szerű eloszlást eredményez (Barone és mtsi., 2000). Kernel sűrűségelemzéssel lehetővé vált a különböző sűrűségű retrográd jelölést tartalmazó területek körülhatárolása mind az injektál és a szomszédos áreában. A kernel sűrűség-térképeket a következőképpen számoltuk ki. Először a neuronok pozíciójára egy átlagos konvolúciót végeztünk a Gauss-típusú kernellel ( $\sigma = 280 \mu m$ ,

dc\_1938\_21

terület =  $1800 \times 1800 \ \mu m^2$ ), majd ezek után a legnagyobb sűrűségű értékre normalizáltuk az eloszlás értékeit, így lehetővé téve az összehasonlítást az állatok között. A kapott "sűrűségtérkép" relatív, a térbeli sűrűség eloszlást mutatja a terület maximális sűrűségéhez képest.

$$D_{map}(x,y) = \int G(x',y',\sigma) \sum \delta\left(x_{neuron_j} - x - x', y_{neuron_j} - y - y'\right) dx' dy'$$
$$\widehat{D_{map}} = D_{map}(x,y) / \left(\max_{x,y} D_{map}(x,y)\right)$$

ahol D<sub>map</sub>: sűrűségtérkép, G (x, y,  $\sigma$ ): Gauss eloszlás, ahol  $\mu$ : (x, y) és  $\sigma$ ; d (x, y): Diracdelta függvény.  $\widehat{D_{map}}$ : normalizált D<sub>map</sub> függvény. Mivel a normalizált sűrűségértékek széles értéktartományban változtak (csak néhány kis terület volt nagy, 1 közeli sűrűségű, mások nagyon alacsony értékeket mutattak), a sűrűségértékek logaritmusát használtuk a szemléltetés megkönnyítésére. A logaritmált sűrűségértékeket színkóddal jelöltük, a legsűrűbb tartomány [-0,5 - 0] volt, a második legsűrűbb [-1,5 – -0,5] értékek közé estek és így tovább. Nyolc különböző sűrűségértéket számoltunk ki, ezekből a négy legmagasabb értéket használtuk az elemzésben, amiből a legkisebb sűrűség log érték tartomány [-3,5 – -2,5] volt, a legnagyobb sűrűségtartomány 0,78-3,1%-a.

A sűrűségtérképeket a metszetek teljes sorozatának egy síkba vonásával számítottuk ki, figyelmen kívül hagyva a kérgi mélységet. A kernel sűrűségtérképeken a retrográd jelölés kiterjedését az átlagos Feret-átmérővel és területtel mértük MATLAB (Mathworks, Natick, MA) vagy ImageJ (NIH, Bethesda, MD) segítségével.

<u>Az anterográd jelölés laterális kiterjedése</u>. A két különböző áreába történő BDA-beadás után (2x3 eset) az anterográd jelölés kiterjedését az injektált agykérgi terület specifikus célterületeinek számító axonfoltok eloszlásával tanulmányoztuk. A legsűrűbb BDAjelölést, azaz a kitüntetett célterületeket a sorozatban egymást követő metszeteken azonos lokalizációjú, 2D-ban átfedő AF-csoportok (AFCS) azonosításával vizsgáltuk; az anizotrópia méréseket kivéve a "magányos" foltokat kihagytuk az elemzésekből. Mindenek előtt MATLAB programmal meghatároztuk a terminális arborizációk tömegközéppontját. Az anterográd jelölés tangencionális kiterjedésének meghatározásához kiszámítottuk: 1) az AFCS-ok tömegközéppontjának szomszédjaitól vett átlagos távolságát a Neurolucida Explorer legközelebbi szomszéd (nearest dc\_1938\_21

neighbour) funkciójával (csak a legközelebbi szomszéd távolságát veszi figyelembe) és 2) az AFCS-ok tömegközéppontjának átlagos távolságát intra-áreális jelölés esetén a BDA beadás helyétől, illetve inter-áreális jelölés esetén a kernel-térképeken a legnagyobb sűrűségű retrográd jelölés tömegközéppontjától. Ehhez kapcsolódóan fontos figyelembe venni, hogy a legnagyobb kernel-sűrűségű inter-áreális régió tömegközéppontja az injektált ujjbegy reprezentációjával homológ kérgi reprezentációban van (ld. Eredmények B.I. fejezet). Az AFCS-ok és a retrográd jelölődés sűrűségének térbeli kapcsolatát a kernel sűrűségtérképen a különböző sűrűségű (minden értéket figyelembe véve, nemcsak a négy legnagyobbat) régiókban található AFCS-ok számának eloszlásával vizsgáltuk. Ehhez minden egyes területen a különböző kernel-sűrűségű régiókat azzal a legnagyobb értékkel kezdve rangsoroltuk, ahol AFCS-átfedést találtunk. Az átfedés mértékét sűrűségértékek függvényében adtuk meg.

A retrográd jelölt neuronok térbeli csoportosulásának meghatározása. A retrográd jelölt neuronok kompartmentalizációját a sűrűség-függő térbeli klaszterezés módszerével (DBSCAN, https://en.wikipedia.org/wiki/DBSCAN, Ester és mtsi., 1996) vizsgáltuk, ami a közeli pontokat egy csoportba sorolja. Azonban a klaszterek azonosítása helyett a klaszteresedés tendenciáit hasonlítottuk össze a különböző afferens pályák esetén. A DBSCAN előnye, hogy nem igényel feltételezést a klaszterek számával kapcsolatban, nem érzékeny a klaszterek méretére, alakjára vagy lokalizációjára, ami előnyösebbé teszi más rekeszméret (binning) meghatározáson alapuló vagy K-közép (K-means) klaszterezési technikákkal szemben. Konkrétan a klaszterméret-eloszlást és a variabilitást hasonlítottuk össze. A DBSCAN-hez szükséges egy hossz paraméter megadása, ami meghatározza egy pont és egy bizonyos számú (esetünkben 3) legközelebbi szomszéd közötti maximális távolságot. A legrövidebb hosszparamétert 4 µm-re állítottuk, amelyet fokozatosan 8 µm-es ugrásokkal növeltük 700 µm-ig. Azok a pontok kerülnek egy klaszterbe, amik köré a hosszparaméter által megadott átmérőjű köröket rajzolva azok átfednek. Tanulmányunkban a klaszterezést a hosszparaméter függvényében vizsgáltuk, nem pedig egyetlen konkrét értéket kiválasztva, elkerülve ezzel a DBSCAN egyik fő hátrányát. A klasztersűrűség variabilitását két módszerrel vizsgáltuk: 1) a klaszterek számának meghatározásával, figyelmen kívül hagyva azok méretét, és 2) a klaszterméreteloszlások összehasonlításával. A méretet a klaszteren belüli neuronok száma határozta meg. Az eloszlás variabilitását az egyes hosszparaméterekhez tartozó entrópia értékével definiáltuk. Az adott méretű klaszterek számát N<sub>s</sub> írja le, tehát az esélye, hogy egy random választott klaszter s mérettel rendelkezik:  $p(s) = N_s / \sum_k N_k$ . Az entrópiát ezután ebből a valószínűségi eloszlásból számoltuk ki a következőképpen:  $H = -\sum (p_s * log_2(p_s))$ . A különböző BDA-beadásokból (azaz 2x3 eset) mért eloszlások mediánját külön vizsgáltuk az intra-áreális és inter-áreális jelölés esetében.

<u>Anizotrópia számítás.</u> Az anizotrópiát Sincich és Blasdel (2001) nyomán számítottuk ki külön az intra-áreális és inter-áreális jelölésre. Az anizotrópia a neuronok vagy az egyedülálló AF-ok tömegközéppontjai és a beadási hely (intra-areális jelölés) vagy a homotóp áreában a kernel sűrűségtérképen legsűrűbben jelölt terület tömegközéppontja (inter-areális jelölés) közti sugár értékek átlag vektora. Az átlag vektor hossza az eloszlás ellipticitását határozza meg, míg a szöge a kapcsolateloszlás orientációjának fő irányát mutatja. Az anizotrópia értéke (rn) 0, ha a jelölt struktúrák szimmetrikusan, kör alakban helyezkednek el a központ körül és 1, ha egy vonal mentén oszlanak el. Az anizotrópia vektor szögét a 3b és az 1 áreák közötti határvonalhoz viszonyítva adtuk meg, mert ez az ujjak reprezentációjára nagyjából merőlegesen fut. A méréseket Neurolucida Explorer, ImageJ és/vagy MATLAB segítségével végeztük.

<u>Boutonok nélküli, vastag axonok térképezése.</u> A BDA-jelölt, horizontálisan futó vastag axonális rostokat Neurolucidával térképeztük fel, majd Neurolucida Explorerrel polárkoordináta rendszerben ábrázoltuk az eloszlásukat. Az egyes esetek koordináta rendszereit a beadási áreák szerint szétválasztva (3-3 eset), a beadási helyeket, mint középpontokat használva egymásra illesztettük. Ez a módszer lehetővé tette a jelölt, átfedő axonok orientációjának azonosítását. A térképezés befejezése után kiválasztott területek kimetszését követően elektronmikroszkópos módszerrel megvizsgáltuk az axonok mielinizáltságát.

#### b. Szinaptometria

<u>Talamokortikális szinapszisok morfometriája a PFC-ben.</u> Serkentő jellegű, Gray I. tipusú BDA-jelölt vagy PV-immunopozitív axonvégződések szinaptikus kapcsolatairól 20K nagyítással elektronmikroszkópos fényképeket készítettünk. A dendrittüskéket és dendriteket ultrastrukturális kritériumok alapján azonosítottuk (Peters és mtsi., 1991). A dendrittüskéket méretük (0,3-1,5 μm átmérő), a tüskeapparátus jelenléte, valamint a mitokondriumok és mikrotubulusok hiánya segítségével ismerhető fel. A dendriteket nagyobb méretük (0,5 μm vagy nagyobb átmérő), valamint mikrotubulusok és mitokondriumok megléte alapján azonosítottuk. A bouton és dendrittüske méretet valamint a posztszinaptikus sűrűség (PSD) hosszát egy Neurolucida rendszerhez (MicroBright-Field, Colchester, VT) csatlakoztatott digitalizáló tábla segítségével mértük. A boutonok és a posztszinaptikus dendritek méretének meghatározásához a Feret maximum és minimum értékek átlagát használtuk. A boutonok területét a mitokondriumok által elfoglalt területtel csökkentve is összehasonlítottuk.

A szinaptikus boutonok térképezése és 3D rekonstrukciója a szomatoszenzoros és temporális kéregben. A pályajelölésre használt 6 selyemmajom beágyazott metszetein az EM feldolgozás céljából történő disszekciót megelőzően az összes nagyméretű BDAjelölt bouton eloszlását feltérképeztük fénymikroszkóppal a Neurolucida program segítségével, hogy meghatároztuk az áreán belüli és az inter-áreális eloszlásokat. Az injektált áreában csak a távoli intrinzik boutonokat térképeztük fel, mivel a sűrű NiDABcsapadék megakadályozta a térképezést a beadás körüli ~ 500 µm átmérőjű területen. A térképezéshez csak az 1 µm-re (ami az FM felbontási határa körül van) beállított kurzor méreténél nagyobb BDA-jelölt boutonokat választottuk ki 40x és 100x objektív nagyítást alkalmazva. Bár az agykérgi axonvégződések általában kicsik, 1 µm-nek megfelelő vagy annál kisebb átmérőjűek, a nagy végződések átmérője meghaladhatja az 1 µm-t (ld. saját eredmények és Anderson és mtsi., 1998; Anderson és Martin, 2006, 2009; Covic és Sherman, 2011; Innocenti és Caminiti, 2017). Az 1 µm-es mérethatár megválasztása megkönnyítette a nagy boutonok kiválasztását és fénymikroszkópos feltérképezését, és segített csökkenteni a számos 2. típusú bouton torzító hatását az területi eloszlás eredményére.

A humán temporális kérgi szinaptikus boutonokat digitális képsorozatokból az OpenCAR (Contour Alignment Reconstruction; részletekért lásd Sätzler és mtsi., 2002) szoftver segítségével rekonstruálták.

#### c. TNAP lokalizáció meghatározása

<u>Réteg-lokalizáció humán mintákon.</u> Az optikai denzitást (OD) a vizsgálni kívánt terülen a kéregfelszínt a szürke és fehérállomány határával összekötő vonal mentén elhelyezett négyszögletes áreában (50 µm x 1000 µm) mértük. Az OD referenciaszintet (alapvonal) a vizsgált metszet mellett mértük a tárgylemezen. A méréseket ugyanazon agykérgi terület legalább három különböző metszetén (HM2, 9308, 9978, 246, 248) vagy ugyanazon metszet három különböző helyén (HM1, 9173) végeztük. Az OD-mérések számát az egyes agyminták agykérgi vastagságának méretéhez igazítottuk, és így 36 és 78 között változott. Az egyéni és regionális eltérések kiküszöbölése érdekében az adatokat a szürkeállományban mért maximális OD-értékre normalizáltuk, és a lokalizációt a teljes kérgi mélység százalékában fejeztük ki. Az OD-értékeket az agykérgi mélység függvényében ábrázoltuk, ami a TNAP-jelölt metszeteken egy harang alakú görbét eredményezet, ami magas korrelációs együtthatóval ( $0,75 < R^2 < 0,99$ ) illeszkedett a Gauss valószínűségi eloszlásfüggvényhez. Az illesztés lehetővé tette a görbe csúcsának (amplitúdó) és félmagasságban vett szélességének meghatározását (Origin 6.1®, OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). A 4. réteg felső és alsó határát a Nisslfestés segítségével mértük meg a metszeteken a Mercator szoftver (Explora Nova®) segítségével, hogy meghatározzuk a vastagságát és relatív helyzetét a kéreg mélységében.

<u>A génkiütés hatása a mielinizációra és a szinaptogenezisre.</u> Fénymikroszkópos elemzés. A képelemzést Mercator szoftver (Explora Nova®) segítségével végeztük egy CCD-kamerával felszerelt, Leica DMR mikroszkóppal készített képeken. A gerincvelő fehérállományának százalékos arányát 7 különböző posztnatális életkorban (P1, P2, P4, P6, P7, P8 és P10) határoztuk meg a WT és KO egerekben állatonként több, mielin festéssel kezelt metszeten végzett mérésekből (2. táblázat). A teljes gerincvelő és a szürkeállomány keresztmetszeti területét kézzel körbehatároltuk, így az értékeket automatikusan megkaptuk. Ezekből az adatokból a fehérállomány százalékos értékét a teljes keresztmetszeti területre vonatkoztatva határoztuk meg. A növekedési ütemet úgy számoltuk ki, hogy az 1. posztnatális napon (P1) mért keresztmetszeti terület értékét kivontuk az adott posztnatális napon mért értékből, és elosztottuk a P1 értékkel.

*Elektronmikroszkópos elemzés.* A mérések digitális EM képeken történtek az ImageJ (Rasband, 1997–2011) és az analySIS (Olympus) képelemző programokkal. A gerincvelőben a vad és TNAP-KO állatokban a 3 különböző osztályba (I., II., III., leírást ld. Eredmények, D.II.2.a. fejezetben) sorolt mielin hüvelyes axonok számát az ultravékony metszetek 64  $\mu$ m<sup>2</sup>-es területén számoltuk meg mind a 6 különböző esetben (P2, P7, P8 a WT-ben és a KO-ban, esetenként egy állat) 20K nagyításon, a nyaki szakaszon a ventrális fasciculusból készített 50 (25 jobb és 25 bal oldali, összesen 64 $\mu$ m<sup>2</sup> látótér) képen. Véletlenszerűen kiválasztott, különböző típusú mielinizált axonok keresztmetszeti területét postnatális 7. napon két KO és két WT egérben mértük állatonként 30 darab, 20K nagyítású elektronmikroszkópos felvételen. Az axonokat (3 axon/kép mind a három típusból) a képeken egy 2×2  $\mu$ m<sup>2</sup>-es rács véletlenszerűen kiválasztott négyzeteiben mintavételeztük (összesen 30×4×3×3=1080 axon). A következő változókat mértük: 1) a mielinizált axonok teljes keresztmetszeti területe (mindhárom osztály), 2) a csupasz axon keresztmetszeti területe (mindegyik csoport), 3) az axonok körüli oligodendrocita nyúlványok keresztmetszeti területe (I., II. osztály) és 4) a mielinhüvely keresztmetszeti területe (II., III. osztály). A területeket kézzel határoltunk körbe. Végül a mért területek négyzetgyökével kiszámítottuk a g-arányt (az axon és a teljes, mielines rost területének aránya a keresztmetszeteken), majd elvégeztük a statisztikai összehasonlításokat.

A szinaptogenezist 6 állat (P7-ben 2 KO és 2 WT, valamint csoportonként egy egér P8-ban) parietális kérgében elemeztük a szinaptikus kapcsolatok 2 csoportba sorolásával. Érett szinapszisoknak tekintettük azokat, amik jól fejlett pre- és posztszinaptikus membrán specializációval, egyértelműen azonosítható szinaptikus réssel és számos szinaptikus vezikulával rendelkeztek. Az éretlen szinapszisokat vékony és kis kiterjedésű szinaptikus membrán specializáció valamint a szinaptikus vezikulák hiánya vagy alacsony száma és elszórt eloszlása jellemezte (6. ábra) (Li és mtsi., 2010). A szinapszisokat 20K nagyításon állatonként 50 elektronmikroszkópos felvételen számoltuk meg. Annak megerősítésére, hogy a szinapszisok osztályozása nem egy érintőleges metszési sík eredménye, 11 KO és 7 WT szinapszist sorozatmetszetek alapján 3D-ben rekonstruáltunk a Reconstruct szoftver (Fiala, 2005) segítségével.

Ahol külön nem említettük a digitális kamerával rögzített mikroszkópos képek feldolgozásához az ImageJ (NIH, Bethesda, MD) és Adobe Photoshop (Adobe Systems, San Jose, CA) programokat használtunk. A statisztikai elemzés és más adatfeldolgozás MS Excel, Statistica (StatSoft) MATLAB (Mathworks, Natick, MA) és Python programokkal történt.

#### III. Monokuláris depriváció

Két 3 hónapos selyemmajomban monokuláris vizuális deprivációt végeztünk 14 napon át, a 67. postnatalis naptól a 81. napon történt perfúzióig. A deprivációt altatásban végeztük xilazin/ketamin (5 mg/kg, illetve 25 mg/kg) 1:5 arányú keverékével, helyi érzéstelenítéssel (xilokain) kiegészítve. A szemgolyót átlátszatlan lencsével (Dencott Laboratories, Franciaország) fedtük le egy csepp komfortgéllel, és a felső, és az alsó szemhéjak összevarrásával rögzítettük. A nazális végen egy kis nyílást hagytunk a könnyelvezetés és a napi B12-vitaminos szemmosás céljából. A műtétet követően varratot és a szemhéjakat antibiotikumos kenőccsel (oxitetraciklin) bekentük.

Egy rézusz majomban a monokuláris deprivációt tetrodotoxin (TTX) intraokuláris injekcióval idéztük elő, amely blokkolja a Na-csatornákat és következésképpen a retinális

55

akciós potenciálok kialakulását (Stryker és Harris, 1986). Miután az állatot ketaminnal (25 mg/kg) elaltattuk, 10 μl TTX-oldatot (1,6 μg/μl) injektáltunk inzulinos fecskendővel (29G) a szemkamra felső részébe, a szaruhártyától 1 mm-re. Az állatot 5 nap után, amely időszakban pupillareflex nem volt megfigyelhető az injektált szemben, túlaltattuk.

# IV. Neurofiziológiai mérések

#### 1. Ingerlés

A szomtotópiás térképezéshez az altatott selyemmajmok műtéti oldallal ellenkező oldali kézfeje a kézháton, a körmök felőli oldalon tenyérrel felfelé, gyurmában került rögzítetésre. Ez lehetővé tette a szőrtelen bőrfelületű ujjbegyek valamint a tenyér ujjak töve körüli részének ingerlését. Az ingerlés egy hurkapálcával és von Frey szőrökkel végzett durva térképezéssel kezdődött. Ezután az ujjak reprezentációjának pontosabb lokalizációja és a receptív mező (RF) tulajdonságok meghatározása vibrotaktilis ingerléssel történt. E célból egy 2 mm átmérőjű teflon rudacskát illesztettünk az ingerelt ujjbegy bőrfelszínére. A teflon rúd egy piezokeramikus egységhez (Noliac, Kvistgaard, Denmark) volt rögzítve, amit egy komputer-vezérelt Grass 88 ingerlő (Grass-Telefactor, West Warwick, RI) működtetett. A taktilis inger 3 másodperces, 8 Hz-es négyszögimpulzus-sorozatokból állt (impulzus időtartama 30 ms, amplitúdója 0,48 mm). Az ingereket 40-50 tesztsorozatból álló blokkokban adtuk. Az ingermentes (blank) időszakokban a teflon rúd finoman érintkezett a bőrrel.

Néhány esetben a hőérzékenységet is meghatároztuk egy Peltier-hőszonda bőrre helyezésével; a hőmérsékletet másodpercenként 18 °C/s-al emeltük a 33 °C-os alaphőmérsékletről egy 3 másodperces időtartamú 49 °C-os platóhőmérsékletre.

#### 2. Elektrofiziológiai térképezés

Az elektrofiziológiai térképezést a sulcus centralis laterális végét anatómiai tájékozódási pontként használva volfrám mikroelektródával a felső agykérgi rétegekben (200-500 µm mélységben) végeztük az SI kéz reprezentációjának területén. Az egysejt aktivitást kiváltó bőrfelületet kezdetben hurkapálcával, majd von Frey szőrökkel végzett tapogatással azonosítottuk a tüzelési aktivitás kihangosításával.

Az área 3b jellemzően közvetlenül a centrális sulcus előtt található, tőle kaudálisan húzódik az área 1, míg az área 3a az área 3b előtt helyezkedik el (Chen és mtsi., 2001; Friedman és mtsi., 2004, 2008; Sur és mtsi., 1982). Az egy- és soksejt aktivitás mérésével az área 3b-t az egyetlen ujjra lokalizálódó, kis RF és a finom érintésre

adott erőteljes válaszok alapján azonosíthattuk. Área 3b-vel összehasonlítva área 1-ben a RF-k nagyobbak voltak, gyakran több ujjra is kiterjedtek. Az área 3b és 1-ben a disztális ujjbegy reprezentációk közötti kérgi területen a középső ujjpercek és a tenyér reprenzentációja található. A 3a/3b határt a disztális ujjbegyek csúcsukra tükörszimmetrikus (csúcs-a-csúcshoz) reprezentációja valamint az área 3b-re jellemző bőrreceptor aktiváció helyébe lépő, área 3a-ra jellemző ízületi mozgásokra akiválódó mély receptorokból származó jelek azonosították. Área 3a-ban az idegsejtek gyakran nagy, nem meghatározott specificitású RF-vel rendelkeztek.

Bár újvilági majmokban az área 2 megléte nem teljesen tisztázott (Kaas, 2004), tanulmányunkban az área 1-től kaudálisan található szomszédos területet área 2-vel azonosítottuk a mókusmajmokban. A két terület határát ugyancsak a "ujj hegy-az-ujj hegyhez" disztális ujjbegy reprezentációk és az altatásban az área 2-re jellemző bőrreceptor ingerléssel nehezen vagy nem ingerelhető tulajdonság alapján határoztuk meg (Pons és mtsi., 1985; Pons és Kaas, 1986). Área 2-ben az idegsejtek nagy, gyakran az egész kezet lefedő RF-el rendelkeztek. A nagy RF és a proprioceptív ingerlésre való érzékenység miatt az ujjak szomatotópiáját nem lehetett pontosan meghatározni área 3a és 2-ben (Iwamura és Tanaka, 1978; Iwamura és mtsi., 1993; Iwamura, 2000; Huffman és Krubitzer, 2001; Padberg és mtsi., 2005). Hőérzékeny idegsejteket gyakran találtunk área 3a-ban és esetenként área 2-ben is (Tommerdahl és mtsi., 1996; Chen és mtsi., 2009).

#### 3. Az intrinzik optikai jel detekciója

Az intrinzik otikai jelhez (IOS) a felvételek 630 nm-es megvilágítással készültek egy optikai kamrán keresztül CCD kamerával egyrészt egy CortiPlex program alatt futó Redshirt Imaging System (Redshirt Imaging, Decatur, GA), másrészt egy Imager 3001 (Optical Imaging, Germantown, NY) rendszer alkalmazásával. A javarészt az agykéreg felső 500 µm-éből származó visszavert fényt makroszkópos tandemlencse kombináción keresztül detektáltuk (Ratzlaff és Grinvald, 1991). A későbbi tájékozódást (ld. térképek illesztése) segítő agyfelszíni véredénytérképről 570 nm-es megvilágítással készült felvétel. A taktilis ingereket véletlen módon kevert blokkokban prezentáltuk, ahol a blokkok 4 kondíciót tartalmaztak (pl. egyetlen ujjon a proximális, középső vagy disztális részek, ezt követően ingermentes szakasz; vagy, pl. a D2, D3 és D4 ujjak disztális ujjbegy ingerlése és azután az ingerentes periódus). Kondíciónként 40-50 tesztsorozat adatait gyűjtöttük. Az IOS felvételek 200 ms-al az ingerlést megelőzően indultak, 5 kép/s felbontással készültek 4 másodpercen át. Az ingerek közt 8-10 s intervallumot hagytunk.

A képelemzés során ingerlési kondíciónként 6-15 képkockát összegeztünk a jelzaj-arány maximalizálása érdekében. Ennek az átlagnak az első képkockától való eltérését használtuk az aktivációs térkép számításához. Az erezetből származó mellékterméket a blank (3 másodpereces ingermentes szakasz) kivonásával csökkentettük. felvételeken legerősebb aktivitást А а produkáló terület körülhatárolásához egy 10 pixeles (150 µm sugarú) aluláteresztő Gauss térbeli szűrőt használtunk. A jel megbízhatóságát és konzisztenciáját a felvételek képkockáról képkockára történő időbeli fejlődésével és a különböző kísérleti blokkok felvételeinek összegzésével kapott képek összehasonlításával teszteltük (Chen és mtsi., 2001; Friedman és mtsi., 2004).

#### 4. fMRI mérések

Az MRI mérések egy 9,4T Varian Inova berendezéssel (Varian Medical Systems, Palo Alto, CA, USA) történtek, 3 cm-es felszíni tekercset használva. A kéregfelszíni vénák azonosítása a sulcus centralis és az SI területek lokalizálása, az fMRI-térképek koregisztrálása a felvételi alkalmak között az egyes állatokban és azok között, valamint az elektróda mérőpontok lokalizációja T2-súlyozott ferde síkú strukturális képeken (TE: 16; TR: 200 ms) valósultak meg 78×78×1000 µm<sup>3</sup> felbontásban. Ugyanazon szeletekből gradiens visszhang (gradient echo planar, EPI) szekvenciával (TE: 16 ms; TR: 1,5 s), 575×575×2000 µm<sup>3</sup> és 275x275x2000 µm<sup>3</sup> voxelméretekkel nyert funkcionális MRIadatok Matlab programban kerültek elemzésre (Mathworks, Natick, MA, USA). Minden mérési alkalommal készültek tapintási inger által kiváltott és nyugalmi állapotú BOLDfelvételek. Tíz mókusmajomból huszonegy 575×575×2000 µm<sup>3</sup> felbontású, és egy mókusmajomból három 275x275x2000 µm<sup>3</sup> felbontású nyugalmi állapotú fMRIadatsorozat lett rögzítve.

A nyugalmi állapotú funkcionális EPI-adatok előfeldolgozást követően Matlabban kerültek elemzésre. A szelet idő-korrekció 2D szeletenkénti mozgáskorrekciót követően történt. A mozgás és a sodródás (zavaró jelek) okozta időbeli változások csökkentése regresszióval történt négy transzlációs és rotációs paraméterrel. Ezután az adatok térbeli simítására egy FWHM = 1 mm-es (félmagasságban mért szélesség) Gauss-kernel, majd az időbeli sávszűrésre 0,008 és 0,08 Hz-es határfrekvenciával egy Chebyshev II. típusú szűrő került alkalmazásra. A sávszűrés csökkenti a tartományon kívüli frekvencia összetevőket. A 3b és 3a áreákban a mag-voxelek meghatározását minden egyes állatban az ingerrel kiváltott fMRI-aktivációs térképek segítették. Az arc

reprezentációban a mag-voxel helyének meghatározása a fajban ismert szomatotópia és a rendelkezésre álló elektrofiziológiai térképek alapján történt. Meghatároztuk a voxelenkénti korrelációt, majd  $r \ge 0.7$  küszöbértékkel ábrázoltuk. Mivel a látómezők kissé eltértek az egyes állatok között, a populáció szintű elemzésben a mag-voxeleket használtuk viszonyítási pontként.

# EREDMÉNYEK

 A. A funkcionális integráció és az aktivitás koordinációjának hálózatszerkezeti alapjai az agykéregben

I. A vizuo-taktilis integrációban meghatározó szerepet játszó agykérgi áreák és összeköttetések azonosítása hálózatelméleti eszközökkel

# 1. A bimodális hálózat jellemzői

A szenzomotoros áreákat is tartalmazó vizuo-taktilis hálózat alapvető tulajdonságait a 3. táblázat foglalja össze. Az irodalmi adatok alapján általunk összeállított (Módszertan, A.I. fejezet) vizuo-taktilis kérgi hálózat összekötöttsége (élsűrűsége) gyengébb és átmérője nagyobb, mint a két fő alhálózaté, a látó- és szenzomotoros kéregé. A reciprocitás mindhárom hálózatban hasonlóan magas arányú. Említésre érdemes még a klaszterezési együttható (a csúcsok csoportképzési hajlandóságának mértéke) ugyancsak hasonló értéke a három hálózatban.

**3. táblázat**. A vizuo-taktilis bimodális kérgi hálózat alapvető tulajdonságai. A vizuális és szenzomotoros kéreg között 43 heteromodális összeköttetést azonosítottunk.

HÁLÓZATOK	VIZUÁLIS	SZENZOMOTOROS	BIMODÁLIS
ÁREÁK SZÁMA	30	15	45
ÖSSZEKÖTTETÉSEK SZÁMA	335	85	463
ÉLSŰRŰSÉG <sup>1</sup>	0,39	0,40	0,23
<b>RECIPROCITÁS (%)<sup>2</sup></b>	85,1	88,9	81,6
KLASZTEREZÉSI EGYÜTTHATÓ <sup>4</sup>	0,56	0,65	0,54
ÁTLAGOS ÚTHOSSZ ±SZÓRÁS⁵	1,6±06	1,7±08	2,1±09
ÁTMÉRŐ <sup>6</sup>	3	3	5

<sup>1</sup>Az összes lehetséges kapcsolathoz képest létesített összeköttetések aránya.
<sup>2</sup>Az irányítatlan (irány és reciprocitás figyelmen kívül hagyása) hálózatban található összeköttetések számához képest.

<sup>4</sup>Egy área szomszédjaival (hálózatokban a szomszédságot a közvetlen összeköttetés jelenti) létesített összeköttetések száma osztva a szomszédok között lehetséges összes kapcsolat számával. A teljes hálózatra az egyes áreák együtthatóinak átlagával adható meg. <sup>5</sup>Az áreák közötti legrövidebb úthosszakból számolva.

<sup>6</sup>A legrövidebb utak közül a leghosszabb.

- 2. Modalitás és modularitás
  - a. Diszkrét és átfedő klaszterek, híd áreák



1. ábra. A vizuo-taktilis hálózat klaszter szerkezete. (A) Élköztiségen (EB) alapuló Markov klaszterezés (MCL). A véletlen bolyongás MCL algoritmussal, irányított és súlyozott éleken megvalósított szimulációjának eredménye. Az összeköttetéseket EB szerint súlyoztuk. Az egyes klasztereket eltérő szürkeárnyalat jelöli. A 4 klaszter jól mutatja a vizuális (négyszögek) és szenzomotoros (körök) áreák dorzális (jobb és bal oldali klaszterek) és ventrális (alsó és felső klaszterek) pályarendszerek szerinti elkülönülését. Fekete nyilak: klaszteren belüli összeköttetések, halvány szürke nyilak: klaszterek közötti összeköttetések. (B) Átfedő fuzzy klaszterszerkezet. Az áreák hídság (bridgeness) indexszel számított erősebb híd szerepét sötétebb árnyalat jelöli; a híd áreák feketék, fehér felirattal.

A hálózat funkcionális tagolódásának alaposabb megértése céljából klaszterezés segítségével tanulmányoztuk a szorosan együttműködő áreák csoportjait. Kétféle klaszterezési technikát használtunk a vizuo-taktilis kérgi kompartmentalizáció megértéséhez. Az 1A ábra egy valószínűségen alapuló módszer a Markov klaszterezési eljárás (MCL) eredményét mutatja az élköztiség (EB), mint súlyozási faktor figyelembe vételével. A MCL-el 4 egyértelműen megkülönböztethető klasztert sikerült azonosítani: a vizuális és szenzomotoros kérgi áreák ventrális, és dorzális pályarendszerekhez sorolt területeinek csoportjait. A klaszterek kirajzolásához alkalmazott algoritmus (ld. Módszertan A.III. fejezet) szépen mutatja a különböző szenzoros V1 és 3b áreák, melyek nem létesítenek heteromodális összeköttetéseket, a hálózat szélére kerültek, a

heteromodális kapcsolatokat létesítő parietális struktúrák és a szupramodális, specifikus szenzoros funkciótól független prefrontális kérgi (PFC) área 46 a hálózatban centrális helyen láthatók. A vizuo-taktilis integrációban központi jelentőségűek a parietális VIP és LIP áreák, melyek a dorzális pályarendszerek részeiként lépnek heteromodális kölcsönhatásokba. Az ábrán látható az is, hogy a látókéregben a dorzális és ventrális klaszterek együttműködésének egyik kulcsszereplője az área V4. Az área 46 és kisebb mértékben a parietális área 7a központi elhelyezkedéséből és a klaszterekkel kialakított összeköttetéseiből kitűnik, hogy modalitástól független, ill. multimodális integratív struktúrák a hálózatban.

Az agykéregben, és általában a valós hálózatokban az áreák (komponensek) kiterjedt kapcsolataik miatt nem feltétlenül rendelhetők kizárólag egy klaszterhez. Egy área különböző klaszterekhez tartozása tehát fontos információ a funkcióját illetően, amit egy átfedő, fuzzy klaszterezési módszerrel tanulmányoztunk. A fuzzy, és MCL klaszterezés közötti különbség jól látható az 1A és 1B ábrák összehasonlításával: az áreák elrendeződése mindkét esetben nagyon hasonló, de fuzzy klaszterezéssel éles határok nem húzhatók a csoportok között. Fuzzy klaszterezéssel a csúcsok (esetünkben áreák) klaszterekhez kötődésének a mértékét határozzuk meg. Ilyen módon bizonyítható volt, hogy az área LIP, VIP, 7a, 46 és V4 un. híd áreák, melyek több klaszterrel is összeköttetésben állnak, azaz több csoporthoz is jelentős mértékben köthetők. Ezt mutatja számszerűsítve a 2. ábra, ahol az áreák hídsága a fokszám függvényében került ábrázolásra. A híd áreák specifikus integratív funkciója az 1B ábráról is leolvasható az áreák elrendeződéséből. A multimodális LIP és VIP meghatározó szerepet kap a vizuotaktilis interakciókban; az unimodális área V4 centrális pozícióval bír a dorzális és ventrális vizuális pályák interakcióiban; az área 46 és 7a szupramodális és multimodális integratív struktúrák, melyek a hálózat minden komponensével összeköttetést létesítenek.



2. ábra. A híd áreák azonosítása a hídság és fokszám viszonyuk alapján. A háromszöggel jelölt áreák a híd áreák, melyek több klaszterrel is szoros kapcsolatban állnak. VOT hídság értéke ugyan magas, de alacsony fokszáma miatt a hálózatban marginális pozícióval rendelkezik. A többi áreát megnevezés nélkül 'x' jelöli.

b. Klikkek

A klikkekben az összes lehetséges összeköttetés megtalálható az áreák között, azaz az áreák közötti erőteljes funkcionális átfedésre számíthatunk ezekben a csoportokban. A vizuo-taktilis hálózatban a legnagyobb klikkeket lényegében a dorzális vizuális pályarendszerhez tartozó áreák alkották (4. táblázat). A 11 áreából, amelyek a legnagyobb klikkek összetevői, némelyek mindegyikben előfordultak, mások, mint a V3 és VP pedig kölcsönösen kizárók voltak. A 8 legnagyobb klikkből 6-ban szerepelt a LIP és/vagy a VIP. Két kivétellel a LIP és VIP által alkotott klikkeknek volt a legnagyobb átlagos csúcsköztiség (NB) értéke (4. táblázat). Primer szenzoros kérgi área a legnagyobb klikkekben nem fordult elő.

**4. táblázat**. A vizuo-taktilis hálózat legnagyobb klikkjei. A 8 db 7 elemű klikk sorokba rendezve látható úgy, hogy az egyes áreák részvétele a különböző klikkekben kitűnjön. A legnagyobb átlagos cúcsköztiséggel (NB) rendelkező klikkek vastag betűtípussal kerültek kiemelésre.

											NB
V2	V3	V3A		MT	MSTd/p				FST	FEF	136,77
V2		V3A	VP	MT	MSTd/p				FST	FEF	138,15
	V3	V3A		MT	MSTd/p		LIP		FST	FEF	151,75
	<b>V3</b>			MT	MSTd/p	PO	LIP	VIP		FEF	195,75
	<b>V3</b>			MT	MSTd/p		LIP	VIP	FST	FEF	200,05
		V3A	VP	MT	MSTd/p		LIP	VIP	FST	FEF	153,14
			VP	MT	MSTd/p	PO	LIP	VIP	FST	FEF	197,14
			VP	MT	MSTd/p		LIP			FEF	201,44

Külön megvizsgáltuk a MCL-el azonosított klaszterekben található legnagyobb klikkeket (5. táblázat). A két szenzomotoros klikk nagy átfedést mutat (6-ból 5 área azonos) és mindegyikben szerepel a VIP. A dorzális vizuális klikkekben egy kivétellel (V3A) ugyanazon "mag" áreák szerepeltek állandó résztvevőként, amelyek a teljes

hálózat legnagyobb klikkjeiben is előfordultak (MT, MSTd/p, FEF és részben a FST) (4. táblázat). Ez az átfedő "mag" a dorzális vizuális klikkek méretének több, mint a felét kiteszi. Érdekes, hogy a LIP csupán e klikkek felében fordul elő (kölcsönösen kizáró módon a V2-vel). Primer szenzoros áreák ez esetben sem voltak a klikkekben (5. táblázat).

klaszter									
SMC									
	VIP	2	5		4	6	SMA		
	VIP		5	7b	4	6	SMA		
VISv									
	V4	PITv	CITv	AITv	TH				
VISd									
	V2	V3	V3A		MT	MSTd/p		FST	FE
	V2		V3A	VP	MT	MSTd/p		FST	FE
			V3A		MT	MSTd/p	LIP	FST	FE
			V3A	VP	MT	MSTd/p	LIP	FST	FE

**5. táblázat**. A szenzomotoros (SMC), dorzális vizuális (VISd) és ventrális vizuális (VISv) kérgi klaszterek (1A ábra) legnagyobb klikkjei.

#### 3. A keresztmodális integrációban központi szerepet játszó pályák azonosítása

a. Pályakövetés a bimodális hálózatban

A szomatoszenzoros kérgi área 1, 2 és 3a-ból legkevesebb 3 ugrással elérhető a V1 primer látókérgi área (3A ábra). Ez egy ugrással hosszabb, mint az átlagos úthossz, és megegyezik a vizuális és szenzomotoros kéreg átmérőjével, viszont jelentősen rövidebb, mint a teljes bimodális hálózat átmérője (3. táblázat). Az área 3b-ből indulva a legrövidebb úthossz egy plusz éllel 4-re nő. Az intraparietális régió, esetünkben a VIP meghatározó csomópont a V1-be vezető, szomatoszenzoros információt szállító legrövidebb utak mentén: ide konvergálnak az SI-ből induló összeköttetések és innen ágaznak szét olyan vizuális kérgi struktúrák felé, nevesül a MT, V3 és PO, amelyek már közvetlen kapcsolatban állnak a V1-el (3A ábra).

Megerősítéses tanulással előállított fagráf alátámasztotta a VIP központi jelentőségére tett megfigyelésünket a szomatoszenzoros információ V1-be jutásában (3B ábra). A VIP és V1 közötti 3 alternatív relé área közül a V3 áreán átmenő pálya volt a legfontosabb a szomatoszenzoros információ V1-be jutása szempontjából. Az MT és PO inkább a magasabb szinten feldolgozott prefrontális kérgi área 46 és magas rendű szenzomotoros asszociációs áreákból származó információ V1-betörténő továbbításáért felelősek.



**3. ábra**. (előző oldal) Az elsődleges vizuális kéregbe (V1) vetülő, SI-ből induló legrövidebb pályák a vizuo-taktilis hálózatban. (**A**) Rézusz majom agyfélteke kiterített agykérge. A látókérgi és szenzomotoros áreákat rövid nevükkel jelöltük. A heteromodális összeköttetéseket létesítő áreákat szürke szín jelöli, ezen belül a VIP sötét árnyalattal került megkülönböztetésre. A piros nyilak a szomatoszenzoros (área 3a, 1 és 2) és vizuális (V1) kérgi áreák közötti legrövidebb utakat jelölik a hálózatban. Occipitális régió balra, mediális felfelé helyezkedik el. (**B**) Megerősítéses tanulásos algoritmussal előállított feszítőfa, ami a V1-be vetülő legjutalmazóbb, legrövidebb utakat szemlélteti a vizuotaktilis kérgi hálózatban. A program a megkötés szerint a V1-ben végződő, de bármely más áreából induló pályákat azonosította, amelyek a jutalom-feltételt (folyt.)

teljesítették. Körök: szenzomotoros áreák, négyszögek: látókérgi áreák. A dorzális pályák struktúráit kék és zöld, a ventrális pályákét piros és fehér jelöli. Az (A) ábrán azonosított, legrövidebb utakat formáló pályákat fekete körök jelölik.

b. Az összeköttetések szerepe a keresztmodális integrációban

A vizuo-taktilis kéregben az élek többségének élköztiség (EB) értéke 20 alatt volt és csupán néhány esetben haladta meg a 40-t; a 20-40 közötti érték magasnak számított (4. ábra). A V1-be szomatoszenzoros információt közvetítő összeköttetések közül a VIPbe vetülők, ill. onnan eredők nagy EB értékkel rendelkeztek, köszönhetően a VIP centrális pozíciójának (6A táblázat). Ezzel szemben a V1-be vetítő összeköttetések a hálózatban nagy gyakorisággal előforduló kis EB értékkel bírtak (4. ábra, 6A táblázat).



**4. ábra**. Az élköztiség (EB) gyakoriságeloszlása a vizuo-taktilis kérgi hálózatban.

Az EB komputációja során azonosítottuk a vizuo-taktilis információt szállító pályák összeköttetéseinek bemeneti és célterületeit (6B táblázat). Ezek alapján a szomatoszenzoros kérgi 3a, 1 és 2 áreák VIP-be vetítő összeköttetésein át a teljes vizuális kérget elérheti a szomatoszenzoros információ. A kimeneti oldalon a VIP-ből V1-be vetítő pályák kiindulási területei között pedig megtalálható az összes szomatoszenzoros kérgi área. Ugyancsak megfigyelhető a szomatoszenzoros kérgi kapcsolatok erőteljes divergenciája (kevés bemeneti área, sok célterület) és a V1-be vetítő összeköttetések erőteljes konvergens jellege (relatíve sok bemeneti área, kevés célterület). Ezzel szemben a VIP-ből eredő összeköttetések számos bemeneti és célterülettel rendelkeztek. A bemeneti és célterületek vizsgálata során megállapítást nyert, hogy a  $2 \rightarrow$ VIP összeköttetés az elsődleges szomatoszenzoros kérgi área 3b mellett az asszociatív área 7a-ból is szállít információt, ezért a kereszt-modális információ feldolgozását tekintve kevésbé specifikus kapcsolatnak tekinthető, mint a  $3a \rightarrow$ VIP és az  $1 \rightarrow$ VIP

összeköttetések. Hasonlóképpen, a PO→V1 kevésbé mondható specifikusnak, mint a MT→V1 és V3→V1 kapcsolatok, mert a célterületei között a V1 mellett még 7 másik vizuális kérgi área is található.

**6. táblázat**. A keresztmodális plaszticitásért felelős pályák jellemzése az élek centralitása és szenzoros modalitása szerint.

(**A**) Az összeköttetések élköztiség (EB) értékei és heteromodalitása a bemeneti-, és célterületek számának modalitások szerinti megoszlása alapján. VC: vizuális kéreg, SMC: szenzomotoros kéreg.

Kapcsolat	FD	Bemeneti	áreák száma	Cél áreák száma		
(forrás → cél)	ĽD	VC	SMC	VC	SMC	
$3a \rightarrow VIP$	37,7	0	2	30	6	
$1 \rightarrow \text{VIP}$	29,8	0	2	30	4	
$2 \rightarrow \text{VIP}$	28,0	1	2	30	2	
$VIP \rightarrow V3$	29,5	4	15	11	0	
$VIP \rightarrow MT$	26,4	1	15	10	0	
VIP → PO	22,0	4	15	5	0	
$PO \rightarrow V1$	9,2	11	15	8	0	
$MT \rightarrow V1$	8,2	12	15	1	0	
$V3 \rightarrow V1$	7,1	10	15	1	0	

( <b>B</b> )	Az	egyes	összeköttetések	EΒ	számítás	során	azonosított	bemeneti	és	célterületei
rési	zlet	ezve.								

from/to	Eb. Fract (reciproc.)	Input areas	Target areas
3a/VIP	58.65 (22.42)	3a,3b	V1,V2,V3,V3A,V4,V4t,VOT,VP,MT,MSTd/p,MSTI,PO,LIP,PIP,VIP,DP, PITd,FST,PITv,CITd,CITv,AITd,AITv,STPp,STPa,TF,TH,FEF,46 SMA,5,6,7a,7b,35,36
1/VIP	29.62 (20.48)	36,1	V1,V2,V3,V3A,V4,V4t,VOT,VP,MT,MSTd/p,MST1,PO,LIP,PIP,VIP,DP,FST, PITd,PITv,CITd,CITv,AITd,AITv,STPp,STPa,TF,TH,FEF,46, SMA,4,7a,35,36
2/VIP	28.83 (14.67)	7a,3b,2	V1,V2,V3,V3A,V4,V4t,VOT,VP,MT,MSTd/p,MST1,PO,LIP,PIP,VIP,DP,FST, PITd,PITv,CITd,CITv,AITd,AITv,STPp,STPa,TF,TH,FEF,46,7a,35,36
VIP/V3	28.12 (10.7)	VP,MSTI,VIP,46,3a,3b,1,2,5,Ri,SII,7b,4,6,SMA,Ig,Id,35,36	V1,V2,V3,V3A,V4,V4t,PIP,TF
VIP/MT	24.44 (9.55)	VIP,3a,3b,1,2,5,Ri,SII,7b,4,6,SMA,Ig,Id,35,36	V1,V2, V3A, V4,V4t,MT,PIP
VIP/PO	20.75 (20.24)	VIP,FST,STPa,46,3a,3b,1,2,5,Ri,SII,7b,4,6,SMA,Ig,Id,35,36	V1,V2,PO,PIP,DP
PO/V1	9.29 (15)	VP,MSTd/p,MSTl,PO,LIP,VIP,DP,7a,AITd,STPp,FEF, 3a,3b,1,2,5,Ri,SII,7b,4,6,SMA,Ig,Id,35,36	V1,V3A,V4,V4t,PITd,CITd,CITv,AITv
MT/V1	7.65 (2.85)	VP,MT,MSTd/p,MST1,LIP,VIP,FST,AITd,STPp,STPa,FEF,46, 3a,3b,1,2,5,Ri,SII,7b,4,6,SMA,Ig,Id,35,36	V1
V3/V1	7.23 (4.72)	V3,MSTd/p,LIP,VIP,FST,AITd,STPp,STPa,TF,FEF, 3a,3b,1,2,5,Ri,SII,7b,4,6,SMA,Ig,Id,35,36	٧1

II. Konvergencia-divergencia: az összeköttetések és áreák szerepének meghatározása a kérgi jelfolyam szabályozásában

1. Az összeköttetések konvergenciafoka

a. A konvergenciafok meghatározása

Az előző fejezetben bemutattuk, hogy az EB meghatározásából kiindulva az élek különböző konvergencia, ill. divergencia tulajdonságokat mutatnak (6. táblázat). Ebből kiindulva az élek konvergencia/divergencia (K/D) mértékét az alábbi módon határoztuk meg (5. ábra):

$$CD(i, j) = \frac{|Input(i, j)| - |Output(i, j)|}{|Input(i, j)| + |Output(i, j)|}$$

CD: élek konvergenciafoka, Input(i,j), (Output(i,j)): az i,j él bemeneti (cél) áreáinak száma.



**5. ábra**. A konvergenciafok (CD) és az átfedés index (O<sub>d</sub>) értelmező ábrái. (**A**) A szürke mezők az AB irányított élen (vastag nyíl) átmenő legrövidebb utak bemeneti és célterületeit mutatják. Ebben az esetben a tényleges CD érték (5-4) / (5+4) = +0.11. A D és az E csúcs nem szerepel a bemeneti mezőben, mert B-n keresztüli legrövidebb útvonalon kikerülik az AB összeköttetést. C viszont, melynek két egyenlő hosszúságú (az élek száma szerint 3) útja is létezik B-be, része a bemeneti mezőnek, mert az egyik út áthalad az AB élen. (**B**) az (A) hálózat GF élét BG közé áthelyezve átfedő be- és kimeneti halmazokat kapunk, amennyiben G csúcs mindkettőnek tagja lesz. A globális (global) megjelölés a lokális, első szomszédokat (követlen összeköttetés) jelentő be/kimeneti (inset, out-set) halmazoktól való megkülönböztetést szolgálja.

A konvergenciafok (CD) globális mérték, azaz a közvetlen szomszédsági viszonyokon túl a teljes hálózatból kerül meghatározásra. A CD -1 és +1 intervallumban változik. Pozitív CD konvergens élet jelent, míg a divergens élek CD értéke negatív. A CD az EB-től függetlennek tekinthető, nincs közöttük korreláció (7. táblázat).

HÁLÓZATOK	PEARSON	SPEARMAN	KENDALL
BIMODÁLIS	-0,017	0,032	0,025
MAKÁKÓ	-0,0049	0,022	0,021
MACSKA	-0,028	0,022	0,021
ERDŐS-RÉNYI	-0,0057	-0,013	-0,0065
RANDOM MAKÁKÓ	-0,0044	0,0075	0,011

**7. táblázat**. Az élek CD és élköztiség értékei közötti korreláció mértéke különböző kérgi és random hálózatokban. Bimodális: vizuo-taktilis, makákó: rézusz majom.

b. A konvergencia és divergencia reciprok és szimmetrikus szerveződése a kérgi hálózatban

A kérgi hálózatban konvergencia (6A ábra) és divergencia (6B ábra) komplementer tulajdonságok, a reciprok élpárok CD értéke ellenkező előjelű és hasonló nagyságú. Ezáltal a konvergens és divergens élek két komplementer alhálózatot alkotnak, melyek ugyanazokból a csúcsokból állnak. Figyelemre méltó, hogy a két alhálózatban az összeköttetések iránya megfeleltethető a felszálló pályákat (6B ábra) és visszacsatolásokat (6A ábra) tartalmazó alhálózatoknak a kérgi hierarchiában (Felleman és Van Essen, 1991; Scannell és mtsi., 1995; Hilgetag és mtsi., 2000b). A teljesség kedvéért meg kell említeni, hogy kis számban előfordultak azonos előjelű reciprok összeköttetések (20 db a vizuo-taktilis kéregben) és nulla CD értékű élek (8 db a vizuotaktilis kéregben) is (6. ábra).



6. ábra. Konvergencia és divergencia a rézusz majom vizuo-taktilis kéreg klaszterezett hálózatában. (A) A pozitív CD értékű, konvergens élek iránya és elrendeződése. (B) A negatív CD értékű, divergens élek iránya és elrendeződése. A CD érték nagyságát a kék-piros színátmenet kódolja, ahol a kék a kis, a piros a nagy abszolút értéket mutatja. Érdekes megfigyelni a két alhálózatban a nyilak hasonló elrendeződését és (folyt)

ellentétes irányát, ami a hálózatban a konvergencia és divergencia reciprok összeköttetések mentén történő szerveződését mutatja. Az (A) ábrán a VIP és 46, valamint az Id és 36 áreák közötti kétirányú összeköttetések az azonos előjelű (itt pozitív, konvergens) élek ritka példái. Fontos megfigyelni a különböző áreák ki- és bemeneteinek eltérő irányait az (A) és (B) alhálózatokban. Az egyszerűbb megjelenítés érdekében a következő áreák nevei rövidítetve szerepelnek: MSTd/p helyett MSd, MSTI helyett MSI, PITd helyett PId, PITv helyett PIv, CITd helyett CId, CITv helyett CIv, AITd helyett AId, AITv helyett AIv, STPp helyett STp és STPa helyett STa. Az área MSTd/p az MSTd és MSTdp áreák összevonásával képeztük.

A CD erősen szimmetrikus, kiegyensúlyozott tulajdonság a kérgi hálózatban. A 7. ábrán látható, hogy körökben (az irányított élek mentén úgy visszatérni a kiinduló csúcsba, hogy minden közbeeső csúcsot és élet egyszer érintünk) és klikkekben a konvergens és divergens élek CD értékének korrelációja erősen negatív és mértéke az alhálózat méretével arányosan nő. Véletlenszerű él választással e negatív korreláció eltűnik (7. ábra).



**7. ábra**. Konvergencia-divergencia egyensúly a kérgi hálózatban. A konvergens és divergens élek CD összege nagy negatív korrelációt mutat körökben (fekete körök) és klikkekben (fekete négyzetek) is. A korreláció értéke nő a pontok (kérgi áreák) számának növekedésével mindkét hálózati struktúrában. A szimbólumoknál látható számok a vizsgált élek számát jelölik (pl. 2 pont azaz área esetén 208 db reciprok összeköttetetés van a hálózatban). **Képbetét**: véletlenszerűen választott élek CD értének összegei nagy pozitív korrelációt mutatnak. A random választott élek száma megegyezik a megfelelő méretű klikkekben tálalhatókéval.

c. Az áreák szerepe a kérgi aktivitás koordinációjában

Az áreák ki- és bemeneteinek összevont CD értékét összehasonlítva jelentősen különböztek és rangsorolhatók voltak (8. ábra). Az áreák közötti különbség a pozitív és negatív CD értékű élek eltérő megoszlásából adódott a ki- és bemeneteik számában. A skála két szélén azon áreákat találjuk, amelyek a felszálló pályákat vagy visszacsatolásokat tartalmazó alhálózatokban kizárólag ki- vagy bementekkel rendelkeztek (6. és 8. ábra). Hogy jobban megérthessük az áreák szerepét a hálózati konvergenciában, a ki- és bemeneteik CD átlagát grafikonon ábrázoltuk (9. ábra). Ez az áreákra vonatkoztatott konvergencia index a CDn. A be- és kimenetek, valamint konvergens és divergens éltulajdonságok alapján a grafikon 4 kvadránsra osztható, melyek különböző koordinációs, integratív tulajdonságokat reprezentálnak a hálózatban. Az erősen konvergens bemenetekkel és divergens kimentetekkel rendelkező áreák információ forrásnak tekinthetők (jobb alsó kvadráns). Ezzel szemben az erősen divergens bemenetekkel és konvergens kimentetekkel rendelkező áreák a hálózati aktivitást koordinálóm elosztóként értelmezhetők (bal felső kvadráns). Miután a kérgi hálózatban az afferensek és efferensek CD értéke tipikusan ellenkező előjelű, a továbbiakban a bal felső és jobb alsó kvadránsok biológiai relevanciáját tárgyaljuk.



 8. ábra. A vizuo-taktilis áreák ki- (piros) és bemeneteinek (kék) CD átlagai klaszterenként ábrázolva. (A) dorzális vizuális klaszter, (B) ventrális vizuális klaszter és (C) szenzomotoros klaszter. Megfigyelhető a grafikonok alján és tetején levő áreák ki- és bemeneti CD átlagainak ellentétes előjele.

A 9. ábrán látható az eltérő előjelű, be- és kimenő CD-átlagok lineáris korrelációja. A korrelációs vizsgálatok nagy negatív értékeket adtak a be- és kimenetek CD átlagaira összhangban a lineáris illeszkedés átló közeli eloszlásával a bal felső kvadránsban (8A táblázat). A hálózatban az áreák a 8. ábrán is szemléltetett módon folytonos átmenetet képeznek az információ elosztó és forrás funkciók között. A bal felső kvadráns nullától távol eső elosztó áreái megfelelnek 8A-C ábrák felső részén elhelyezkedő áreáknak. Ugyanígy, a bal alsó kvadráns nagy abszolút CD értékekkel rendelkező forrás áreái azok, amelyek a 8. ábra grafikonjainak alján találhatók. A kérgi hierarchiában köztes áreák (Felleman és van Essen, 1991; Scannell és mtsi., 1995; Hilgetag és mtsi., 2000b) be- és kimeneteiben a különböző előjelű CD-vel rendelkező

összeköttetések vegyesen fordulnak elő, azaz mind forrás, mind elosztó funkcióval rendelkeznek. Érdekes hogy a bal felső kvadránsban, a jobb alsótól eltérően, jobban széthúzódtak az áreák és kifejezettebb átló közeli eloszlást mutattak (kisebb szórással) azt sugallva, hogy az elosztó funkció erőteljesebb megszorítás a kérgi áreák specializációját illetően (9. ábra, 8A táblázat). A 8. ábrán az is látható, hogy az áreák CDn szerinti hierarchiája az egyes klasztereken belül is megvalósul, ami hierarchikusan szerveződő kompartmentek párhuzamos aktivitására utal a kérgi hálózat működése során (Young, 1992) és megfelel a "nagyvilág" struktúrának (Hilgetag és Goulas, 2016).



9. ábra. Az áreák be- és kimeneteinek CD átlaga a vizuo-taktilis kérgi hálózatban. Az áreákat mindegyik kvadráns ábrázolja, egymástól függő módon. A be- és kimenő CD értékek erős negatív korrelációja jól látható a bal felső és jobb alsó kvadránsokban. Az áreák sorrendje a két

említett kvadránsban megfordul (pl. amelyik az egyikben közel van az origóhoz, a másikban távol lesz). A színkód egy harmadik tulajdonságot, az átfedés mértékét mutatja. A bemenet átfedése pozitív, a kimeneten mért átfedés negatív.

8. táblázat. Az áreákra vonatkoztatott konvergenciafok korrelációi.

(A) Az áreák be- és kimeneti CD összegeinek korrelációs együtthatói (r) és lineáris illeszkedése különböző agykérgi hálózatokban. Bimodális: vizuo-taktilis hálózat. Hasonló eredményeket kapunk a CD átlagokra is (nem mutatjuk).

		Bimodális	Makákó	Macska
	Pearson	-0,922	-0,931	-0,913
Dal falas luvaduáns	r Spearman	-0,915	-0,912	-0,816
Dai ieiso kvauraiis	Kendall	-0,776	-0,782	-0,651
(o. abra)	Lineáris illeszkedés	0,462-0,922x	0,340-0,928x	0,955-0,903x
	Pearson	-0,700	-0,671	-0,577
Iabh alcá luvaduána	r Spearman	-0,674	-0,612	-0,562
JODD also Kvauralis	Kendall	-0,537	-0,482	-0,410
(o. abra)	Lineáris illeszkedés	-1,019-0,641x	-1,045-0,596x	-1,749-0,420x
(**B**) Kendall rang korrelációk az áreák transzmissziós indexe (Ti) (Kötter és Stephan, 2003), 1-es divergencia sugara (D1) (Costa és Sporns, 2005), az összevont CD origótól számolt távolsága a bal felső (bf) és jobba alsó (ja) kvadránsban (8. ábra) és a csúcs-köztiség (NB) értékek között a vizuo-taktilis hálózatban.

	Ti	D1	CDbf	CDja	NB
Ti	1	0.199	-0.096	0.014	0.027
D1	-	1	-0.431	0.161	-0.347
CDbf	-	-	1	-0.585	0.777
CDja	-	-	-	1	-0.653
NB	-	-	-	-	1

Kíváncsiak voltunk, hogy a CDn mennyire hasonló más centralitás mértékekhez, köztük olyanokhoz, amelyek a K/D-n alapulnak, mint pl. a transzmissziós index, ami az afferensek és efferensek számának különbségéből számolható (Kötter és Stephan, 2003) vagy Costa és Sporns (2005) divergencia mértéke.<sup>8</sup> A 8B táblázatban látható, hogy a CDn egyedül a NB-el korrelált erősen, a többi centralitás értéktől független mérőszámnak tekinthető.

A vizuo-taktilis hálózat a teljes kérgi hálózat egy részhálózata. Emiatt találunk az ismert hierarchiától való eltéréseket, mint pl. a V4 és VIP kiugróan magas, valamint az área 7a, az inzuláris (Ig, Id) és perirhinális kérgi (área 35, 36) struktúrák viszonylag alacsony szintű pozícióját (8. ábra). A korábbi eredményekhez képest további eltéréseket okozott az is, hogy az aktuális irodalmi adatok alapján kiegészített vizuo-taktilis hálózat több új összeköttetést tartalmazott, különösen a VIP esetén.

d. Kéreg-specifikus hálózati struktúra

A CDn eloszlása a különböző agykérgi hálózatokban (vizuo-taktilis, teljes rézusz majom és macska) nagyon hasonló volt (10. ábra). Ez alapján az anatómiai hálózatokra általában jellemző az elosztó tulajdonság mentén történő differenciáció, szemben a forrás tulajdonsággal, ahol az áreák értékei jobban átfednek és erősebben szóródnak az átló mentén. A két komplementer kvadránsban (bal alsó és jobb felső) az eloszlás hiperbolikus jellege arra utal, hogy ezekben a kvadránsokban, amelyek K/D szempontból tranzit funkciót reprezentálnak, a CD összegek nulla felé tendálnak, alátámasztva a másik két kvadráns biológiai fontosságát.

$$D_d(i) = \frac{n_{d+1}(i)}{h_d(i)}$$

<sup>&</sup>lt;sup>8</sup> Costa és Sporns (2005) divergencia mértéke:

ahol  $n_d(i)$  az i csúcs szomszédainak száma d távolságra, és  $h_d(i)$  az i központú és d sugarú körből kilépő és az ugyancsak i központú, de d+1 sugarú kör csúcsaiban végződő élek száma.



**10. ábra.** Az áreák be- és kimeneteinek CD összege a vizuo-taktilis (+), teljes rézusz majom (\*) és a teljes macska (x)

agykérgi hálózataiban. Az eloszlás a különböző agykérgi hálózatok esetén teljesen átfed.

Minden más általunk vizsgált hálózatot az agykérgitől jól megkülönböztethető, egyedi CDn eloszlás jellemez (11. ábra). A 11. ábrán mutatott példákon kívül igaz volt ez a Linux operációs rendszer hívási gráfjára és Róma úthálózatára is, melyeket itt nem mutatunk. A celluláris jelátviteli hálózat esetén a K/D nem tűnik lényeges hálózati funkciónak, hiszen a pontok az origó környékén csoportosulnak, a kevés kivétel elosztó funkciót mutat (11A ábra). Az Erdős-Rényi hálózat CDn ábráját leginkább egy viszonylag homogén eloszlású ponthalmaz jellemzi (11B ábra). A gyengén kirajzolódó agykérgi hálózatra jellemző mintázat árulkodik róla, hogy a vizuo-taktilis kéreg randomizált hálózatát látjuk. Más hálózatokban, így a Linux hívás-gráfban és az úthálózatban sok tranzit funkciójú elemet azonosítottunk.



**11. ábra.** A CD átlagok eloszlása (**A**) hippokampális piramissejt másodlagos jelátviteli molekuláris hálózatában és (**B**) az Erdős-Rényi random hálózatban. A 9. ábrához hasonlóan a színkód az átfedés index értéket mutatja. A bejövő oldal átfedése pozitív, a kimeneten mért átfedés negatív. A tengelyek a CD összegek be- és kimenetek számával normált értekeit mutatják.

## A kognitív kontrollért felelős agykérgi hálózat topológiája

Ebben a fejezetben 11 prefrontális és 3 frontális, motoros kérgi struktúra, összesen 14 área tulajdonságait vizsgáltuk a 71 áreát tartalmazó, akkori ismereteink szerinti teljes agykérgi hálózatban rézusz majomban (Sporns, 2002).

a. A hálózat jellemzése centralitás értékek alapján



12. ábra. Az áreák CD alapján számolt centralitása rézusz majom agykérgi hálózatában. (A) elosztó és forrás Az funkciókra jellemző konvergens (pozitív CD, szaggatott vonaltól balra) és divergens (negatív CD, szaggatott vonaltól összeköttetések jobbra) ellenkező irányú elrendeződése a primer vizuális (V1) és а prefrontális kérgi 46 áreák esetében a CD alapján azonosított két alhálózatban (6. ábra). (B) Az áreák beés kimeneteinek CD átlaga rézusz majom teljes agykérgi hálózatában. Az áreák hierarchia szerinti elrendeződése jól látható a CD centralitásuk alapján

történő sorba rendezéssel. Kék: bemenet, piros: kimenet, üres nyilak: V1 és área 46. \*: prefrontális kérgi áreák.

A csúcs-köztiség értékek részletes vizsgálatának eredményei alább kerülnek bemutatásra, annyit azonban érdemes elöljáróban megjegyezni, hogy eloszlása jól mutatja a különböző PFC struktúrák erősen eltérő centralitás értékeit (ld. alább 15C ábra, sötétszürke oszlopok). A változatos centralitásérték előre vetíti a PFC összetett szerepét a kérgi aktvitás szabályozásában. A prefrontális kéreg koordinációs szerepét az egyes áreák K/D tulajdonságai segítségével vizsgáltuk a hálózatban (12. ábra). dc\_1938\_21

A CD segítségével az áreák kétféle tulajdonsága különböztethető meg, amit a 12A ábra szemléltet. A prefrontális área 46 a konvergens kimenetekkel és divergens bemenetekkel rendelkező elosztó áreák jó példája, míg az elsődleges vizuális kérgi V1, amire konvergens bemenet és divergens kimenet jellemző a forrás típusú áreák közé tartozik. A csúcs-köztiség értékekhez hasonlóan az egyes prefrontális áreák K/D tulajdonságai erősen különböztek egymástól, ami az agykérgi hálózat többi struktúrájához hasonlóan a PFC differenciált koordinatív funkciójára utal (12B ábra).

A FEF az área 46-hoz hasonló információ elosztó jellegű csomópont a hálózatban (13A ábra, vö. 8. ábra). A CD átlagot tekintve a többi PFC-área ezzel ellentétben inkább a forrás struktúrákra jellemző be- és kimenettel bírt (13A ábra). Ez legkifejezettebben a 9 és 32 áreák esetében teljesült. Ugyanakkor área 24 esetén a viszonylag kis átlagos CD értékek azt jelzik, hogy be- és kimeneteit eltérő konvergencia tulajdonságú élek alkotják. Ezek az eredmények a prefrontális kérgen belül az egyes áreák funkcionális specializációjára utalnak, amit a 13B diagram szemléltet az áreák be- és kimeneteinek előjel szerinti CD összegei alapján. A bal felső kvadránsban az origótól távol láthatók a meghatározó elosztó szereppel bíró área 46 és FEF, míg a jobb alsó kvadránsban, szintén távol az origótól, az elsődlegesen információ forrásnak tekinthető 9 és 32-es áreák. Ugyancsak megfigyelhető az área 24 kevert konvergens és divergens ki- és bemeneteinek köszönhető átmeneti jellegű funkciója.



**13. ábra.** A prefrontális kérgi áreák specializációja CD centralitásuk alapján rézusz majom agykérgi hálózatában. (**A**) Frontális kérgi áreák CD átlag szerinti rangsora. Sötétszürke: bemenet, halványszürke: kimenet. (**B**) A prefrontális kérgi áreák eloszlása be- és kimeneteik CD összegei szerint. Horizontális tengely: bemenet, vertikális tengely: kimenet, pontozott vonal: nulla értékek helyét jelöli. A bal felső és jobb alsó kvadránsokban megfigyelhető az áreák átló mentén történő eloszlása.

Vizsgáltuk a bemeneti és célterületek közötti átfedés (O<sub>d</sub>) meglétét, mint annak mutatóját, hogy a kognitív kontroll funkciókban szerepet kapnak-e PFC által létesített poliszinaptikus körök a kérgi hálózatban. Rézusz majom teljes agykérgi hálózatában az O<sub>d</sub> az élek 20%-ában nagyobb volt nullánál (14A ábra). Ezen átfedéssel bíró neurális körök harmadát a PFC létesítette (14A ábra). Továbbá, a PFC által létesített körök 16%a a prefrontális áreák között létesült (14A ábra). Összehasonlításként, a teljes hálózatban a PFC kapcsolatok aránya 0,28 volt, amelynek 21%-a bizonyult körnek (O<sub>d</sub> > 0) (14B ábra). Az átfedés mértéke kicsi volt, 1 vagy 2 área, egy kivétellel, ahol 5 área alkotta. Ugyancsak rövid volt a neurális körök hossza (az élek számában kifejezve), általában 1 (direkt összeköttetés), ill. három esetben 3. Mindez cáfolja a poliszinaptikus körök lényeges szerepét a PFC funkcióiban.



14. ábra. Az átfedő bemeneti, és célterület halmazokkal rendelkező összeköttetések (kör-élek) aránya rézusz majom agykérgi hálózatában. (A) össz.: a kör-élek aránya a teljes hálózatban, PFC átf.: a prefrontális áreák által létesített kör-élek aránya összes az poliszinaptikus kör számához képest a teljes hálózatban, PFCben: а prefrontális áreákat összekötő élek között a kör-élek aránya. (B) össz. PFC: a PFC összeköttetéseinek aránya a teljes hálózatban, átf. PFC: a PFC kör éleinek aránya az összes PFC által létesített összeköttetéshez képest.

#### b. A hálózat jellemzése a csoportstruktúra alapján

Fuzzy klaszterezést alkalmaztunk a PFC csoportstruktúrájának feltérképezésére. Hat klasztert azonosítottunk a teljes hálózatban, melyek közül az áreák elköteleződése alapján a 2-s számú volt a legnagyobb méretű (47 a 71 áreából), akárcsak a PFC-ben, ahol mindegyik área köthető volt ehhez a klaszterhez (9A táblázat). Csak a PFC-áreákat figyelembe véve kitűnik a 2-s klaszter arányosan nagy mérete (15A ábra). Ezzel szemben a teljes hálózatban a klaszterméretek eloszlása egyenletesebb volt és a 2-s klaszter relatív mérete kevésbé volt kiugró értékű (15A ábra). Ezek az eredmények a PFC-áreák teljes hálózathoz viszonyított viszonylag nagy részvételét mutatják a 2-s klaszterben. Az egyes áreákra nézve a 46, 9, 10, 24, 25 és 12 legnagyobb mértékben a 2-s klaszterhez kötődött, ez volt a domináns klaszterük. Ugyanakkor a PFC-áreák mindegyike kötődött mind a hat klaszterhez (9B táblázat), bár a 2-s klaszterhez legjobban kötődő 6 PFC-área fele, nevezetesen a 46, 9 és 24 más klaszterhez csak kis mértékben asszociált (9B táblázat).

## 9. táblázat. A fuzzy klaszterezés eredménye.

(A) Fuzzy klaszterezéssel kapott csoportok (klszt.) száma és mérete. Totál: rézusz majom teljes kérgi hálózata 71 áreával, PFC: 10 prefrontális área (ld. "össz.", mint sor összeg).

KLSZT.	1	2	3	4	5	6	ÖSSZ.
TOTÁL	16,21	21,14	10,49	8,10	9,42	5,63	71
PFC	0,68	5,24	0,61	0,39	1,23	1,84	10

**(B)** A 10 PFC-área klaszter-elköteleződésének fuzzy klaszterezéssel meghatározott értéke (rel. klszt<sup>1</sup>).

ÁREA	FEF	A46	A24	A9	A32	A25	A10	A45	A12	A11
REL. KLSZT.	2,5	1,3	1,4	1,6	3,0	3,6	2,9	5,2	2,5	3,8

<sup>1</sup>Az adott áreához tartozó fuzzy klaszter vektor (ami megadja, hogy melyik klaszterbe mekkora mértékben tartozik) delogaritmált entrópiája. (Szumma p\_i \* log(p\_i), ellentettje, amit egy 2-vel való hatványozás kitevőjébe írunk.) Ez a "releváns klaszterek száma", pl. egy [1, 0, 0, 0, 0] alakú vektorra 1, egy [0.5, 0.5, 0, 0, 0, 0] alakú vektorra 2, egy [0.25, 0.25, 0.25, 0.25, 0, 0] alakú vektorra 4 stb.

A PFC-ben a FEF 9,4-s, fokszámmal korrigált hídság értéke (ld. A.I.2.a fejezet) a klaszterek közötti kommunikációban játszott meghatározó szerepét mutatta (15B ábra). A FEF mellett híd áreáknak tekinthetők a 10, 25 és 12 is (15B ábra). Ezzel szemben az área 46 és 24 kis hídság értékkel bírt. Érdemes rámutatni a klaszterelköteleződés és a hídság ellentétes viszonyára. Összehasonlítottuk a 2-s klaszterben szereplő áreák és a PFC-áreák centralitás értékét a hálózatban (15C ábra). Fontos megjegyezni, hogy a 2-s klaszterben magas szintű aszociációs kérgi áreák szerepeltek (15C ábra). Az öszehasonlításhoz a NB értékeket használtuk, mert erősen korrelál a CDn-el (8B táblázat). A 2-s klaszterben 12 área értéke esett a felső kvartilisbe, ebből kettő, a 46 és FEF volt PFC-área (15C ábra). A 12 legnagyobb NB értékű área közül 9-nek a 2-es volt a fő klasztere, közülük egy, az área 46 tartozott a PFC-hez. A második legnagyobb NB indexszel rendelkező PFC-área, amelynek ugyancsak a 2-s volt a fő klasztere, az área 24 volt (15C ábra). A többi PFC-área kis NB értékkel bírt.



**15. ábra.** A PFC-áreák klasztereződése és centralitása rézusz majom teljes agykérgi hálózatában. (**A**) A fuzzy klaszterezéssel kapott csoportok méretének eloszlása. Az összehasonlíthatóság miatt a klaszterek méretét az összegekkel (9. táblázat) normalizáltuk. Szürke oszlopok: rézusz majom teljes kérgi hálózata, fekete: PFC-áreák hálózata. (**B**) A prefrontális kérgi áreák fokszámmal korrigált hídság indexe (fok x híd). Az áttekinthetőség miatt a FEF áreát aránytalanul nagy értéke (9,4) miatt kihagytuk az ábrázolásból. (**C**) A legnagyobb 2-s klaszter áreáinak csúcsköztiség centralitás-eloszlása. Sötétszürke oszlopok: PFC-áreák, árnyékolás: azon áreák, amelyek domináns klasztere a 2-s volt, szaggatott vonal: felső kvartilis.

# B. Az áreán belüli és áreák közötti interakciók funkcionális anatómiája populáció szinten a szomatoszenzoros kéregben

Az előző fejezetben az agykérgi hálózat nagyléptékű szerveződésének kérdéseivel foglalkoztunk. Azonban, az áreák és összeköttetések egyetlen csúcs, ill. élként való reprezentációja rengeteg lényeges tulajdonság elhanyagolásával jár, hiszen az áreák maguk is összetett, több szinten szerveződő struktúrák, sok idegsejt által létesített bonyolult kapcsolatrendszerrel. Az agykérgi hálózat alaposabb megismerése céljából meghatározott lokalizációval jellemezhető, kérgi oszlop méretű idegsejt populációk összeköttetésein keresztül tanulmányoztuk mókusmajomban az SIben.

## I. Az összeköttetések szomatotópiája

# 1. A kéz<sup>9</sup> reprezentáció szomatotópiája és az área határok azonosítása

A kéz reprezentáció feltérképezéséhez intrinzik optikai jelet (IOS) és elektrofiziológiai méréseket alkalmaztunk. Ezek eredményei egymással és az irodalomból ismert eredményekkel megegyeztek (Chen és mtsi., 2001, 2003; Friedman és mtsi., 2008). Minden egyes állatban három-négy ujj reprezentációját térképeztük fel, melyek latero-mediális lokalizációja jól azonosítható volt mind az área 3b és área 1-ben (16A-C ábra). Ezzel szemben a disztális, mediális és proximális ujjbegyek reprezentációja rostro-kaudális elrendeződést mutat úgy, hogy a két área közötti határtól legtávolabb helyezkednek el a disztális ujjbegy reprezentációk és a határvonal közelében a proximálisak (16D-F ábra). Elektrofiziológiai mérésekkel az egyes ujjak reprezentációjának további részleteit azonosítottuk (16G ábra). Korábbi eredményeket reprodukálva kimutattuk, hogy a receptív mező (RF) área 3b-ben egy ujjra lokalizálható és kisebb, mint área 1-ben, ahol több ujj ingerlésével is aktiválható egy-egy neuron (cf. Friedman és mtsi., 2008). Ugyancsak az elektrofiziológiai méréssel azonosítottuk a RF inger szelektivitását, mint pl. mechanikai vagy hő, ill. gyorsan vagy lassan adaptálódó válaszok (utóbbiakat az ábra nem mutatja). Összegezve, área 3b és área 1-ben a szomszédos ujjak reprezentációja az área határral nagyjából párhuzamos, míg az egyes ujjbegy-reprezentációk az área határra tükör-szimmetrikusan lokalizálódnak. Ez az elrendeződés tette lehetővé az áreákat elválasztó határok azonosítását.

<sup>&</sup>lt;sup>9</sup> A mókusmajmoknak szembefordítható hüvelykujjuk van, de precíziós fogásra nem, csak markolásra képesek. [Costello, M.B., Fragaszy, D.M. (1988), Prehension in *Cebus* and *Saimiri*: I. Grip type and hand preference. Am. J. Primatol. 15: 235-245. doi:<u>10.1002/ajp.1350150306</u>]

Az área határok azonosítása a szomatotópián kívül az idegsejtek inger szelektivitása alapján történt. SI-ben a tükörszimmetrikus vetülés miatt az área 3a/3b határ a disztális ujjbegy reprezentációk között, míg área 3b/1 határ a tenyér reprezentáción keresztül húzódik. Área 3b és 1-ben a taktilis ingerekre adott erőteljesek idegsejt válaszok jól meghatározható topográfia mentén változtak. Área 3b és 1 között lényeges volt a fent már említett különbség a RF méretben. Área 3a-ban az idegsejtek főleg mély receptorok hosszantartó ingerlésére, valamint az ízületek passzív mozgatására válaszoltak. E választulajdonságok segítségével az área 3a, 3b és 1 közötti határok megbízhatóan azonosíthatók voltak. M1-ben és área 2-ben csupán durva szomatotópiás vetülés, nagy RF-k és az ujjak felszínes taktilis és mély ingerlésére, ill. passzív mozgatására adott kis és/vagy kevert idegsejt válaszok voltak jellemzők. Ezért az área 3a/M1, valamint área 1/2 közötti határok meghatározása kevésbé volt egyértelmű, mint a többi esetben.

A kéz reprezentációjának feltérképezését követően pályajelöléssel vizsgáltuk a funkcionális térképen a neuronális összeköttetések eloszlását. Vizsgálatainkat a tapintás szempontjából kiemelkedő jelentőséggel rendelkező disztális ujjbegy reprezentációra korlátoztuk. A neuronális összeköttetések kimutatására a mind anterográd, mind pedig retrográd irányban transzportálódó BDA-t használtunk.



**16. ábra.** Funkcionális szomatotópiás térképek a szomatoszenzoros kéregben. A kéz reprezentációja az egyes ujjak vibrotaktilis ingerlésével kiváltott intrinzik optikai jel (IOS) mérésével készült felvételeken (sötét foltok) (**A-F**), valamint az ujjak és a tenyér hasonló ingerlésével kiváltott elektorfiziológiai térképen (**G**). (**A-C**) A 2. ujj (D2) és 4. ujj (D4) disztális ujjbegyének szomatotópiás reprezentációja az área 3b- és área 1-ben. A vörös nyilak azonosítási pontokat jelölnek. Laterális irány balra, ss felfelé. (folyt.)

Mindkét áreában látható a két ujjbegy lokalizációjának medio-laterális irányú különbsége. (**D-E**) a D4 disztális, középső és proximális ujjbegyének ingerlése área 3bben (vörös szaggatott vonaltól balra) és área 1-ben (vörös szaggatott vonaltól jobbra). A két área közti határt vörös szaggatott vonal jelzi. Laterális irány a kép alja felé, rostrális balra. Az ujjak área határra szimmetrikus reprezentációját mutatja az egyre disztálisabb ujjbegyeket reprezentáló aktivitás-foltok elkülönülése. (**G**) Elektródával mért sejtaktivitás szelektivitása a kéz különböző részeinek ingerlését követően az agyfelszíni értérképen. Megfigyelhető, hogy área 3b-ben a receptív mező (RF) egyetlen ujj meghatározott részére lokalizálódik, míg área 1-ben ugyanazon neuron több ujj ingerlésre is válaszol (pl. d1t/d2t). Az ujjak jele mellé írt t, m és p jelentése: disztális, mediális és proximális ujjbegy; thn: hüvelykujj párna; hyp: hüvelykujj párna alatt; jt: ízület; palm: tenyér; w. csukló; dp: mély receptor; cutan: bőrreceptor; heat: hőérzékeny. Pontozott vonal: área határok, m: mediális, p: posterior. Méretarány: 1 mm. Méretarány (C)-n érvényes (A) és (B)-re, (D) méretaránya alkalmazható (E) és (F)-re.

## 2. A BDA-jelölés jellemzése

Az egyes metszeteken a beadási helyet egy 250-400 µm átmérőjű erős, homogén denzitású mag régió és e körül BDA-jelölt axon és dendrit nyúlványokat, valamint perikaryonokat nagy sűrűségben tartalmazó gyűrű jellemezte (17A,B,E ábra). Esetenként ettől a mintázattól kis eltérést tapasztaltunk. V-ben (área 3b beadás) a hosszabb túlélési idő (20 nap szemben a többiek esetében tartott 10-16 nappal) miatt a beadási hely kisebb intenzitással festődött (17D ábra). M és P-ben (área 1 beadás) a magot övező gyűrű régiót nem vagy nehezen lehetett azonosítani (17D,E ábra). A BDA-beadás mélysége szintén egyedi eltéréseket mutatott: área 3b beadások többségében a felső rétegekre lokalizálódott (2/3 állat), míg área 1 beadások esetén 2 állatban a teljes kérgi mélység jelölődött (17D,E ábra). A mag régióban a BDA direkt módon az injekcióval is bejuthatott az idegsejtekbe, ami különösen az átfutó rostok és a retrográd jelölés esetén problémássá teszi az afferentáció lokalizációjának pontos meghatározását. Ezért a mag régiót a BDA-jelölés eloszlásának elemzéséből kihagytuk.

A mag régió az összes esetben magába foglalta a szupragranuláris és szemcsés rétegeket, de área 1 beadások, különösen Mo és P esetében a mélyebb infragranuláris rétegekbe is kiterjedt (10A,B táblázat).

Átnézeti képeken a BDA transzportja több sűrűsödést eredményezett a beadási helytől akár több milliméterre (17C ábra). Ez a mintázat különösen szembetűnő volt az injektált áreán belül, de nagyobb, lazább szerkezetű foltok a szomszédos áreákban így 3a, área 2 és M1-ben is azonosíthatók voltak.



17. ábra. BDA-jelölés. (A,B) A beadási hely fénymikroszkópos képe egy-egy reprezentatív esetben az área 3b (A, Mc) és az área 1 (B, Mo) beadásokból. A (B) ábrán a beadási hely mag régióját a belső kör, körülötte a gyűrűt a nagyobb kör határolja. Nyíl: jelölt idegsejt. (B) felvétel orientációja megegyezik (A)-val. (C) A BDA-jelölés eloszlásának panoráma képe 520 μm-el a felszín alatt, az alsó-középső rétegekből származó metszeten área 3b beadást követően (BDA). Az inverz képeken (A,C) jól látható a jelölődés foltos eloszlása a beadástól távoli területeken is. Rostrális irány fent, mediális jobbra. D2t, D4t: 2. és 4. ujjak disztális ujjbegye, A1/A2: área 1 és 2, szaggatott vonal: határ área 3b és 1 között, CS: centrális sulcus. (D,E) BDA beadási helyek fénymikroszkópos képei (D) a grafikus rekonstrukciókon (E) csillaggal jelölt metszetekről a 6 kísérleti állatban. A mag és gyűrű régiók laterális kiterjedését a fekete és szürke színezés mutatja a metszetsorozaton keresztül. A szúrcsatornát világos pont jelzi. Az área 3b beadások a felső sorban, az área 1 beadások az alsó sorban láthatók. A számok azon legfelső és legalsó metszetek agyfelszíntől mért mélységét mutatják, amelyeken a BDA-beadás egyértelműen azonosítható volt. Megfigyelhető, hogy área 1 beadás esetén a mag régió 2 állatban (P és Mo) a teljes metszetsorozaton követhető volt. Méretarány: 250 μm (A,B), 1 mm (C) és 200 µm (D,E).

A BDA az idegsejtek apró részleteit is jelölte beleértve nemcsak a közeli, de a vékony, távoli nyúlványokat (18. ábra). Retrogád transzporttal elsősorban a tüskés

dendritű piramissejtek jelölődtek (18A ábra), melyeken az apikális dendrit gyakran vált láthatóvá a fókusztávolság változtatásával a horizontális metszetsíkon. Sima dendritű neuronok csak kis számban jelölődtek, ezek eloszlását nem tanulmányoztuk. A BDAjelöléssel jól azonosíthatóvá váltak a dendritek és axonok, valamint azok kisebb struktúrái, a dendrittüskék és boutonok (18B ábra). Az axonokat a dendritektől megkülönböztette a vékonyabb méret, kanyargósabb lefutás, a dendrittüskékhez hasonló, de kisebb, nyélen ülő boutonok, melyek viszonylag ritkák voltak a sűrűn látható varikozitásokhoz képest (18B,F ábra).

Az anterográd axon jelölés 3 formáját különböztettük meg: 1) terminális axon arborizációs foltok (továbbiakban axonfoltok) (18C ábra). Az axonfoltokat nagyszámú boutont formáló, vékony axon ágak sűrű szövedéke alkotta (18D ábra). Az axonfoltok kitüntetett figyelmet kaptak vizsgálatainkban, mert ezek lokalizációja a beadási hely specifikus efferens területeit azonosítja. 2) Laterális (agyfelszínnel párhuzamosan futó), távoli vetítő, viszonylag egyenes lefutású, vastag és sima rostok, melyeken varikozitások vagy nyélen ülő tüske-szerű boutonok nem láthatók (18E ábra). 3) Ugyancsak oldalirányú, távoli vetítő, de boutonokat formáló, az előzőnél vastagságát tekintve változatosabb, de javarészt vékony és kanyargós lefutású axonok (18F ábra).

**10. táblázat**. A BDA beadás jellemzői. Az értékek µm-ben értendők. Az üvegkapillárisok átmérői beadás után mért belső átmérőre vonatkoznak. A beadási mélység az injekcióhoz hasznát mikromanipulátorral az agyfelszíntől mért érték. A mag régió átmérőjét azon a metszeten határoztuk meg, ahol legnagyobb volt a kiterjedése, ill. legintenzívebben festődött. Mag mélység: a metszet mélysége a sorozatban, ahol a mag a legnagyobb kiterjedést mutatta. A beadási és a mag mélység különbsége az agy pulzálásából és duzzadásából adódott.

(A) Área 3b beadás.

Állat	Elektród hegy átmérő	Beadási melység	Mag átmérő	Mag mélység
Mc	12	350	260	260
V	~20	350	380	390
J	~15-17	350	330	260-390

# (**B**) Área 1 beadás.

Állat	Elektród	Beadási	Mag	Mag
	hegy átmérő	melység	átmérő	mélység
Μ	30	350, 750	313	320
Mo	10	350, 750	295	160-800
Р	10	350, 750	403	160-800



**18. ábra.** Retrográd és anterográd BDA-jelölés. (**A**) Retrográdan jelölt piramissejt tüskés dendrit ágakkal. (**B**) BDA-jelölt horizontális axon (nyilak) és tüskés dendrit (nyílhegy) ágak. (**C**) Manuálisan körülhatárolt (halvány kontúr) anterográd jelölt terminális axon arborizációs folt kis nagyítású, inverz képe. (**D**) Axonvégződési folt nagy nagyítású inverz képe másik példán. Látható a boutonokat képező, vékony, távoli axon elágazódások gazdag hálózata. (**E**) Fordított Y alakú, vastag, sima, área 3b és área 1 között futó axon nyúlvány kis nagyítású, inverz képe. A viszonylag egyenes lefutású axon határozottan különbözik a (B), (D) és (F) képeken látható, boutonokkal gazdagon díszített axonok kanyargós megjelenésétől. (**F**) Hosszú lefutású, boutonokat képező, horizontális axonszálak. Nyílhegy: varikozitás tüske-szerű axonvégződéssel, nyilak: axonális varikozitások. Méretarány: 25 μm.

#### 3. A szomatotópiás és az anatómiai térképek illesztése

A szomatoszenzoros kérgi összeköttetések szelektivitásának és funkciójának megértéséhez alapvető feltétel volt a különböző strukturális (pályajelölés) és funkcionális (IOS, elektrofiziológia) térképek pontos illesztése. Ezt elsősorban az agyfelszíni érmintázat alapján végeztük el. Az IOS és elektrofiziológiai mérés az agyfelszínre vetítve jelenítette meg a szomatotópiát és más RF tulajdonságok lokalizációját (19A-C ábra). A hisztológia során ugyanakkor a kiválasztott kérgi területet kimetszését követően le kellett metszeni, majd az egyes feldolgozott metszetek egészéről panoráma képeket készítettünk (pl. 17C ábra). A mélyebb tangencionális metszeteken szinte csak a felszínre függőlegesen futó erek keresztmetszetei azonosíthatók szemben az agy felszínén, a lágy agyhártyában futó horizontális érmintázattal (19A-C,E ábra). A szomszédos metszetek illesztéséhez ilyen, a sorozaton vagy annak egy részén követhető érkeresztmetszeteket használtunk, kiegészítve egyéb tájékozódási pontokkal, mint a BDA injekció, és az esetlegesen látható wolfram elektróda szúrcsatornái. A párosával összeillesztett metszet sorozatot a felszínről gyűjtött vastag, 100 µm-es metszetek alapján rekonstruált agyfelszíni horizontális érhálózat segítségével tudtuk a funkcionális térképekkel összeilleszteni (19D ábra). Ehhez előtte azonos méretűre nagyítottuk/kicsinyítettük az agyfelszínről készült képet és a metszetek panoráma képeit. Az illesztéshez további fontos támpontot jelentettek a felszínen futó erek mélybe forduló ágai, amelyek keresztmetszetei a mélyebb metszeteken azonosíthatók voltak (19A,D,E ábra). A folyamat végeredménye, az agyfelszínre illesztett Neurolucida rekonstrukciók egy példája a 19F ábrán látható.

Az eredmények kiértékeléséhez fontos ismerni az illesztés pontosságát. Ennek egy reprezentatív példája a 19F ábra mutatja. Az illesztés pontosságát részben a mélyebb metszek érkeresztmetszeteinek és az agyfelszíni fotón a mélybe forduló erek helyének illeszkedésével ellenőriztük. Az illesztés pontosságának meghatározását, ill. magát az illesztést a beadási helyen, és az elektród penetrációk által helyenként okozott szúrcsatornák is segítették, amiket szintén jelöltünk az anatómiai térképezés folyamán. A metszetek és funkcionális térképek illesztésének pontossága 10 μm, ill. néhány 10 μm körül volt. A legnagyobb pontatlanságot, 150 μm, a sorozatmetszetek szélén található struktúrák esetében mértük, de ilyen távolságban nem végeztünk méréseket. Amint a 19F ábrán látható, a beadási hely körüli illesztés pontosságát az illesztéshez tájékozódásul használt struktúrákat jelző szimbólumok szinte tökéletes átfedése mutatja. A követhetőek voltak a sorozaton és majdnem tökéletesen egymáshoz illeszthetőek. A beadási helytől távol az illesztéshez használt struktúrák nem minden esetben fedtek át. Fontos megjegyezni, hogy ebben szerepet játszhat az is, hogy az illesztésnél figyelembe vett vérerek lefutása az agyfelszínre nem teljesen merőleges és nem is teljesen egyenes, hanem kanyarokat is képeznek. Azt is fontos megjegyeznünk, hogy a kihagyások miatt nem a közvetlenül szomszédos metszeteket illesztettük, ami további pontatlanságot eredményezhet a fenti, ill. a szövetben természetesen előforduló más strukturális változások miatt (pl.: érvastagság, neuropil állomány, idegsejtek száma). Összességében a 10 µm körüli pontosságot a populációs szintű szerveződést vizsgáló méréseinkhez megfelelőnek találtuk. Fontos megjegyezni azt is, hogy a hisztológiai procedúra során alkalmazott technikák, különösen a blokkok enyhe nyomás alatt történő utófixálása tapasztalataink szerint nem okozott a mérésekkel összeegyeztethetetlen torzulásokat.



**19. ábra.** A szomatotópiás térképek és a BDA-jelölés illesztése M esetében (área 1 beadás). (**A**) Az agyfelszín képe az erekkel és elektrofiziológiai mérőpontokkal (színes körök). Fekete körök jelölik az illesztéshez használt, mélybe forduló felszíni erek ágait. Kék nyíl: beadási hely, m: mediális, p: posterior. (**B**) Intrinzik optikai jel: ingerlés nélküli spontán működési (blank) állapot. (**C**) A D2 ujjbegy ingerlés intrinzik optikai jele (sötét foltok) área 3b-ben és área 1-ben (fehér nyíl). (**D**) BDA-jelölés metszetsorozatának egymásra illesztett inverz felvételei a beadás környékéről, és ennek illesztése az erekről készült agyfelszíni képpel. A zöld és piros körök az illesztéshez használt ereket jelölik, a kék nyíl a 2. ujj disztális ujjbegy reprezentációját. (**E**) BDA beadás és jelölődés (folyt.)

fénymikroszkópos képe az illesztéshez használt erek keresztmetszetivel (fekete körök) egyetlen metszeten. A beadási hely és közvetlen környezete sötét foltként jelenik meg. A metszet felső szélén látható a centrális sulcus laterális vége. (**F**) A retrográdan jelölt neuronok eloszlása (sötét zöld körök), az elektrofiziológiai térkép és az agyfelszíni értérkép illesztése. Kék négyszögek: erek keresztmetszetei, piros négyszögek: elektróda szúrcsatornák, világos zöld és piros körök: elektrofiziológiai mérőpontok, nyílhegyek: az illesztéshez használt erek keresztmetszetei a beadási hely körül, nyilak: az illesztéshez használt struktúrák beadási helytől távol. A többi jelölés és felirat megegyezik a 16. ábráéval. Megfigyelhető, hogy a beadási hely közelében gyakorlatilag tökéletes illeszkedést kaptunk, attól távolabb a pontosság csökken (nyilak) és csak nagyobb távolságra válik pontatlanná (üres nyíl). Méretarány (D)-n 1 mm, mindegyik panelen alkalmazható.

## 4. Az área 3b összeköttetéseinek eloszlása

A beadási hely pontos lokalizációja lényeges az összeköttetések laterális eloszlásának meghatározásához. A disztális ujjbegy reprezentációk IOS-térképe, valamint a BDA injekciók pontos helye és mérete a 20. ábrán látható. Área 3b-ben a BDA beadás mindhárom esetben a D2 disztális ujjbegy reprezentáció kis területére terjedt ki. Egy esetben a beadás a D2 disztális ujjbegy reprezentáció azon régiójába esett, ami átfed a D3 disztális ujjbegy reprezentációjával (20C ábra). Egy esetben, V-ben (20A ábra) a szúrcsatorna viszonylag nagy és jól követhető volt, míg más esetekben alig lehetett nyomát találni. V-ben a szúrcsatorna közvetlenül egy vertikálisan futó ér mellett haladt és feltehetően megsértve azt kis vérzést okozhatott. Ennek nyoma látható volt az üveg kapillárison, és mint alább ismertetésre kerül eredményeink szempontjából elhanyagolható mértékben, de a BDA transzportra is hatással volt (21A ábra).

A BDA-jelölés horizontális eloszlása a három esetben hasonló volt: erőteljes retrográd jelölődés a beadási hely 1-2 mm-es környezetében és ettől távolabb a jelölt idegsejtek csoportosulása mind medio-laterálisan és rostro-kaudálisan (21A ábra). Az área 3b bemenetét képező áreákban a jelölt idegsejtek egyetlen sűrű klasztert képeztek, ami legszembetűnőbben área 1-ben volt megfigyelhető.

Ugyancsak erőteljes anterográd jelölődés látszott a beadási helytől mediolaterálisan és rostro-kaudálisan (21B ábra). BDA-val jelölt horizontális vetítő rostokat azonosítottunk áreán belül, valamint az área 3b által innervált áreákban, így área 1-ben. Hasonló eloszlást mutattak az axonfoltok, melyek áreán belül medio-laterális irányban szóródtak, míg rostro-kaudálisan az área 3b által innervált áreákban, különösen área 1ben erőteljesen csoportosultak, úgy, mint a retrográd jelölődés esetén.



**20. ábra.** A BDA injekció kiterjedése és lokalizációja a kéz reprezentáció területén área 3b beadást követően az egyes esetekben (V, J, Mc). (**A-C**) A disztális ujjbegy reprezentáció IOS-térképei (fekete körvonalak) área 3b-ben és área 1-ben. A BDA beadás helyét fehér közepű kör jelzi. Pontozott vonal: areák közötti határ. (**D-F**) A BDA beadás szövettani metszeteiről készült inverz képek illesztése az IOS-al azonosított, beinjektált disztális ujjbegy reprezentációval (fekete körvonalak). A szúrcsatorna és a mag régió lokalizációját a fehér közepű kör mutatja. A BDA injekció méretét a mag körüli gyűrűvel a nagyobb, pontozott vonalú kör jelöli. D1-4: 1-4 ujjak. r: rostrális, m: mediális. Méretarány: 1 mm (A-C) ábrákon és 250 μm (D-F)-en.

Egyedek közötti eltérések leginkább a BDA-jelölés erősségében mutatkoztak. A V esetében tapasztalt kiugróan erős retrográd jelölést a hosszabb túlélési idő (20 nap szemben J és Mc 10, ill. 14 napjával) mellett a valamivel nagyobb BDA beadás is okozhatta (10A táblázat). A jelölt rostok és axonfoltok számának különbségeit feltehetően az eltérő időtartamú túlélés eredményezte. Az axonfoltok erőteles jelölődéséhez eredményeink szerint kellő hosszúságú, legalább 14 napos túlélési idő szükséges. Ugyanakkor a túlzottan hosszú 20 nap körüli túlélési idő a vetítő rostok kiürülését eredményezheti. Ez magyarázza, hogy V-ben erős axonfolt jelölés mellett gyenge volt a rostok jelölődése, míg J-ben ennek ellenkezője látszott. A BDA-jel Mc-ben mondható optimálisnak, ahol a rostok és az axonfoltok egyaránt jól jelölődtek.



**21.** *ábra.* A retrográd és az anterográd BDA-jelölés horizontális eloszlása a három különböző esetben (V, J, Mc) área 3b beadást követően. (**A**) Minden fekete szimbólum egy retrográd jelölt idegsejtnek felel meg. A BDA injekció helyét fehér pont jelzi. (**B**) Anterográd jelölt axonok (színes vonalak), valamint terminális axon arborizációs foltok (zöld körvonal) rekonstrukciói. Az intrinzik, áreán belüli összeköttetések többnyire latero-mediálisan futnak (kék vonalak), míg az áreák között az axonok az área határokat átlépve főleg rostro-kaudálisan (piros vonalak). Szaggatott piros vonalak: área határok, fekete pont: BDA beadás helye. Az Mc-n megadott méretarány mindegyik sorozatmetszeten 1 mm-t jelöl.

a. Afferens területek: retrográd sűrűségtérképek áreán belül és áreák között

A disztális ujjbegy reprezentáció legfontosabb afferentációját a retrográd jelölt idegsejtek legnagyobb sűrűsége alapján határoztuk meg. A Voronoi-sűrűségtérképek jól reprezentálják a retrográd jelölés eloszlására vonatkozó fenti megfigyeléseinket az áreán belüli afferentáció medio-laterális orientációjáról, valamint, hogy a szomszédos áreákból az afferentáció egy viszonylag jól körülhatárolható területről ered (22. ábra). A Voronoisűrűségtérképek azonban túlságosan részletgazdagok voltak, ezért az afferentáció eredetének pontos meghatározásához további feldolgozásra volt szükség.



**22. ábra.** A retrográd jelölés sűrűségének ábrázolása Voronoi-cellák segítségével a kérgi felszínre vetítve. (**A-C**) Voronoi-sűrűségtérkép área 3b beadást követően a három esetben (V, J, Mc). A Voronoi-cellákat területeik logaritmusa szerint szürkeárnyalat jelöli (sötétebb árnyalat kisebb terület). Pontozott vonal: área határok. A fehér kör a BDA beadás körüli 300 μm átmérőjű terület, amit az elemzésből kihagytunk. Rostrális irány fent, mediális jobbra. Méretarány: 1 mm.

A Voronoi-cellákból átlagtól való eltérésük alapján, szórás (SD) egységenként színezve kapott sűrűségtérképet az IOS-térképpel illesztve határoztuk meg a fontos afferens területeket (23. ábra). A vizsgált kérgi terület legerősebb afferentációját lokálisan, a beinjektált ujjbegy reprezentációból kapja (1-3 SD az átlag felett). Emellett erőteljes retrográd jelölődést azonosítottunk a vizsgálttal szomszédos disztális ujjbegy reprezentációkban (D1-ben is, aminek laterális lokalizációja az ismert szomatotópia alapján kikövetkeztethető J és Mc-ben is). A távolabbi ujjak (D4-el kezdődően) reprezentációi viszonylag gyenge, 2-3 szórás egységgel kisebb afferentációt produkáltak, mint a szomszédosak. Kaudálisan az ujj középső-proximális részének reprezentációja szintén viszonylag erősen jelölődött.

A szomszédos áreák közül az área 1-el létesített összeköttetéseket vizsgáltuk alaposan. Az IOS és sűrűségtérképek illesztése megmutatta, hogy áreák között az afferentáció homotóp eredetű, azaz elsősorban a vizsgált disztális ujjbegy reprezentációjából indul. Mc esetében ez a D3 disztális ujjbegy reprezentáció volt, ami azzal magyarázható, hogy a BDA beadás a D2 és D3 reprezentáció átfedése miatt feltehetően utóbbi afferentációját jelölte erősebben. Ezt a magyarázatot alátámasztja, a viszonylag erős jelölés a D4 disztális ujjbegy reprezentációban Mc-ben, szemben a másik két esettel. V-ben, ahol nem kaptunk értékelhető IOS-térképet área 1-ben, a legerősebb jelölődés J és Mc-hez hasonlóan lokalizált volt és az ismert szomatotópia alapján valószínűsíthetően a homotóp ujjbegy reprezentációra szorítkozott. Az área 3b-től rostrálisan további két területen, az área 3a és M1-ben szintén jól lokalizálható erősebb jelölődést találtunk, ami, hasonlóan área 1-hez, homotóp áreák közötti összeköttetésekre utal.



**23. ábra.** A D2 disztális ujjbegy reprezentáció afferentációjának eredete az IOS-térképen, BDA área 3b beadását követően. (**A-C**) Retrográd jelölt neuronok sűrűségeloszlásának (színkód) és IOS aktivitásmintázatának (fekete kontúrok) illesztett térképei az egyes esetekben (V, J, Mc). Az afferentáció szelektivitását a legsűrűbben jelölt és az IOSaktivitást produkáló területek átfedése mutatja. A színek a Voronoi-cellák méretének átlagtól való eltérését jelölik szórás (SD) egységekben megadva. d1-4: 1-4 ujjak disztális ujjbegy reprezentációi, pontozott vonal: área határok, M1: elsődleges motoros área, r: rostrális, m: mediális. Fehér folt: a BDA beadás elemzésből kihagyott mag régiója. Méretarány: 1 mm.

b. Efferens területek: anterográd jelölt axonfoltok eloszlása áreán belül és áreák között

A célterület-szelektivitást medio-laterális intrinzik és fokális areák közötti eloszlás jellemezte hasonlóan a bemenet-preferenciához (24. ábra). Lokálisan, a BDA beadás közelében axonfoltok azonosítása nem volt lehetséges az erőteljes jelölődés miatt. Ezen a régión túl, az injektált ujjbegy reprezentációt azonosító IOS-área perifériája felé már jelentős számú axonfoltot találtunk. Az áreán belüli axonfoltok szintén átfedtek a szomszédos, disztális ujjbegy reprezentációkkal (D1 és D3), viszont a nem szomszédos D4 reprezentációban és azon túl nem fordultak elő. Az ujjak középső-proximális részeinek reprezentációjában csak V-ben láttunk jelölődést.

Área 1-ben az axonfoltok erősen centralizáltan a homotóp, D2 disztális ujjbegy reprezentációban jelentek meg. Emellett J és Mc-ben a szomszédos D3 és D4 disztális ujjbegy reprezentációkban is látható volt egy-egy axonfolt. Ugyancsak erős jelölődést kaptunk V-ben az área 3b-től rostrálisan. Hasonlóan az área 1-ben leírtakhoz, az axonfoltok ez esetben is erősen lokalizált inter-áreális eloszlást mutattak. A szenzomotoros kéreg szomatotópiájának ismeretében a jelölt axonfoltok área 3a és M1 homológ ujj reprezentációját célozhatták. Az Mc-ben kapott gyenge jel área 3a-ban nehezen értékelhető, de az eloszlása értelmezhető a V-ben leírtak szerint. J-ben área 3btől rostrálisan nem találtunk axonfoltokat.



**24. ábra.** A D2 disztális ujjbegy reprezentáció specifikus efferens területeinek eloszlása az IOS-térképen, BDA área 3b beadását követően. (**A-C**) Anterográd jelölt axonfoltok (vörös kontúrok) és IOS aktivitásmintázat (fekete kontúrok) illesztett térképei az egyes esetekben (V, J, Mc). Az efferens terület szelektivitását az axonfoltok és az IOS-térkép átfedése mutatja. A jelölések megegyeznek a 23. ábrán alkalmazottakkal. Rostrális irány fent, mediális jobbra. Méretarány: 1 mm.

c. Az afferens és efferens területek átfedése

Mindhárom esetben megfigyelhető volt, hogy az axonfoltok legfőképp a retrográd jelölődést legnagyobb sűrűségben tartalmazó területeken csoportosultak (25. ábra). Emellett az erőteljes reciprocitás mellett az is látható, hogy a kis sűrűségű retrográd jelet tartalmazó területeken nagyszámú horizontális vetítő axon nyúlvány jelölődött (vö. 21. és 25. ábrák). A reciprok összeköttetés mind áreán belül és azok között megfigyelhető volt. Fontos ugyanakkor megjegyezni, hogy eredményeink a retrográd és anterográd jel horizontális 2D vetületére vonatkoznak. Előfordulhat, hogy az ily módon reciproknak

látszó összeköttetés a kétféle jelölődés eltérő rétegeloszlása miatt nincs direkt kapcsolatban egymással.



**25. ábra.** A D2 disztális ujjbegy reprezentáció afferens és efferens területeinek átfedése és kapcsolata az ujjak reprezentációjával. (**A-C**) Az anterográd jelölt axonfoltok (fekete kontúrok), a retrográd jel sűrűségeloszlásának (színkód) és az elektrofiziológiai mérések (fehér körök fekete körvonallal) illesztett térképei az área 3b beadás egyes eseteiben (V, J, Mc). Vörös ellipszisek: ujjak reprezentációi. A BDA beadás helyét nyíl mutatja. d2t, d4t: a 2. és 4. ujjak disztális ujjbegy reprezentációi. A többi jelölés megegyezik a 24. ábrán alkalmazottakkal. Méretarány: 1 mm.

#### 5. Az área 1 összeköttetéseinek eloszlása

A 26. ábra mutatja a disztális ujjbegy reprezentációk IOS-térképét, valamint a BDA injekció pontos helyét és méretét. Área 1-ben a BDA beadás két esetben (M és P; 26A,C ábra) a D2, egy esetben (Mo; 26B ábra) pedig a D4 disztális ujjbegy reprezentáció kis területére terjedt ki. P esetében a beadási hely az IOS mérés során ingerelt bőrfelület reprezentációján kívül került, de az elektrofiziológiai mérések alapján a disztális ujjbegy reprezentációval (26C,F ábra). M esetében az elektrofiziológiai mérések azt mutatták, hogy a beadás kis mértékben átfedett a D1 disztális ujjbegy reprezentációval (26A,D ábra).

A retrográd jelölődés horizontális eloszlásának két mintázatát azonosítottuk (27A ábra). 1) Áreán belül az área 3b-hez hasonlóan área 1-ben is a legerősebb jelölődés a beadási hely körül volt, ettől távolodva fokozatosan csökkent a retrográd jelölt idegsejtek sűrűsége. Az erősen jelölt terület P-ben volt a legnagyobb, míg M és Mo esetén hasonló kiterjedésű. 2) A szomszédos áreákban a BDA idegsejt csoportok retrográd jelölődését eredményezte. Área 3b-ben az erőteljes retrográd jelölődés egy viszonylag jól körülhatárolható területre lokalizálódott az área rostrális határa közelében. Hasonlóan, área 2-ben a retrográd jelölt idegsejtek egy nagyobb klaszterét figyeltük meg P-ben, ill. kisebb mértékben M-ben ugyancsak az área rostrális határa mentén. Az áreák közötti összeköttetések eloszlása megfelelt a disztális ujjbegy reprezentációk szomatotópiájának, ami área 1 és 2 esetében a közös határ mentén, annak két oldalán található, míg área 3b esetén attól rostrálisan az área 3a/3b közös határ mentén. Área 2-ben ugyanakkor a jelölés nem volt pontosan rekonstruálható, mert a metszetek e területet csak részben tartalmazták.



**26. ábra.** A BDA injekció mérete és lokalizációja a disztális ujjbegy reprezentáció IOS és elektrofiziológiai térképein área 1 beadást követően az egyes esetekben (M, Mo, P). (**A-C**) A disztális ujjbegy reprezentáció IOS (fekete körvonalak) és elektrofiziológiai (különböző szimbólumok) térképei área 3b-ben és área 1-ben. A BDA beadás helyét fehér közepű kör jelöli. Pontozott vonal: áreák közötti határ. (**D-F**) A BDA beadás (fehér közepű kör) szövettani metszeteiről készült inverz képek illesztése az IOS-al azonosított, beinjektált disztális ujjbegy reprezentációval (fekete körvonalak) az agyfelszínen. D1-5: 1-5 ujjak; D,M,P: disztális, mediális, proximális ujjbegyek; Palm: tenyér. r: rostrális, m: mediális. Méretarány (A)-n 1 mm érvényes (B,C)-re, (D)-n 250 μm érvényes (E,F)-re.

Hosszú lefutású axonok különösen erősen jelölődtek Mo-ban és P-ben (27B ábra). Ezekben az állatokban a beadási helytől kiindulva masszív, rostrális irányú, anterográd jelölt axon köteget azonosítottunk, ami área 3b és 3a-n áthaladva feltehetően M1-ig vetült (27B ábra, kék színnel). Ugyancsak erős axon köteg jelölődött a BDA beadástól kaudálisan área 2-be vetülve (27B ábra, zöld szín). Metszet sorozatainkon a kaudális plexus rövidebb volt, mint a rostrális. Az áreán belüli vetítő axonok döntően mediolaterális orientációt mutattak (27B ábra, piros). M esetében a ferde metszési sík miatt csak rövid axon szakaszokat tudtunk rekonstruálni, melyek eloszlása a fent leírtaknak megfelelt (27B ábra).

Az axonfoltok eloszlását área 1-ben medio-laterálisan elnyújtott mintázattal lehetett jellemezni (27B ábra). Ezzel szemben área 3b-ben az axonfoltok erőteljesen csoportosultak hasonlóan az área 3b beadást követően feltárt areák közötti jelöléshez (27B ábra). P-ben, eltérően a másik két esettől, az áreák közötti axonfoltok az áreán belülihez hasonló medio-laterális eloszlást mutattak (27B ábra). Área 1-ben az axonfoltok lokalizációja főleg a kaudális határ közelében volt megfigyelhető. Área 3b-ben az axonfoltok jobban szóródtak rostro-kaudális irányban, de mindhárom állatban az área rostrális határa közelében mutatták a legnagyobb átfedést. Mo és P esetében lokalizált axonfolt csoportosulásokat találtunk área 3a-ban és área 2-ben is (27B ábra). Az axonfoltok mindhárom állatban az axon kötegek mentén helyezkedtek el. Nagy általánosságban a leírt mintázat hasonlított área 3b összeköttetésinek eloszlásához.



**27. ábra.** A retrográd és az anterográd BDA-jelölés horizontális eloszlása a három különböző esetben (M, Mo, P) área 1 beadást követően. (**A**) Minden zöld szimbólum egy retrográd jelölt idegsejtnek felel meg. A BDA injekció helyét piros pont jelzi. (**B**) Anterográd jelölt axonok (színes vonalak), valamint terminális axon arborizációs foltok (fekete körvonal). Az intrinzik, áreán belüli összeköttetések többnyire (folyt.)

latero-mediálisan futnak (piros vonalak), míg az áreák közötti axonok, melyek az área határokat átlépik, főleg rostro-kaudálisan (kék és zöld vonalak). Szaggatott piros vonalak: área határok, piros pont: BDA beadás helye. Méretarány P-n mindegyik sorozatmetszeten 1 mm-t jelöl.

a. Afferens területek: retrográd sűrűségtérképek áreán belül és áreák között

A sűrűség- és funkcionális térképek illesztésével azonosított, erős afferentációt adó területek eloszlása ránézésre nagyon hasonló volt ahhoz, amit área 3b beadás esetén tapasztaltunk (28. ábra). Így áreán belül a legerősebb afferentáció a beinjektált ujjbegy reprezentációból, valamint a szomszédos disztális ujjbegy reprezentációból származott: utóbbi M és P esetében a D1, míg Mo esetén a D3 ujj reprezentáció volt. A nem szomszédos disztális ujjbegy reprezentációk felé a jelölés sűrűsége jelentősen csökkent. Ugyancsak hasonlóan az área 3b afferentációjához, az injektált ujjbegy középsőproximális részének reprezentációja área 1-ben is erős áreán belüli afferentációt adott. Ez jól látható M és P-ben a funkcionális és sűrűségtérképek átfedéséből (28A,C ábra), de a szomatotópia alapján a rostrális irányban kiterjedő jel eloszlásból Mo esetében is hasonló következtetést vonhattunk le (28B ábra).



**28. ábra.** A disztális ujjbegy reprezentáció afferentációjának eredete. (**A-C**) Retrográd jelölt neuronok sűrűségeloszlásának (színkód), IOS aktivitásmintázatának (fekete kontúrok) és elektrofiziológiai mérések (fehér körvonal) illesztett térképei área 1 beadás egyes eseteiben (M, Mo, P). Az afferentáció szelektivitását a legsűrűbben jelölt és az ujjreprezentációkat azonosító IOS és elektrofiziológiai aktivitást produkáló területek átfedése mutatja. A színek a Voronoi-cellák méretének átlagtól való eltérését jelölik szórás (SD) egységekben megadva. Fehér körvonal: az ujjak (folyt)

elektrofiziológiával azonosított reprezentációi. d1-4: 1-4 ujjak disztális ujjbegy reprezentációi; p, m és t az ujjak jelölésénél: proximális, mediális és disztális ujjbegyek; pontozott vonal: área határok. Rostrális irány fent, mediális jobbra. Fehér folt: a BDA beadás elemzésből kihagyott mag régiója. Méretarány: 1 mm.

Área 3b-ből a legerősebb áreák közötti afferentáció az injekciós hellyel homológ ujjbegy reprezentációból eredt, hasonlóan, mint área 3b beadás esetében (28. ábra). Az área 3b afferentációjához képest különbség volt, hogy área 1 beadás után a szomszédos disztális ujjbegy reprezentációk is erősen jelölődtek área 3b-ben: M és P esetekben a disztális D1 reprezentáció (28A,C ábra), Mo esetében pedig disztális D3 reprezentáció (28B ábra).

b. Efferens területek: anterográd axonfoltok eloszlása áreán belül és áreák között

Área 1-ben axonfoltok jelölődtek a BDA beadás közelében az injektált disztális ujjbegy reprezentációban, valamint ettől rostrálisan a középső-proximális ujjbegy reprezentációban (29A,C ábra). Emellett a medio-laterálisan az injektált ujjbegyével szomszédos ujjbegy reprezentációkban ugyancsak találtunk axonfoltokat (29B,C ábra). A szomszédos área 3b-ben az axonfoltok erősen koncentrálódtak az injektálttal homotóp reprezentációban, valamint ettől kaudálisan a középső-proximális ujjbegy reprezentációk területén (29. ábra). Az áreák közötti összeköttetések esetén is megfigyeltük az axonfoltok medio-laterális eloszlását az injektálttal szomszédos ujjak reprezentációjának területén (29B,C ábra). További axonfolt csoportosulások voltak área 3a-ban és área 2ben (29B,C ábra), melyek koncentrált eloszlása szintén a homotóp összeköttetésekre utalt.

A fent leírt általános mintázaton túl jelentős egyedi különbségeket tapasztaltunk: P-ben sok, főleg egyedi, nem átfedő axonfolt jelölődött a leírt lokalizáción kívüli területeken, ami az efferensek nagy divergenciájára utal áreán belül és azok között egyaránt (29C ábra). Ezt figyelembe véve is mindhárom esetben elmondható, hogy az áreák közötti projekció inkább konvergens volt az inkább divergens areán belüli végződési mintázattal összehasonlítva.



**29. ábra.** A disztális ujjbegy reprezentáció specifikus efferens területeinek eloszlása. (**A**-**C**) Anterográd jelölt axonfoltok (vörös kontúrok), IOS aktivitásmintázat (fekete kontúrok) és elektrofiziológiai mérések (szürke körvonalak) illesztett térképei BDA área 1 beadásának egyes eseteiben (M, Mo, P). A efferens terület szelektivitását az axonfoltok és az ujjreprezentációkat azonosító IOS és elektrofiziológiai térképek átfedése mutatja. A jelölések megegyeznek a 28. ábrán alkalmazottakkal. r: rostrális, m: mediális. Méretarány: 1 mm.

c. Az afferens és efferens területek átfedése

A 30. ábrán látható, hogy a retrográd jelsűrűség lokális csúcsai az esetek nagy részében átfedtek az axonfolt csoportok lokalizációjával, biztosítva így a reciprok összeköttetést az injektált locus afferentációja és efferentációja között. Ez az eloszlás kimutatható volt mind az áreán belüli és az áreák közötti összeköttetésekben. Egy lényeges kivételt találtunk: az área 3a-ban viszonylag gyenge retrográd jelölődés mellett erős axonfolt jelölődést figyeltünk meg (30B,C ábra). Mo-ban hasonló mintázatot találtunk área 2-ben a beadási helytől kaudo-laterálisan (30B ábra). Ez esetben viszont az área 2-nek csak egy része került feldolgozásra, ami kizárja a végső konklúzió levonását.



**30. ábra.** A disztális ujjbegy reprezentáció afferens és efferens területeinek átfedése az ujjak reprezentációjával. (**A-C**) Az anterográd jelölt axonfoltok (fekete kontúrok), a retrográd jel sűrűségeloszlásának (színkód) és az elektrofiziológiai mérések (fehér és színes pontok) illesztett térképei área 1 beadás egyes eseteiben (M, Mo, P). A fehér ellipszisek az azonos ujj reprezentációját jelölik. A BDA beadás helyét kis fekete/szürke körvonalú kör mutatja. A többi jelölés megegyezik a 28. és 29. ábrákon alkalmazottakkal. Méretarány: 1 mm.

6. Struktúra-funkció megfeleltetés a kéz reprezentáció területén

a. Nagy felbontású fMRI BOLD korreláció

A disztális ujjbegy reprezentáció funkcionális kapcsolatait nyugalmi állapotban mért egysejt, és fMRI BOLD válaszok korrelációs mintázatainak elemzésével vizsgáltuk. Első lépésként ingerléses módszerrel feltérképeztük a kéz reprezentációját SI-ben (31A,B ábra). Disztális ujjbegy ingerlésre az elektrofiziológia és az fMRI átfedő aktivitásmintázatot produkált és a BOLD válaszban a megnövekedett aktivitást voxelek egy-egy jól lokalizált csoportja jellemezte 3a, 3b és 1 áreákban. A BOLD-korrelációt egy voxelmag kijelölésének segítségével, voxel szinten vizsgáltuk nyugalmi állapotban. A BOLDkorrelációs mintázat a voxel-mag lokalizációjától függően változott (31D-F ábra). Área 3b-ben a D2 disztális ujjbegy reprezentációba helyezett voxel-maggal erős korreláció volt látható medio-laterálisan a szomszédos ujjbegy reprezentációkra kiterjedve (D1: zöld körök; D3: sárga körök), míg a szomszédos área 1-ben szignifikáns korreláció csak a homológ ujjbegy reprezentációra lokalizálódott (31D ábra). Nyugalmi állapotban tehát erős funkcionális kapcsolatság van área 3b és 1 között az azonos, míg área 3b-ben a szomszédos ujjbegy reprezentációk között. Ezzel szemben área 3b-ben az arc reprezentációba helyezett voxel-mag csak áreán belül, a szomszédságában levő voxelekre kiterjedt funkcionális kapcsolatot jelzett (31F ábra) jó egyezésben azzal, hogy az arc, és kéz reprezentációk között nincsenek idegi összeköttetések (Manger és mtsi., 1997; Fang és mtsi., 2002). Área 3a-ban szintén erős áreán belüli funkcionális kapcsolatokat azonosítottunk, míg áreák közötti szinten az área 1-el találtunk erős BOLD-korrelációt (31E ábra). Ez a mintázat szintén összhangban van az anatómiai kapcsolatok eloszlásával (Huffman és Krubitzer, 2001; Jones és mtsi., 1978).



**31.** *ábra.* A disztális ujjbegy reprezentáció funkcionális konnektivitásának nyugalmi állapotú fMRI BOLD válasza a kéz és arc reprezentációk területén SI-ben. (A,B,D-F) egy reprezentatív eset, (C,G-I) populációs értékek. (**A**) A kéz reprezentáció elektrofiziológiai térképezése SI-ben. Az 1-4 ujjak és a tenyér (P) ingerlésével kiváltott idegsejt aktivitás helyét különböző színű körök mutatják. Az egyes áreák közötti határokat függőleges, míg a kéz és az arc reprezentáció közötti határt vízszintes szaggatott vonal jelöli. Fehér nyilak: centrális, valamint laterális sulcusok. Üres kék négyzetek: az área 3a, 3b és az arc reprezentációban használt voxel-magok lokalizációja. (**B**) A D2 disztális ujjbegy vibrotaktilis ingerlésével kiváltott BOLD válaszmintázat. A voxel szintű (folyt.)

aktivitás szignifikancia szintjét vörös színárnyalat jelöli. (**C**) A voxel-mag – voxel párok korrelációinak (r) boxplot diagramja az áreák szintjén, 10 állatból származó 21 mérési blokk adatai alapján. ctl: kontroll (voxel-mag az arc reprezentációban). A szignifikáns különbségek csillaggal jelölve. (**D-F**) Voxelek BOLD korrelációs mintázata nyugalmi állapotban. A voxel-mag lokalizációját (D: área 3b, E: área 3a, F: arc reprezentáció) kék négyzet jelöli. (**G-I**) Korrelációs együtthatók (r) átlagainak 3D diagramjai és 2D vetülete a voxel-magok különböző lokalizációja esetén (G: área 3b, H: área 3a és I: arc reprezentáció). Az átlagoláshoz az egyes állatok korrelációs térképeit a voxel-magokat középpontként használva illesztettük. (A,F) Fehér és rózsaszín nyílhegyek: elektrofiziológiai térképek és fMRI képek illesztéséhez használt erek. A méretarány (F)en az összes agyfelszíni képre érvényes.

Az egyedi állatokban regionális szinten megfigyelt mintázatokat alátámasztotta a korrelációs együtthatók kísérleti állatokat és mérési blokkokat magába foglaló populáció szintű vizsgálata (31C,G-I ábra). Így área 3b voxel-mag esetén két csúcsot azonosítottunk, egy nagyobbat áreán belül és a másikat área 1-ben (31G ábra). Área 3a voxel-mag esetén áreán belül és área 1-el mértünk szoros funkcionális kapcsolatot, viszonylag kis áreán belüli kiterjedéssel (31H ábra). Az área 3b arc reprezentáció esetén a voxel-mag segítségével csak áreán belüli funkcionális kapcsolatokat tudtunk azonosítani a vizsgált régióban (31I ábra). Ezzel összhangban az área 3a, 3b és 1 között lényegesen nagyobb korrelációs együtthatókat mértünk, mint ezen áreák és a kontrollnak használt área 3b arc reprezentációja között (31C ábra).

A disztális ujjbegy reprezentáció szintjén área 3b voxel-maggal a legnagyobb korrelációs együttható área 1 disztális ujjbegy reprezentációval volt, ezt követte a szomszédos ujjbegy reprezentációk közötti korreláció áreán belül, aminél kisebb volt a szomszédos ujjak reprezentációi közötti BOLD-korreláció área 3b és 1 között (32. ábra, 2-4 értékek). A disztális ujjbegy reprezentáció és az arc reprezentáció között alacsony BOLD korrelációt mértünk (32. ábra, 1. érték).



**32.** *ábra.* A vizsgált területek korrelációs együtthatóinak (r) mérési blokkokból számolt átlagai egy állatban. 1: área 3b ujj – kontroll (arc); 2: azonos ujj área 3b – área 1; 3: szomszédos ujjak área 3b; 4: szomszédos ujjak área 3b – área 1. \*: p < 0,001, páros tpróba. Összehasonlításul az área 3b funkcionális konnektivitása mellett megnéztük a disztális ujjbegy reprezentáció BOLD korrelációs térképét área 1-ben elhelyezett voxelmag segítségével is (33. ábra). Ebben az esetben is erős reciprok área 1 és 3b közötti kapcsoltságot, és további hasonlóságként área 1-ben is kiterjedt areán belüli funkcionális hálózatot lehetett azonosítani. Bár az egyedi megfigyeléseket ez esetben további elemzésnek nem vetettük alá, az eredmények alapján általánosnak tűnik, hogy a funkcionális hálózatot kiterjedt medio-laterális áreán belüli és jól lokalizált áreák közötti interakció alkotják.



**33.** *ábra.* Voxelek BOLD korrelációs mintázatának összehasonlítása eltérő voxel-mag lokalizáció esetén nyugalmi állapotban, reprezentatív példán. (**A**) Voxel-mag área 3bben. (**B**) Voxel-mag área 1-ben. Piros nyíl: voxel-mag lokalizációja. (A,B) Jobb oldali képek: fMRI felvételek SI-ben. A narancssárgával jelölt két aktív terület közötti függőleges sötét csík a centrális sulcus. Rostrális irány balra, mediális fent. Bal oldali ábrák: a korrelációk kontúr ábrái r = 0,6 (világos kék) és r = 0,8-es (piros) küszöb értékeket alkalmazva. Fehér szaggatott vonal: körülbelüli área határ a centrális sulcus mentén. Színkód: r értékek 0 (kék) – 1 (vörös) között.

b. Idegsejtek tüzelésének korrelációja

A disztális ujjbegy reprezentáció funkcionális kapcsolatait az idegsejtek tüzelésének korrelációin keresztül is tanulmányoztuk área 3b és 1-ben (34. ábra). Az ujjbegyek, ill. a kéz reprezentációit elektrofiziológia és IOS mérésekkel mindkét áreában lokalizáltuk; az eltérő módszerek mérési eredményei ez esetben is jól megfeleltethetők voltak egymásnak (34A,B ábra). Az idegsejtek tüzelésének szükséges szintjét az irodalomból ismert, a funkcionális kapcsolatok térképezésékor alkalmazott enyhe statikus ingerléses módszerrel értük el. Ez a módszer ami az idegsejtek spontán aktivitását növeli, de a korrelációs mintázatot nem befolyásolja (Kaas és mtsi., 1990; cf. Bruno és Sakmann, 2006; Hung és mtsi., 2010; Luczak és mtsi., 2009). Érdemes megjegyezni, hogy inger nélküli, valódi nyugalmi állapotú spontán aktivitás kereszt korrelációjának elemzése hasonló eredményre vezetett (bővebben az eredeti közleményben: Wang és mtsi., 2013 Supplemet, S3D,E ábra). Az idegsejtek tüzelésének kereszt korrelációja erős szinkron aktivitást jelzett área 3b-ben, valamint área 3b – área 1 között (34C,D ábra, 0 csúcsérték, 50 ms félmagasságnál). Az extracelluláris akciós potenciálok randomizálása és szimulált random tüzelés esetén nem tapasztaltunk korrelált aktivitást (34C,D ábra). A szignifikánsan korreláló área 3b – área 1 idegsejt párok (durván az összes azonosított idegsejt fele) közül az azonos ujjbegyet reprezentálók ( $r_{átl.} = 0,080$ ) lényegesen erősebb korrelációt mutattak, mint a szomszédos ujjbegyet reprezentálók ( $r_{átl.} = 0,065$ ) (34C ábra, p < 0,001, Mann–Whitney *U* teszt). Az áreák közöttinél valamivel gyengébb ( $r_{átl.} = 0,058$ , p < 0,05, Mann–Whitney *U* teszt), de így is jelentős korrelációt kaptunk área 3b-ben a szomszédos ujjbegy reprezentációk területén mért idegsejtek tüzelése között (34D ábra).

A korrelogramok további elemzésével vizsgáltuk a funkcionális kapcsolatok irányítottságát a két área között. A 34C ábrát alaposabban szemlélve feltűnik, hogy a görbék a csúcsértékre nézve aszimmetrikusak, a pozitív értékek oldalán nagyobb területet fednek le. A pozitív irányú ferdeség az área 3b  $\rightarrow$  área 1 irányú felszálló kapcsolatok kisebb időablakon belüli korrelációjára utalt. A megfigyelést egy aszimmetria index (ASI) bevezetésével számszerűsítettük: ASI = (R - L)/(R + L), ahol R és L az interakciók száma sorrendben a jobb- és baloldalon. Pozitív ASI a felszálló, negatív a visszacsatolás (área 1  $\rightarrow$  área 3b) elsődleges irányát jelzi. A 33E ábrán látható, hogy mind az azonos, mind a szomszédos ujjbegy reprezentációk között a felszálló kapcsolatok mentén gyorsabb az interakció, mint a reciprok irányban; mindkét csúcs lényegesen jobbra tolódott (Wilcoxon előjeles rang próba, p < 0.001; azonos ujj párok, medián = 0.07, n = 160 pár; szomszédos ujj párok: medián = 0.06, n = 153 pár). A homotóp és a szomszédos ujjbegy reprezentációk idegsejt párjai között nem volt szignifikáns különbség. Összességében áreák között a funkcionális kapcsolatok irányát tekintve azt találtuk, hogy a legerősebb interakciók (0 ms körül) közös bemenettel magyarázhatók, emellett azonban a felszálló kérgi pályák kisebb késleltetéssel bírtak, mint a visszacsatolás.

Az áreán belüli funkcionális kapcsolatokban (szomszédos ujjbegy reprezentációk área 3b-ben) a felszálló kapcsolat, ill. visszacsatolás iránya nem olyan egyértelmű, mint az áreák között. Ez esetben arra voltunk kíváncsiak irányított-e az interakció. Az összes aszimmetrikus eltérést pozitívnak véve az ASI a funkcionális kapcsolatok jelentős részében egyértelmű irányított interakcióra utalt (34F ábra; Wilcoxon előjeles rang próba, p < 0.001; szomszédos ujj párok: medián = 0.20, n = 63 pár). Figyelemre méltó, hogy az aszimmetria mértéke nagyobb volt az áreán belüli, mint az áreák közötti funkcionális kapcsolatokban (p < 0,001).



**34.** *ábra.* Az idegsejt aktivitás korrelációja a vizsgált területek között. (**A**) A kéz reprezentáció elektrofiziológiai térképe área 3b, és área 1-ben. (**B**) Bal oldali panel: Az (A) ábrán látható területen kiváltott IOS eloszlás a D2 disztális ujjbegy ingerlést követően (piros nyilak). Jobb oldali kép: a D2 (vörös) és D4 (zöld) disztális ujjbegyek reprezentációja a két áreában. Vörös szaggatott vonal: área határok. D1-5: 1-5 ujjak; D,M,P: disztális, mediális, proximális ujjbegyek; Palm: tenyér. p: posterior, m: mediális. Csillag jelöli a BDA beadás helyét área 3b-ben. Méretarány 1 mm. (**C-F**) A különböző területeken mért idegsejt párok tüzelésének kereszt korrelációi. A vizsgált neuron populáció áreák közötti (C) és áreán belüli (D) korrelogramja. Same: egyazon, adjacent: szomszédos ujjbegyek reprezentációi. A színes sáv a szórást jelöli. Szaggatott vonalak: szimulált és random kevert extracelluláris akciós potenciál sorozatok korrelációi. Az aszimmetria mutatók eloszlása az áreák közötti (E) és áreán belüli (F) korrelogramok esetén. Az eloszlások jelentős jobbra tolódása a funkcionális kapcsoltság irányítottságát jelzi (Wilcoxon előjeles rang próba, megegyező ujjbegy párok, p < 0,001, n = 160; különböző ujjbegy párok, p < 0,001, n = 153).

II. Az összeköttetések oldalirányú eloszlásának hierarchikus szerveződése a 3b- és 1 áreákban

## 1. A specifikus afferens, és efferens területek meghatározása

a. Afferens területek azonosítása

Specifikus bemenetként a legerősebb retrográd jelölést tartalmazó területeket tekintettük. Az afferentáció erősségét a retrográd jel sűrűségeloszlása alapján határoztuk meg. Az előzőkben ismertetett Voronoi-sűrűségtérképeken a legsűrűbb retrográd jel szigetszerű foltokként jelent meg, ami horizontális kiterjedésének és lokalizációjának pontos meghatározását körülményessé tette (35A ábra). Ezt a problémát kernel

sűrűségtérképek elemzésével küszöböltük ki, amin a különböző sűrűségű területek egymástól jól elkülöníthető, összefüggő területekként azonosíthatók (35B ábra).



**35. ábra.** Az afferens területek meghatározása a BDA-jelölt idegsejtek sűrűségeloszlása alapján. Voronoi (**A**) és kernel (**B**) sűrűségtérképek egy área 1 beadás példáján. Szaggatott vonal: área határok, fehér csillag: beadási hely. Színkód, (A) a BDA-jelölt idegsejtek sűrűségének átlagtól való szórás (SD) egységenkénti eltérésének logaritmusa; (B) a retrográd jelölődés sűrűségének logaritmált értékei. r: rostrális, m: mediális. méretarány: 1 mm. (ábra forrása: 19. ábra in Pálfi, 2018)

A kernel sűrűségtérképek pontosságát a retrográd és anterográd jel eloszlásával összeillesztve ellenőriztük. A kernel sűrűségtérkép megbízhatóan azonosította a retrográd jelölt idegsejtek eloszlásának területi különbségeit (36A,C ábra). Megfigyelhető pl., hogy área 3b beadást követően a beadási hely környékén a nagy idegsejt sűrűség átfed és kitakarja a pirossal jelölt területet a kernel sűrűségtérképen (36A,C ábra). A retrográd és anterográd jel eloszlásának viszonyát is megvizsgáltuk az axonfoltok kernel sűrűségtérképre vetítésével (36B,D ábra). Az összehasonlítás megerősítette az afferens és efferens területek reciprok eloszlására tett korábbi megfigyeléseinket (vö. 25. és 30. ábrák). A kernel sűrűségtérképen a 4 legnagyobb értékű területen koncentrálódott a BDA-jelölt idegsejtek 98,7%-a (bővebben ld. 39. ábra alább).



**36. ábra.** A kernel sűrűségtérképek viszonya a retrográd és anterográd jel eloszlásához egy-egy példán. (**A**,**B**) área 3b beadás, (**C**,**D**) área 1 beadás; (**A**,**C**) retrográd jelölés, (**B**,**D**) anterográd jelölt axonfoltok. Fekete szimbólumok: retrográd jelölt idegsejtek, szürke folt: axonfolt, szaggatott vonal: área határok, szürke kontúr: metszetek körvonala, fehér pont: beadási hely. A színek a retrográd jelölt idegsejtek sűrűségének logaritmusát mutatják. r: rostrális, m: mediális. Méretarány: 1 mm.

b. Az efferens területek meghatározása

Vizsgálatainkban a jól lokalizálható végződéssel bíró axonfoltokra szorítkoztunk. Az axonfoltok átmérője 250-350  $\mu$ m körül volt (37A,B ábrák). A feret átmérők összehasonlítása sem az állatok, sem pedig az áreák között nem eredményezett szignifikáns különbségeket. Ezt követően a boutonok sűrűségének meghatározásával kívántuk igazolni a megfigyelésünket, miszerint az axonfoltok a beadási hely specifikus cél területeit azonosítják. Háromféle terület bouton sűrűségét hasonlítottuk össze: a BDAjelölt axonfoltokban (P), a BDA-jelölt vetítő rostokat tartalmazó (F) és BDA-jelölt sejtes elemeket nem tartalmazó területek (CF) (37C,D ábra). Az axonfoltokban a boutonok sűrűsége lényegesen nagyobb volt, mint az F és CF területeken (ANOVA p = 0,01; Fisher





**37. ábra.** Az axonfoltok, mint specifikus efferens területek kitüntetett szerepe. (**A**,**B**) Az axonfoltok mérete a feret átmérők átlagában a különböző áreákban área 3b (A) és área 1 beadásokat követően (B). (**C**,**D**) A boutonok sűrűsége az axonfoltokban és azon kívül. (C) A boutonok 3x50 μm<sup>2</sup>-ra eső számának átlaga a metszet teljes vastagságában. (D) A boutonok 3x50 μm<sup>2</sup>-ra eső számának átlagos aránya (az adott állatban számolt összeshez képest) a metszet teljes vastagságában. P: axonfolt, F: jelölt axonokat tartalmazó területek, CF: jelölést nem tartalmazó területek, \*: szignifikáns különbség.

Az összeillesztett metszetsorozatokon az axonfoltok gyakran átfedtek és ezáltal csoportokat alkottak (21B, 24, 27B és 29. ábra). Az összes esetet figyelembe véve a különálló, nem átfedő axonfoltok aránya 15%-17% volt (38A ábra). Az axonfoltok csoportosulása a statisztikai összehasonlítás eredménye szerint nem függött az injektált áreától, ill. hogy az axonfolt áreán belüli vagy azok közötti jelölés eredménye volt. Ugyanakkor az átfedő axonfoltok egymás alatti metszeteken elfoglalt hasonló térbeli pozíciója a csoportok több réteget vagy a teljes kérgi mélységet átfogó oszlopos, kolumnáris szerkezetére utal.


**38. ábra.** Az axonfoltok csoportosulása área 3b- és 1-ben. (**A**) A csoportot képző axonfoltok arányának egyedek feletti átlaga a beinjektált (intra) és a vizsgált szomszédos (inter) áreában. (**B**) Az axonfolt csoportok méretének egyedek felett vett átlagos kumulatív eloszlása. Abszcissza: axonfoltok száma. Fontos megjegyezni, hogy az abszcissza a rétegmélységet is mutatja, mert egy csoporton belül az axonfoltok száma a sorozatban egymást követő metszetek megfelelő területein előforduló axonfoltok átfedéséből adódik. A3bij és A1ij: área 3b és 1 beadások, inter: áreák közötti, intra: áreán belüli.

Az axonfolt csoportok átfedő foltok számával meghatározott mérete a beinjektált área, valamint az összeköttetés áreán belüli vagy áreák közötti jellege szerint is változott (38B ábra). Nagyobb különbség az áreán belüli és áreák közötti összeköttetések között látszott, míg előbbiekben a csoportok 50%-60%-át 2-3 axonfolt alkotta, utóbbiban ez a méret 20%-ot tett ki. Áreák között az axonfolt csoportok 60%-át 5-7 axonfolt alkotta és 40%-ában a csoport méret 8 vagy annál nagyobb volt área 3b és área 1 beadás esetén is. Az áreán belüli és áreák közötti axonfolt méretek különbségei nagyobbak voltak área 3b, mint área 1 beadás után.

Az egyes esetekben a 4 legnagyobb kernel sűrűségű területet (a retrográd jelölt idegsejtek közel 99%-ával) az axonfolt csoportokkal és IOS aktivitással a 39. ábra mutatja. Az ábrán látható, hogy a specifikus afferens és efferens területek laterális eloszlása változik a BDA beadás helyétől, valamint attól függően, hogy áreán belüli vagy azok közötti összeköttetéseket vizsgálunk. Hasonló eltéréseket találtunk az összeköttetések horizontális kiterjedése és az idegsejtek populációs aktivitását azonosító IOS reprezentációk méretének összehasonlításakor (39. ábra). Megfigyeléseinket összefoglalva: 1) a beadási hely körül az áreán belül nagyobb sűrűségű volt a retrográd jelölés, mint az áreák közötti afferentáció esetén a homotóp régiókban; 2) área 3b-ben kifejezetten erős jelölést tapasztaltunk az áreán belüli és azok közötti összeköttetéseket összehasonlítva mind área 3b, mind área 1 beadások esetén (ld. kisebb sűrűség különbségek a két área között área 1, mint área 3b beadás után); 3) az áreák közötti axonfoltok área 1-ben a homotóp területen koncentrálódtak, míg área 3b-ben nagyobb, az IOS aktivitást is meghaladó területen oszlottak el; 4) az axonfoltok az injektált áreán belül is kiterjedt laterális eloszlást mutattak.



**39.** *ábra.* Az áreán belüli és azok közötti specifikus afferens és efferens területek oldalirányú eloszlása a funkcionális térképekre vetítve (**A**) área 3b és (**B**) área 1 beadások egyes eseteiben. A kernel sűrűségtérképek a 4 legsűrűbben jelölt (színes régiók) afferens területet mutatják. Az efferens területeket, a sorozatmetszeteken átfedő axonfoltok alkotta csoportokat halvány kontúrok ábrázolják. A beinjektált disztális ujjbegy IOS reprezentációját vastag fehér körvonal mutatja, míg a többi ujjbegyét vastag fekete körvonal jelöli. Mc esetében (A) pontozott körvonal jelöli a beinjektálttal szomszédos ujjbegy IOS reprezentációját, melyek jelentős átfedése a pontos szomatotópiás lokalizációt nehezítette. A beinjektált (fehér pontok) és egy azzal szomszédos (szürke pontok) ujjbegy elektrofiziológiai lokalizációját szintén feltüntettük. (folyt.)

# d2-4: a 2-4 ujjak disztális ujjbegy reprezentációi. Szaggatott vonal: área 3b és área 1 közötti határ, csillag: beadási hely. r: rostrális, m: mediális. Méretarány: 1 mm.

Mindennek pontosabb megértése céljából összehasonlítottuk az areán belüli, valamint a szomszédos 3b és 1 áreákat összekötő felszálló kapcsolatok (FF, área 3b  $\rightarrow$ área 1), valamint a reciprok visszacsatolás (FB, área 1  $\rightarrow$  área 3b) specifikus afferens és efferens területeinek laterális kiterjedését egymással és az IOS aktivitás méretével. Az összehasonlíthatóság miatt azonos sűrűségű területeket kellett választanunk, amit a 39. ábrán azonos szín jelöl a 3b és 1 áreákban. Ennek következménye volt, hogy bár a beinjektált áreában magasabb sűrűségű területek is voltak, mégis azt a kisebb denzitású területet kellett választanunk, ami a másik área legnagyobb értékét jelentette (pl. 39A ábrán J esetében a szürke területet mindkét áreában; ugyancsak ld. 40A ábra alább).

### Az afferens területek oldalirányú kiterjedése áreán belül és áreák között

A beadási helytől függetlenül az afferens terület lényegesen nagyobb volt áreán belül, mint áreák között (kétszempontos, ismétléses ANOVA, p = 0.05) és a két beadás esetén mért átlag értékek hasonlók voltak (40B ábra). Ennek ellenére a post hoc összehasonlítás csak área 3b beadás esetén eredményezett szignifikáns különbséget az áreán belüli és áreák közötti afferens területek mérete között (egyszélű, párosított t-próba, p = 0.02). Bár a trendek a két beadást követően hasonlók voltak (folytonos és szaggatott vonalak dőlése 40B ábrán), área 1 beadás után P kiugróan nagy áreán belüli értéke befolyásolhatta a statisztikai összehasonlítások eredményeit (kék területek 39B ábrán). Vissza kell utalni a B.I.5. fejezetben leírtakra, miszerint ebben az állatban (P) a BDA beadás a proximálisabb ujjbegy reprezentációra is kiterjedt.



**40. ábra.** A megegyező kernel sűrűségű területek összehasonlítása. (**A**) Az azonos sűrűséggel jelölt áreán belüli és áreák közötti afferens területek (pontozott körvonalak az ábrázolt áreákban) a kernel sűrűségtérképen área 3b beadást követően egy állatban. Jól látható a

jelzett területek eltérő mérete a két áreában. (**B**) Az azonos kernel sűrűségű területek méretei a két áreában a különböző BDA beadásokat követően. (folyt.)

BA3bij és BA1ij: área 3b és área 1 beadások, intra: áreán belüli, inter: áreák közötti összeköttetések. Hibavonal: szórás, \*: szignifikáns különbség. r: rostrális, m: mediális. Méretarány: 1 mm.

### 3. Az efferens területek tangencionális kiterjedése

Az egyedi axonfolt csoportok (AFCS) méretét a legnagyobb kiterjedésük alapján úgy határoztuk meg, hogy a nem átfedő területeket hozzáadtuk az átfedés által meghatározott területhez. Az área 1 efferensek esetén nagyobb volt az AFCS méret, mint área 3b beadást követően (41C ábra). Ennél is lényegesebb különbség volt az áreák közötti AFCS nagyobb mérete az areán belüli AFCS-al összehasonlítva (egyszélű, párosított t-próba, p = 0,01). Azt is megfigyeltük, hogy míg área 1-ben az AFCS területe hasonló volt az áreán belüli és áreák közötti efferensek esetén, addig área 3b-ben az áreán belüli AFCS kisebb volt, mint az área 1 afferensek által képzett AFCS.

Az AFCS-k sűrűségét, ami a térbeli szummáció, ill. a komplementer divergencia egy mértéke, a legközelebbi szomszédjuk távolságának átlagával jellemeztük (ez fordított arányban áll a sűrűséggel) (41A ábra). Az área 3b beadás nagyobb AFCS sűrűséget eredményezett, mint az área 1 beadás mind az áreán belüli és áreák közötti összeköttetések esetén (41D ábra). A divergenciát az AFCS-k beadási helytől, ill. a szomszédos áreában a legsűrűbb retrográd jelet tartalmazó terület tömegközéppontjától mért távolságával is jellemeztük (41B ábra). Áreán belül ez a mérték mindkét beadást követően nagyobb volt, mint az áreák közötti efferentáció esetén (área 3b beadás után a különbség szignifikáns volt: egyszélű, páros t-próba, p = 0,03) (41E ábra). A két área közötti AFCS-k sugárirányú távolsága FB área 1  $\rightarrow$  área 3b irányban nagyobb volt, mint a reciprok, FF área 3b  $\rightarrow$  área 1 efferensek esetén (41E ábra).



**41. ábra.** (előző oldal) A BDA-jelölt axonfolt csoportok mérete és távolsága a különböző efferens területeken. (**A**) Legközelebbi szomszédok távolságának mérése. Fekete pont: BDA beadás helye, szaggatott, ill. folytonos vonalak: sorrendben a nyíllal, ill. nyílheggyel jelzett axonfolt csoportok legközelebbi szomszédjai. A távolságot a tömegközéppontok között mértük. (**B**) Axonfoltok tömegközéppontjának távolsága (vonalak) a beadási helytől (fekete pont). A beadással szomszédos áreában a legsűrűbb retrográd jelet tartalmazó terület tömegközéppontjától mértük a távolságokat. (**C,D,E**) Az axonfolt csoportok átlagos területe (*C*), legközelebbi szomszédjainak átlagos távolsága (D) és a BDA beadástól, ill. tömegközépponttól mért távolságának átlaga (E). (D) A legközelebbi távolságokat área 1 beadás esetén csak két esetben tudtuk mérni, mert M-ben csupán egy-egy áreán belüli és áreák közötti AFCS-t találtunk. Hibavonalak: szórás. AF: axonfolt, BA3bij: área 3b beadás, BA1ij: área 1 beadás. r: rostrális, m: mediális irány. Méretarány: 1 mm (A)-ra is alkalmazva.

#### 4. Az afferens és efferens területek viszonya

Az egy-egy beadásból származó afferens és efferens területeket közvetlenül is összehasonlítottuk, hogy pontosabb képet kapjunk a térbeli viszonyaikról (42. ábra). Az AFCS-k radiális távolságait a legsűrűbben jelölt afferens területek oldalirányú kiterjedésével úgy tudtuk összehasonlítani, hogy a kernel sűrűséget külön-külön meghatároztuk az intra- és inter-áreális retrográd jelölések esetén (11. táblázat). Együttes számolással ugyanis az áreák közötti legnagyobb sűrűségű afferens terület meghatározását az áreán belüli jóval nagyobb sűrűségérték akadályozta (39. ábra). Az AFCS-k központtól mért radiális távolsága áreán belül meghaladta a legnagyobb kernel sűrűségű terület átlóval mért kiterjedését (kétszempontos, ismétléses ANOVA p = 0,01, post hoc egyszélű, páros t-próba, p << 0,01) (42A ábra). Említésre méltó, hogy área 1ben az áreán belüli jelölésből (área 1 beadás) származó arányok messze nagyobbak voltak, mint az áreák közötti jelölésből (área 3b beadás) származó arányok. Área 3b-ben mindkét arány közelebb volt 1-hez. Ennek ellenére 95%-os konfidencia intervallumot véve egyik beadás esetén sem találtunk 1-től lényegesen eltérő értékeket az áreán belüli és áreák közötti arányokban (egymintás t-próba). Hasonlóképpen, a két beadás között annak ellenére nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget, hogy área 1 beadás után nagyobb értékeket kaptunk, mint área 3b beadás esetén (kétszempontos, ismétléses ANOVA, interakció p = 0,94).

**11. táblázat**. A legnagyobb sűrűségű területek mérete a beadási és szomszédos áreákban függetlenül számolt kernel sűrűség esetén. Az área 1 beadást követően área 3b-ben megfigyelt nagy érték összhangban van a relatíve nagyobb sűrűségű áreák közötti retrográd jelöléssel área 1, mint área 3b beadást követően (39. ábra). Ezzel ugyancsak összhangban nagyobb az IOS reprezentációban a retrográd jelölt idegsejtek száma a szomszédos áreában área 1, mint área 3b beadás után.

Injektált área	Área 3b		Área 1	
Mért área	Área 1	Área 3b	Área 1	Área 3b
átlag±szórás (x10 <sup>5</sup> μm <sup>2</sup> )	6,2±0,9	7,5±1,2	6,4±1,8	10,6±9,4

Következő lépésben az AFCS-k afferens területek sűrűségével való viszonyát vizsgáltuk úgy, hogy a kernel sűrűségtérképen a legnagyobb sűrűséggel kezdve rangsoroltuk az AFCS-al átfedő afferens területeket (a rangsorban tehát előfordulhatott egy vagy több sűrűség érték átugrása) (42B ábra). A két sűrűséggel is átfedő AFCS-t fele arányban számoltuk a két afferens területhez. Az elemzés azt mutatta, hogy áreán belül az AFCS-k a retrográd jelölt idegsejtek nagyobb sűrűségtartományában oszlottak el, mint az áreák közötti összeköttetések esetén (42C,D ábra). Továbbá, área 3b beadást követően az AFCS-k jobban koncentrálódtak a nagyobb sűrűségű afferens területeken, míg área 1 beadás az AFCS-k nagyobb szóródását eredményezte alacsonyabb kernel sűrűségű területekkel is átfedve (42C,D ábra). Következésképpen área 1-ben a FF efferensek nagyobb sűrűségű FB afferens területeket céloztak, míg área 3b-ben a FB efferensek alacsonyabb sűrűségű FF afferens területeken is végzőttek.



**42. άbra.** (előző oldal) Az afferens és efferens területek össze-hasonlítása. (**A**) Az axonfoltok (AF) beadási helytől vagy a beadással szomszédos áreában a legsűrűbb retrográd jelet tartalmazó terület tömegközéppontjától mért átlagos távolságának és a legnagyobb kernel sűrűségű területek átlagos átmérőjének aránya. A kernel sűrűséget a beadási és szomszédos áreában egymástól függetlenül számoltuk (11. táblázat). Szaggatott vonal: y = 1. (**B,C,D**) AF csoportok eloszlása a kernel sűrűségtérképen. (B) A mérés módja egy área 3b beadás példáján. A fekete nyilak a legmagasabb ranghoz tartozó csoportokat jelölik, a fehér nyíl az első és második ranghoz is tartozó csoportot jelöl. Fehér csillag: beadási hely, szaggatott vonal: área határ. r: rostrális, m: mediális. Méretarány: 250 μm. (C,D) Az AF csoportok megoszlásának aránya a különböző kernel sűrűségű területeken az injektált áreán belül (C) és a szomszédos áreában (D). BA3bij: área 3b beadás. SD: szórás.

### 5. Az afferens és efferens területek viszonya a populációs aktivitáshoz

Az összeköttetések viszonyát a populációs receptív mező (pRF) térbeli kiterjedésével az afferens és efferens területeket és a megfelelő IOS-áreát összehasonlítva tanulmányoztuk (43. ábra). A pRF meghatározása IOS-el történt, ami lehetővé teszi az ingerléssel kiváltott agykérgi populációs aktivitás meghatározását (Chen és mtsi., 2003; Friedman és mtsi., 2008; Rasch és mtsi., 2013; Morone és mtsi., 2017). Elsőként arra kerestünk választ, hogy a retrográd jelölt idegsejtek hányad része esik az IOS-áreába (43A ábra). Ehhez csak az adott áreában jelölt neuronok számát vettük figyelembe. Az összehasonlítás eredményeként azt találtuk, hogy área 3b beadást követően az áreán belüli

projekciós neuronok nagy hányada található a disztális ujjbegyet reprezentáló pRF-ben, míg áreák között a FB projekciós neuronok esetén ez az arány kicsi volt (43B ábra). Szintén alacsony arányban jelölődtek áreán belüli projekciós neuronok área 1 beadás esetén, ugyanakkor ez az érték magasabb volt az áreák közötti FF projekciós neuronokat tekintve (43B ábra). Fontos megjegyezni, hogy az IOS-área mérete különbözik a két áreában: área 3b-ben nagyobb, mint área 1-ben. Ez hozzájárulhatott az arányok área 1ben tapasztalt kisebb értékéhez. Az is lényeges tényező, hogy az altatás jobban hat a magasabb rendű kérgi áreák aktivitására, mint az elsődleges szenzoros mezőkére, így área 1-ben az IOS-área feltehetően alulbecsli a pRF-t (Chen és mtsi., 2005). Miután az IOS méréseket altatásban végeztük a kapott arányok ugyancsak a valódi értékek alsó becslései lehetnek.



43. ábra. Az afferens és efferens kiterjedésének összeterületek hasonlítása az IOS mérés során aktiválódott terület nagyságával. (A,B) retrográd jelölődött idegsejtek Α számarányának meghatározása (A) és átlaa értékei (B) а különböző összeköttetések esetén. A retrográd jelölt idegsejteket fekete szimbólumok mutatják 1:1 arányban. Szürke kontúr: IOS aktivitás, szaggatott vonal: área határok. (C) Az áreák függetlenül számolt legnagyobb kernel sűrűségű afferens területeinek (11. táblázat) viszonylagos mérete a IOS területhez képest. (D) Az axonfolt csoportok és a megfelelő IOS területek átlagos feret átmérőinek arányai. A hiba vonalak a szórás mértékét jelölik. Szaggatott

vonal (C,D): y = 1. BA3bij: área 3b beadás, BA1ij: área 1 beadás. r: rostrális, m: mediális. Méretarány: 1mm.

A afferens terület és a pRF térbeli viszonyának pontosabb megértése céljából összehasonlítottuk a legnagyobb kernel sűrűségű területek és az IOS-área arányát (43C ábra). A kernel sűrűségtérképeket ez esetben is függetlenül generáltuk az egyes áreákban (11. táblázat). Az IOS-área és a legnagyobb sűrűségű afferens területek aránya egy esetben sem különbözött lényegesen 1-től (egymintás t-próba), ill. egymástól (kétszempontos, ismétléses ANOVA, p = 009). Ez az eredmény további megerősítésül szolgált arra nézve, hogy a legerősebb afferentáció a homológ pRF-ből ered (nem csak átfednek, mint korábban láttuk, hanem méretben is megegyeznek).

Az efferens terület és pRF viszonyát az AFCS IOS-terület méretéhez viszonyított arányával vizsgáltuk (43D ábra). Az arányok 1 körüli értéket mutattak, azaz az AFCS és IOS-área méretei megegyeztek, kivéve área 3b-ben az intrinzik AFCS-k kis méretarányát, mely lényegesen különbözött 1-től (egymintás t-próba, p = 0,003). Az área 1 efferensek tehát a teljes pRF-t képesek beidegezni a disztális ujjbegy reprezentációban. Ezzel szemben área 3b intrinzik efferentációja a pRF-nek egy kisebb részére lokalizálódik.

6. Az összeköttetések oldalirányú kiterjedése által reprezentált bőrfelület mérete



**44. ábra.** Az afferens és efferens területek által reprezentált bőrfelület kérgi nagyítási faktor segítségével számolt mérete. (**A**) Az áreák azonos kernel sűrűségű területei által reprezentált bőrfelületek mérete. (**B**) Az egyes axonfolt csoportok kiterjedése által reprezentált bőrfelület mérete. (**C**) Az axonfolt csoportok radiális távolsága a bőrfelületre vetítve. \*: szignifikáns különbség. BA3bij: área 3b beadás, BA1ij: área 1 beadás. SD: szórás.

Ahhoz, hogy jobban értsük az összeköttetések szerepét a perifériás, szenzoros információ feldolgozásában összehasonlítottuk az afferens és efferens területek által reprezentált bőrfelület nagyságát (44. ábra). A reprezentált bőrfelület a kérgi nagyítási faktor (CMF) segítségével számítható ki, ami área 3b-ben 0,16, míg área 1-ben csupán 0,06 (Sur és mtsi., 1980; Friedman és mtsi., 2008). A CMF = agykérgi terület/reprezentált bőrterület hányados, amiből a bőrfelület kifejezhető. Az azonos kernel sűrűséggel számolt áreán belüli afferens területek által reprezentált átlagos bőrfelület nem szignifikánsan, de nagyobb volt área 1, mint área 3b beadást követően (44A ábra). Az áreák közötti afferens terület által reprezentált bőrfelület azonban jelentősen különbözött az eredetét tekintve: szignifikánsan nagyobb volt a FB, mint a FF afferentáció esetén (kétszélű t-próba, p = 0,01) (44A ábra). Említést érdemel, hogy az área 3b beadással jelölt áreán belüli valamint

FB afferens területek által reprezentált bőrfelület mérete nagymértékben egyezett (44A ábra). Ezzel ellenkezőleg área 1 beadást követően a FB afferens terület által reprezentált bőrfelület kisebb volt, mint az áreán belüli afferens esetében (44A ábra). Továbbá, a bőrfelületre vetített térbeli szummáció nagyobb volt az áreán belüli afferens terület, mint ugyanabban az áreában az áreák közötti afferens terület esetén (44A ábra).

#### 7. A projekciós neuronok csoportosulása

Az efferensek moduláris szerveződése egyértelműen látszik az AF-k és AFCS-k eloszlásából. Az afferens területek projekciós neuronjainak csoportosulását azonban kifinomultabb módszerekkel lehet csak kimutatni. A projekciós neuronok klaszteresedésére utaló jeleket láthattunk a Voronoi-sűrűségtérképeken a legsűrűbb jelölés szigetszerű eloszlásánál (23. és 28. ábra). A kérdés alaposabb megértése céljából a DBSCAN klasztererező algoritmust használtuk. A DBSCAN a klaszterek méretére vonatkozó feltevés nélkül képes egy változtatható hossz paraméterrel maximált távolságban levő pontokat (retrográd jelölt idegsejtek) csoportosítani (45A,B ábra). A hossz paraméter változtatásával (4-700 μm között 8 μm-s lépésekben) vizsgáltuk: 1) a klaszterek számát, 2) a klaszterek méretének eloszlását és 3) a klaszterek méretének variabilitását.

A 45C,D ábrákon látható, hogy a hosszparaméter növelésével a klaszterszám gyorsan eléri a csúcsértéket, majd ugyancsak gyorsan kis értékre csökken. A folyamat egy központi nagy és néhány ezt kísérő kis klaszter kialakulását jelzi, mielőtt 1-hez konvergál. A klaszteresedés 3 jellegzetes tulajdonságot mutatott: 1) a klaszterszám maximális és teljes száma área 3b-ben volt a legnagyobb függetlenül a beadási helytől, 2) az áreán belül vetítő neuronok több klasztert alkottak, mint az áreák között vetítők és 3) leggyorsabban área 3b-ben az áreán belül vetítő neuronok klaszterszáma csökkent a hosszparaméter növelésével (45C,D ábra és képbetétek). Mivel a retrográd jelölt neuronok sűrűsége hatással van a klaszteresedésre, a 3. megfigyelés összhangban van a korábban tett megfigyelésünkkel, miszerint área 3b-ben kiugróan nagy a retrográd jel sűrűsége (ld. 39. ábra és hozzá tartozó szöveg). A retrográd jel sűrűségének különbségeivel magyarázható az is, hogy a csúcsértékek különböző hosszparamétereknél alakultak ki; jellemzően később área 1-ben, mint área 3b-ben mind az áreán belül (área 3b beadás: 20 µm-es hosszparaméternél 106 db klaszter, área 1 beadás: 36 µm-es hosszparaméternél 38 db klaszter; képbetét; 45C ábra) és azok között (área 3b beadás: 76 µm-es hosszparaméternél 16 klaszter, área 1 beadás: 132 µm-es hosszparaméternél 6 klaszter; 45D ábra) vetítő neuronok esetén. Ugyancsak fontos, hogy a csúcsérték elérését követő exponenciális mértékű klaszterszám csökkenés (képbetétek 39C,D ábra) összefügg a jelölt idegsejtek távolsággal exponenciálisan csökkenő sűrűségével (ld. log értékek Voronoi és kernel sűrűségtérképek szerkesztésekor 23, 28 és 39 ábrákon; valamint Horvát és mtsi., 2016), ami a centrális nagy klaszter kialakulását is eredményezi.

Kíváncsiak voltunk, hogy a klaszter méret eloszlásban megjelenik-e valamiféle regularitás, ami összefüggésbe hozható pl. az agykéreg kolumnáris szerveződésével. A klaszter méret diverzitását a különböző méretek valószínűségét megadó entrópiával jellemeztük, amit szintén a hosszparaméter függvényében számoltunk. Α klaszterszámban tapasztalt nagy különbségek ellenére alacsonyabb hosszparamétereknél (durván 200 µm-ig) a klaszterméret entrópiája nagyon hasonló volt a két beadás után (45E,F ábra). Akárcsak a klaszterszám eloszlás, a klaszterméretek hasonló diverzitása ugyancsak magyarázható az exponenciális távolság törvényével (a vetítő neuronok arányának exponenciális csökkenése a beadástól számított távolság növekedésével, Horvát és mtsi., 2016) ami miatt a kis klaszterek fúziójával fokozatosan alakul ki a nagy centrális klaszter. A kétféle, áreán belüli és azok közötti összeköttetések közül az utóbbiban valamivel nagyobb volt a klaszterméret diverzitása (45E,F ábra). Az összes esetben a diverzitás a klaszterszám csúcsa körül volt a legnagyobb, de attól eltérően a hosszparaméter növekedésével (kb. 200 µm-ig, ami felett a kis klaszterszám miatt az entrópia pontatlan) viszonylag kis mértékben csökkent, azaz a klaszterszámhoz képest relatíve nagy volt (45C-F ábra). A klaszterszámmal összehasonlítva az entrópia csúcsérték utáni lassú csökkenését a nagy centrális klaszter kialakulása és a beleolvadó kisméretű klaszterek számának csökkenése magyarázhatja.

45. ábra. (következő oldal) A retrográd jel klaszterszerkezete. (A,B) A retrográd jelölődött neuronok (fekete pontok) által alkotott klaszterek különböző hosszparaméterek (288 μm és 296 μm) esetén egy área 1 beadás példáján. Szaggatott vonal: área határok, kék: klaszterek área 3b-ben, piros: klaszterek área 1-ben. r: rostrális, m: mediális. Méretarány: 1 mm. (C,D) A klaszterek számának és (E,F) a méret variabilitásának változása a hosszparaméter függvényében áreán belüli (C,E) és áreák közötti (D,F) összeköttetések esetén. A diagramok a kétféle beadás 3-3 esetének mediánjait mutatják. A függvényeket 3 adatpontonként (24 µm) vett mozgóátlaggal simítottuk. A képbetétek a csúcsértékek csökkenésére illesztett egyenesek meredekségét mutatják log-lineáris skálákon (C panelen, área 3b beadás: -0.0032, área 1 beadás: -0.0016) (D panelen, área 3b beadás: -0.0014, área 1 beadás: -0.0018). BA3bij: área 3b beadás, BA1ij: área 1 beadás.

119



### 8. Az afferens és efferens területek anizotrópiája

Az összeköttetések eloszlásában az anizotrópia mértéke és orientációja meghatározza a neurális interakciók fő irányát a topografikus, esetünkben szomatotópiás kérgi reprezentációkban. Az előző fejezetben leírtak szerint az összeköttetések eloszlása meghatározott szomatotópiával jellemezhető. Ebben a fejezetben ennek mértékét hasonlítjuk össze az egyes összeköttetések esetén. A BDA-jelölt AF-k és vetítő neuronok eloszlásának anizotrópiáját (elliptikusságát) Sincich és Blasdel (2001) anizotrópia indexe nyomán számoltuk, majd az orientációval kiegészítve - az área 1 és área 3b közötti határral bezárt szög meghatározásával - hasonlítottuk össze az egyes pályákat (46A,B ábra). Az anizotrópia index (r<sub>n</sub>) minden esetben nagyobb volt nullánál, de az afferens vetítő neuronok közül csak a FB különbözött szignifikánsan nullától (egymintás t-próba, 95% konfidencia intervallum) (45C,E ábra). Ezzel szemben az AF-k közül csak egy, az

área 1 intrinzik efferentációja, nem különbözött lényegesen nullától (egymintás t-próba, 95% konfidencia intervallum) (45E ábra). Az anizotrópia lényegesen nagyobb volt az efferens AF-k, mint az afferens vetítő neuronok esetén (kétszempontos, ismétléses ANOVA, p = 0,001). A post hoc összehasonlítások ugyanakkor csak az áreák közötti AF vs. vetítő neuron összeköttetések különbségének szignifikanciáját erősítették meg (egyszélű t-próba, p < 0,01). Az afferentáció és efferentáció anizotrópiájának összehasonlításával kapcsolatban figyelembe kell venni, hogy míg az előző esetben minden egyes idegsejtet számításba vettünk, addig az efferensek esetén csak a legnagyobb buoton sűrűséggel bíró AF-kat.

Az orientáció mértékét tekintve a kis szögérték azt mutatja, hogy a jelölés az área határral nagyjából párhuzamosan a szomszédos ujjak reprezentációján keresztül húzódik, míg derékszöghöz közeli érékek esetén a neurális összeköttetés az egyes ujjak proximális, tenyér felé eső részeinek reprezentációja felé irányul (45A,B ábra). Az afferentációt és az efferentációt minden esetben a szomszédos ujjak reprezentációján keresztüli eloszlás jellemzett (45D,F ábra). Ugyanakkor área 1-ben a FF AF-k orientációjának viszonylag nagy szögét (> 45°) illetően megjegyzendő, hogy az erős térbeli koncentráció miatt (24. ábra) ennek az összeköttetésnek az anizotrópiája és orientációja a disztális ujjbegy reprezentáción belüli lokális eloszlást jellemzi. A különböző összeköttetések orientációját faktoriális ANOVA-val összehasonlítva nem kaptunk szignifikáns különbséget az áreán belüli, FF vagy FB kapcsolatok között.



**46. άbra.** Az afferens és efferens területek anizotrópiája. (**A**,**B**) Az anizotrópia vektorok és szögek szemléltetése. Anizotrópia vektor (r<sub>n</sub>, fekete vonal középen telt körrel) és az orientáció szöge (a folytonos szürkés és az área határt jelző szaggatott vonalak által bezárt szög) retrográd (A) és anterográd (B) jelölődés esetén egy-egy példán área 1 beadás után. A bemutatott példákban az értékek: r<sub>n</sub> neuron, área 3b: 0,42, área 1: 0,4. r<sub>n</sub> axonfolt, área 3b: 0,46, área 1: 0,86. Anizotrópia szög neuron, área 3b: 32°, área 1: 42°. Anizotrópia szög axonfolt, área 3b: 36°, área 1: 38°. A fekete szimbólumok a neuronokat (A), a szürke kontúrok (B) az axonfoltokat jelölik. Pontok az axonfoltokban: tömegközéppont (B). A szaggatott vonalak az área határokat jelölik. r: rostrális, m: mediális. Méretarány: 500 μm. (**C**) A retrográd jelölt neuronok anizotrop eloszlása. (**F**) Az anterográd jelölt AF-k anizotrópia szögei. BA3bij: área 3b beadás, BA1ij: área 1 beadás. SD: szórás.

C. Agykérgi kommunikációs csatornák azonosítása a szomatoszenzoros kéregben

I. Axonmorfológia: csupasz és velőshüvelyes rostok eloszlása a szürkeállományban

A szomatoszenzoros kéregben az áreákat és az áreán belüli távoli területeket a szürkeállományban horizontálisan futó, BDA-jelölt, axon nyúlványok sűrű hálózata köti össze (21B, 27B ábra). Ezeknek a rostoknak a döntő többsége kanyargós lefutású, boutonokat képező axon volt (18F ábra). Egy kisebb csoportjuk azonban vastag, viszonylag egyenes lefutású és boutont nem képező, sima axonnyúlványként jelent meg (18E, 47A ábra). Mindkét rost típus azonosítható volt área 3b és área 1 beadást követően is. A fénymikroszkópos megjelenés alapján a boutont nem formáló rostok mielinhüvelyes axonoknak tűntek. Ezt a feltevést alátámasztotta, hogy elektronmikroszkóppal BDAjelölt, mielinhüvelyes axonok érintő irányú metszeteit figyeltük meg а szürkeállományban (47B ábra).

A kétféle axon típus eloszlása eltérőnek bizonyult. Míg a vékony, boutonokkal tarkított és kanyargó axonok között egyaránt előfordultak az área határon túlra vetítők és olyanok is, melyek nem lépték át az áreák közötti határt, addig a vastag, boutont nem képező axonok főleg inter-áreális, área határon túlra vetítő rostok voltak (47C,D ábra). A sima lefutású axonokat ennek megfelelően főleg rostro-kaudális orientáció jellemezte, ellentétben az axonok általánosan tapasztalt sugárirányú eloszlásával (47C,D, 21B, 27B ábra). Szemléltetésként és az összehasonlíthatóság érdekében az axonok eloszlását a beadásonkénti 3-3 esetet egymásra illesztve polárkoordináta rendszerben ábrázoltuk (47E,F ábra). Az ábrán egyértelműen kitűnt a feketével jelölt rostro-kaudális orientáció meghatározó jellege. Eredményeink szerint az áreák közötti kommunikációban egyszerre van jelen egy gyors, mielin hüvelyes axonokon és egy lassabb, csupasz axonokon keresztüli jelátvitel. Az áreán belül pedig a kommunikáció döntően a lassabb, csupasz axon nyúlványokon át valósul meg.



**47. άbra.** BDA-jelölt vastag és egyenes lefutású axon nyúlványok eloszlása. (**A**) BDA-jelölt vastag és boutonokat nem képező, sima rostok fénymikroszkópos felvétele (fekete nyilak). Az üres nyíl egy vékony axont mutat tüske-szerű boutonnal. A pontozott körvonal axonfoltot határol. (**B**) BDA-jelölt velőshüvely borítású rost hosszmetszete elektronmikroszkópos felvételen (fekete nyilak). A BDA-jelölt axon környezetében több jelöletlen, velőshüvelyes axon tangencionális- (ts) és keresztmetszeti (cs) képe látható. (**C,D**) BDA-jelölt vastag és sima rostok rekonstrukciói área 3b (C) és área 1 (D) beadások esetén. Az egyes esetek egymásra illesztett rekonstrukcióit különböző szín jelöli. Szaggatott vonal: área 3b határai, piros pont: beadási hely. (**E,F**) Polárkoordináta rendszerben ábrázolva az egymásra illesztett eloszlások a BDA-jelölt vastag és sima rostok (fekete szín) mutatják área 3b (E) és área 1 (F) beadások után. Az egyes eseteket különböző színek jelölik. A fekete szín az eloszlások erősen átfedő részét jelöli. A fehér pont a tengelyek metszéspontjában a beadási helyet mutatja. Méretarány A: 25 μm, B: 2 μm, D (C-re is alkalmazva): 1 mm. r, R: rostrális, m, M: mediális irányok.

## II. Preszinaptikus boutonok struktúrája az agykéregben

1. Talamokortikális axonvégződések a PFC-en

A talamusz relé sejtjeinek axonvégződéseit rézusz majomban tanulmányoztuk elektronmikroszkóppal egyrészt a mediodorzális talamusz mag (MD) prefrontális kérgi (PFC) vetületének BDA-jelölését követően (48A,B ábra), másrészt parvalbumin (PV) immunhisztokémia segítségével (48C,D ábra). A BDA-t a MD parvocelluláris régiójának (MDpc) dorzo-laterális részébe injektáltuk (48A ábra). A PFC-ben az área 46 középső rétegeiben (4. réteg és 3. réteg alsó sávja) (48B ábra) tapasztaltuk a legintenzívebb anterográd jelölést, de BDA-jelölt talamokortikális rostokat találtunk a kéreg mélyebb és felsőbb rétegeiben is. A talamokortikális axonok varikozitásokat és tüske-szerű végződéseket is képeztek (48B ábra).



**48. ábra.** Talamo-kortikális axonvégződések jelölése a prefrontális kéregben rézusz majomban. (**A**) BDA beadás lokalizációja a talamusz mediodorzális magjában. (**B**) BDAjelölt axonok a prefrontális kéreg középső III.-IV. rétegeiben. Képbetét: egy talamokortikális rost részlet kinagyított képe fáziskontraszt mikroszkóppal. Csl: felső laterális centrális mag, CL: centrolateralis mag, MDpc: mediodorzális mag, parvocellularis rész. (**C,D**) Parvalbumin immunjelölés az área 46 középső rétegeiben. Nyilak: immunnegatív perikaryonok fáziskontraszt felvétele. Méretarány, (A): 500 μm, (B-D): 50 μm.

A PV-t korábbi tanulmányok alapján a talamo-kortikális végződések markereként használtuk (Melchitzky és mtsi., 1999; Lewis és mtsi., 2001). A PV immunhisztokémia idegsejt nyúlványok sűrű szövedékét és perikaryonok egy csoportjának erőteljes jelölését eredményezte a PFC középső rétegeiben (48C,D ábra). Korábbi tanulmányok alapján tudható, hogy a PFC középső rétegeiben a jelölés főleg a PV-t nagy koncentrációban tartalmazó kosár-és axo-axonikus kandeláber sejteknek köszönhető, melyek sejttestében és nyúlványaiban is megtalálható ez a Ca<sup>2+</sup>-kötő fehérje (Lund és Lewis, 1993; Conde és mtsi., 1994; Melchitzky és mtsi., 1999; Lewis, 2000; Lewis és mtsi., 2001). Elektronmikroszkóppal ugyanakkor biztonsággal megkülönböztethető az említett gátló interneuronok szimmetrikus, Gray II-es típusú szinapszisa a talamo-kortikális végződések Gray I-es típusú, aszimmetrikus szinapszisaitól (pl. Guillery, 2000). Ezzel összhangban PV-immunpozitív axonterminálisok szinapszisainak mindkét típusát, Gray I és II, kimutatták a PFC középső rétegeiben (Melchitzky és mtsi., 1999). Tanulmányunkban a PFC középső rétegeiben csak az aszimmetrikus szinapszisokat létesítő PV-immunjelölt axonvégződéseket vizsgáltuk.



49. ábra. Talamo-kortikális axonvégződések elektronmikroszkópos felvételei a prefrontális kéreg középső rétegeiből. (**A,C,E**) BDA-jelölt talamo-kortikális axonvégződések aszimmetrikus szinapszisai. \*: jelöletlen axonvégződések aszimmetrikus szinapszisa dendrittüskével. (**B**,**D**,**F**) Parvalbumin tartalmú axonvégződések aszimmetrikus szinapszissal. (A-D) Dendrittüskével létesített szinapszisok. Tüskeapparátus hiányában a dendrittüske azonosítását segíti, hogy nem tartalmaz mikrotubulusokat. (E,F) Axo-dendritikus szinapszisok. (F) A pre- és a posztszinaptikus struktúra egyaránt parvalbumin pozitív (fehér nyilak: szinaptikus membrán specializáció). (C) Megfigyelhető, hogy egy jelölt bouton több posztszinaptikus struktúrával, ill. azok közül némelyikkel un. lebenyes szinapszissal (dupla nyilak egy dendrittüskén belül) is kapcsolódhat. A lebenyes szinapszisra másik példa az (A) panelen alul а csillaggal jelölt axonvégződés által létesített kapcsolat. (folyt.) (D) Egyetlen pre- és posztszinaptikus struktúra által létesített többszörös kontaktus. Nyilak: posztszinaptikus membrán specializáció. Méretarány, (A): 500 nm érvényes (B)re is; (F) 200 nm alkalmazható (C-E)-re is.

Elektronmikroszkóppal (EM) megállapítható volt, hogy a BDA-jelölt végződések kerek vezikulumokat tartalmaznak, és aszimmetrikus szinapszisokat létesítenek (49A,C,E ábra). A leggyakoribb szinapszist dendrittüskén találtuk, de kisebb arányban axo-dendritikus kapcsolatokat is azonosítottunk (49A,C,E, 50F ábra). A PFC középső rétegeiben aszimmetrikus szinaptikus kapcsolatot létesítő PV-immunjelölt axonvégződések BDA-jelölt terminálisokhoz hasonló ultrastrukturális a jellegzetességekkel rendelkeztek és szintén nagyrészt dendrittüskével szinaptizáltak (49B,D,F, 50F ábra). Ugyanakkor a PV-immunjelölt axonvégződések a BDA-jelölteknél kétszer nagyobb gyakorisággal szinaptizáltak dendrit törzsön (20,5% PV, és 9,5% BDAjelölés esetén). E különbség egyik magyarázata az lehet, hogy a PFC a MD-n kívül a dorzális talamusz más magvaiból is kap bemenetet (Barbas és mtsi., 2018).

A BDA-jelöléssel és PV immun-hisztokémiával azonosított talamokortikális axonvégződések ultrastruktúrájának kvantitatív jellemzését jelöletlen boutonokkal (49A ábra) összehasonlítva végeztük el. Kizárólag a szimmetrikus szinapszist létesítő végződéseket vizsgáltuk. Összesen 47 BDA-jelölt, 57 PV-immunpozitív és 66 jelöletlen axonvégződésen végeztünk méréseket abban a keresztmetszeti síkban, ahol jól láthatóan azonosítható volt a szinaptikus összeköttetést jelző posztszinaptikus membrán specializáció (PSD) (49. ábra).

**50. ábra.** (következő oldal) A BDA és parvalbumin (PV) tartalmú axonvégződések szinapszisainak kvantitatív morfológiai jellemzői. (**A,B,C**) A szinaptikus struktúrák méretének átlagai (±szórás, μm). (**D,E,F**) Az axonvégződések százalékos aránya a (D) posztszinaptikus membrán specializáció (PSD) típusa, (E) mitokondrium tartalma és (F) a célstruktúra (dendrit törzs, dendrittüske) szerint. PSD: posztszinaptikus membrán specializáció, TC: BDA-jelölt talamo-kortikális axonvégződés, C: jelöletlen kontroll szinapszisok a BDA-jelölt boutonokat tartalmazó metszetekről.



A boutonok és a posztszinaptikus dendrittüskék méretét összehasonlítva a varianciaanalízis jelentős csoporthatást eredményezett (kéttényezős ANOVA, p < 0,05). Ezzel összhangban a post hoc összehasonlítás eredménye szerint a BDA- és PV-pozitív boutonok lényegesen nagyobbak voltak, mint a jelöletlenek (Scheffe teszt, p < 0,001) (50A ábra). A jelölt boutonok akkor is nagyobbak voltak a jelöletleneknél, ha a boutonok területét a bennük levő mitokondriumok területével csökkentve hasonlítottuk össze (tpróba, p < 0,001). A BDA- és PV-pozitív axonvégződések mérete nem különbözött. Ellentétben a boutonok méretével változatos képet kaptunk a posztszinaptikus dendrittüskék méretét illetően. Míg a BDA-jelölt csoport nem különbözött a másik kettőtől, addig jelentős különbséget találtunk a PV-pozitív és jelöletlen kontroll csoportok között (p < 0,009; 50B ábra). Hasonlóan, a kétféle jelölt és jelöletlen axonvégződések által létesített szinapszisokban a PSD hossza sem különbözött lényegesen (50C ábra). A PSD típusát tekintve azonban a jelöletlen boutonokénál jóval nagyobb arányban fordult elő többszörös és lebenyes szinapszis a BDA- és PV-jelölt végződések esetén (50D ábra).

Jelentős eltérés mutatkozott a jelölt és jelöletlen boutonok mitokondrium tartalmában is (50E ábra). A PSD típusában és a mitokondrium taralomban a két jelölt csoport közötti különbség elhanyagolható volt a jelöletlen csoporthoz képest tapasztalt különbséghez hasonlítva. Az eltérés különösen nagy volt a mitokondrium taralomra nézve: a jelölt boutonok csupán kis hányadában nem találtunk mitokondriumot, míg a jelöletlen boutonok többsége nem tartalmazott mitokondriumot.

#### 2. Kortiko-kortikális szinaptikus boutonok szerkezete a szomatoszenzoros kéregben

1. Nagy, BDA-jelölt kortiko-kortikális boutonok eloszlásának fénymikroszkópos meghatározása a szomatoszenzoros kéregben

Az előző fejezetben leírtaknak megfelelően jelentős különbségek vannak a jelölt talamo-kortikális és a kontroll, jelöletlen boutonok szinapszisainak szerkezeti jellemzőiben. Figyelembe véve, hogy az agykéregben a szinapszisok nagy hányadát kérgi eredetű axonok létesítik, feltehetjük, hogy a jelöletlen csoportunk statisztikai értelemben a kortiko-kortikális szinapszisokat reprezentálta (Douglas és mtsi., 1995). Ebben a fejezetben a kortiko-kortikális axonvégződések ultrastruktúráját azok BDA-jelölésével vizsgáljuk a szomatoszenzoros kéregben, ugyanabban a 6 mókusmajomban, amelyekben a korábban leírt vizsgálatainkat végeztük. Kiemelt figyelmet fordítunk a nagyméretű, meghajtó jellegű talamo-kortikálishoz hasonló morfológiai tulajdonságokkal rendelkező boutonok azonosítására.

Årea 3b és área 1 efferensek FM vizsgálatával kétféle, méretben jól elkülöníthető boutont találtunk: egy nagyméretű, ritkábban előfordulót és egy kisméretű nagy számban jelölődőt (51A,B ábra). A továbbiakban célzottan a nagyméretű boutonok áreán belüli és azok közötti eloszlását vizsgáltuk FM-al. A térképezés során a kétféle bouton elkülönítéséhez az 1 µm-nél nagyobb méretűeket választottuk a kurzor beállításával. Az 1 µm mérethatárt részben tapasztalati úton, másrészt azon irodalmi adatok alapján választottuk, miszerint meghatározott kérgi eredetű és célterületű axonvégződések átmérője ezt az értéket meghaladja (Anderson és mtsi., 1998; Anderson és Martin, 2006, 2009; Covic és Sherman, 2011; Innocenti és Caminiti, 2017). Összesen 237 nagy boutont azonosítottunk a 6 állatban, aminek az átmérője nagyobb volt az 1 µm méretűre állított kurzornál. Nagy boutonokat találtunk az injektált áreán belül és a vizsgált szomszédos áreában (51C ábra). A feltérképezett 237 bouton 74%-át AF-on kívül lokalizáltuk. Érdemes ugyanakkor megjegyezni, hogy a BDA-jelölt AF-ok a kéreg terjedelmének

dc\_1938\_21

csupán kis részét teszik ki, így a kb. 1/3 AF-ban lokalizált nagy bouton viszonylag nagy hányadot képvisel.

Área 1 beadás esetén jóval több nagy boutont azonosítottunk, mint área 3b beadást követően (área 1 beadás: 207; área 3b beadás: 30 nagy bouton a 3-3 esetben). A különbséget főleg az injektált áreán belüli jelölődés eredményezte (área 1: 164, área 3b: 17), míg az áreák közötti eltérés kisebb volt (área  $1 \rightarrow 3b$  projekció: 43; área  $3b \rightarrow 1$ projekció: 13). A nagy számbeli különbséget a BDA-beadás különbségei okozhatták, így főleg az, hogy área 1 beadás során két esetben a teljes kérgi mélységet, tehát a mélyebb rétegeket is beinjektáltuk; ezzel szemben az área 3b beadások többnyire csak a felsőközépső rétegeket célozták (17E ábra, 10. táblázat). A metszetekre számított boutonok számának átlaga (±szórás) área 3b beadást követően 3,0±1,2, míg área 1 beadást követően 7,9±3,6 volt.

A szomszédos áreát célzó nagy boutonok által azonosított pályák erősségét a teljes számuk arányában határoztuk meg Markov és mtsi. (2011) retrográd jelölésre kidolgozott formulája alapján (erősség = N<sub>inter-área</sub> / (N<sub>inter-área</sub> + N<sub>intra-área</sub>), ahol N a nagy boutonok száma az indexben jelölt területen). A nagy boutonokat képező, áreák közötti pályák egyes esetekben és átlagában számított relatív erősségét az 51D ábra mutatja. Área 3b beadást követően a nagy boutonok közel fele, 0,46±0,25 (átlag±szórás) jelölődött área 1-ben. Ezzel szemben área 1 beadás esetén a nagy boutonok csupán kb. negyede, 0,23±0,08 (átlag±szórás) jelölődött área 3b-ben. A két pálya átlagos erősségében mért különbség éppen csak trendszerűen jelent meg (t-próba, szabadságfok (df) = 4, p = 0,20). Ugyanakkor az intra- és inter-áreálisan jelölt nagy boutonok számát összehasonlítva a különbség szignifikánsnak mutatkozott a két beadás között (área 3b beadás: 17 intra, 13 inter; área 1 beadás: 164 intra, 43 inter;  $\chi 2 = 10,807$ , df = 1, p = 0,0010).



51. ábra. Kis és nagy kortiko-kortikális boutonok fénymikroszkópos (FM) jellemzői. (A) *Kis boutonokat (átmérő < 1 μm) formáló vékony axon nyúlványok fénymikroszkópos* képe egy AF-ban área 3b-ben. A képbetéten egy axon szál részlete látható két varikozitással. Nyilak: varikozitások, nyílhegyek: tüske-szerű végződések. (B) Nagy boutonok (átmérő > 1 µm) áreán belüli és áreák közötti vetítő axonok varikozitásai formájában área 1-ben. (C) Nagy boutonok eloszlása a 6 esetben. A rekonstrukciókat a BDA beadási helyek és az área 3b – área 1 határ segítségével illesztettük. Négyzet: área 3b, kör: área 1 beadás után jelölt boutonok. A nagy szimbólumok az elektronmikroszkóppal rekonstruált boutonokat jelölik. Minden egyes szimbólum egy boutonnak felel meg. Az egyes esetek illesztett metszetsorozatait halvány kontúrok mutatják. a3b és a1: área 3b és 1, i.j. (csillag): BDA beadás helye, sc: centrális sulcus. BDA beadás lokalizációja: disztális ujjbegy reprezentáció, D2 ujj (5 eset) és D4 ujj (1 eset). r: rostrális, m: mediális irányok. Méretarány (A,B): 5 µm; (C): 1 mm. (D) A nagy boutonok eloszlása área 3b-ben és área 1-ben. Az áreák közötti arány az área 3b vagy área 1 beadások (ij.) által a szomszédos áreában jelölt boutonok aránya az áreán belül és azok között jelölt összes bouton számához képest. Az csillag az átlagot, a négyzetek az egyes eseteket jelölik. Az egyes eseteket a szimbólumok mellett jelöltük. A pontozott vonal jelöli a 0,5-es arányt.

2. A BDA-jelölt kis és nagy boutonok ultrastrukturális jellemzői área 3b, és área 1-ben

A FM-s térképezést követően EM-al vizsgáltuk, hogy különböző ultrastrukturális jellemzők alapján lehetséges-e a boutonok osztályozása a szomatoszenzoros kéregben. A nagy és kis boutonok finomszerkezetének összehasonlításához a nagy boutonokat tartalmazó ultravékony sorozatmetszeteken található összes olyan BDA-jelölt kis (LM

méret < 1 μm) boutont is vizsgáltuk, ami teljes 3D terjedelmében rekonstruálható volt. A mintánk összesen 31 nagy és 24 kis boutont tartalmazott intra- és inter-áreális jelölésből, AF-ból (12 bouton) és azon kívülről (43 bouton) (12. táblázat).

**12. táblázat**. Az elektronmikroszkóppal 3D-ben rekonstruált kis és nagy boutonok számának területi megoszlása a FM-s térképezés alapján. A kis boutonok lokalizációját a nagy boutont tartalmazó metszet lokalizációja alapján határoztuk meg.

Injektált área	Összes	Intra-área	Inter-área	
	(kis, nagy)	(kis, nagy)	(kis, nagy)	
Área 3b	27 (19,8)	13(9,4)	14(10,4)	
Área 1	28(12,16)	16(6,10)	12(6,6)	
Összeg	55(31,24)	29(15,14)	26(16,10)	

EM szinten a BDA-jelölt kis végződések kerek szinaptikus vezikulumokat tartalmaztak és aszimmetrikus, Gray I típusú szinapszist létesítettek dendrittüskékkel (52A ábra). A FM-al azonosított nagy végződések szintén kerek vezikulumokat tartalmaztak és aszimmetrikus dendrittüske- és axodendritikus szinapszisokat létesítettek (52B,C ábra). A nagy és kis végződések egyaránt képeztek egyszerű és lebenyes szinapszist (52A-C ábra). Érdekes módon EM-al a nagy boutonok közül öt varikozitást különösen nagyméretű, szinapszist nem létesítő axonális "tágulat"-ként sikerült azonosítani a két szomatoszenzoros kérgi áreában. Ezeket az axonális "tágulatokat", melyek szinaptikus vezikulumot sem tartalmaztak, a további elemzésből kizártuk, így a nagy boutonok száma 31-ről 26-ra csökkent, ezzel együtt a teljes minta mérete 50 boutonra (12, 14A táblázat).



**52. άbra.** BDA-jelölt kortiko-kortikális boutonok elektronmikroszkópos (EM) jellemzői. (A-C) Dendrittüskén (sp) szinaptizáló kis boutonok (LM-átmérő < 1 μm) keresztmetszeti képei. (D-F) nagy boutonok (LM-átmérő > 1 μm) dendrittüske- (E, F) és axo-dendritikus (d: dendrit) (D) szinapszisainak keresztmetszeti képei EM-al. Mindegyik BDA-jelölt bouton aszimmetrikus szinapszist létesít (nyílhegy). A szinapszisok lehetnek egyszerűek (A-C, E) és összetett, lebenyes típusúak (D, F). A boutonokban a mitokondriumok (m) száma változó, lehet több is (D, F), de hiányozhat is (A). A jelöletlen szinaptikus vezikulumok (v) fehér pontokként tűnnek elő a fekete NiDAB csapadékból és a szinaptikus kontaktus körül aggregálódnak (pl. A). Némely esetben a boutonba ágyazva jelöletlen invagináció (nyíl) azonosítható szinaptikus membrán specializáció jelenléte nélkül (C). Méretarány: (A-D, F) 0,5 μm és (E) 1 μm.

A szinaptikus boutonok szabálytalan alakúak voltak, gyakran jelentek meg bennük BDA-negatív, nem-szinaptizáló struktúrák betüremkedései (52C, 53D ábra). A boutonok komplex szinaptikus struktúrákat létesítettek, lebenyes, ill. többszörös kontaktusok kialakításával (52D,F, 53D ábra). A finomszerkezet jellemzőit, különösen a pontos méretet és formát így csak teljes 3D rekonstrukciót követően lehet összehasonlítani. A sorozatmetszeten alapuló 3D rekonstrukció folyamata az 53. ábrán látható.



**53. άbra.** BDA-jeölt nagy boutonok 3D sorozatmetszet-rekonstrukciója két példán. **(A)** Nagy BDA-jelölt varikozitás FM képe. **(B-D)** Az (A) panelen látható bouton 3D EM rekonstrukciója. (B) A bouton körvonalai a metszetsorozaton. (C) A bouton 3D struktúrája a posztszinaptikus elemekkel. (C<sub>1</sub>) Jól látható a bouton (bézs) és a két dendrittüske (szürke) szoros közelsége. (C<sub>2</sub>) Az áttetsző felület láthatóvá teszi a szinaptikus membrán specializációt (zöld) és a mitokondriumot (kék). (D) Az EM sorozatmetszet három, (B) panelen jelölt részén azonosítható a jelölt butonnal aszimmetrikus szinapszist (nyílhegy) létesítő két dendrittüske (sp1, sp2). A fehér pontok jelöletlen szinaptikus vezikulumok. Nyíl: membrán specializációval nem asszociált, BDAnegatív invagináció; m: mitokondrium. **(E-G)** BDA-jelölt nagy bouton 3D rekonstrukciójának másik példája. A jelölések megegyeznek (B-D)-n megadottal. **(H)** összehasonlításként egy BDA-jelölt kis szinaptikus bouton 3D struktúrája. A bouton mitokondriumot tartalmaz és dendrittüskével szinaptizál. A jelölések megegyeznek (C)-n megadottal. Méretarány: (A-F) 1 μm, (G-J) 500 nm.

#### 3. A BDA-jelölt boutonok osztályozása a felület és térfogat korrelációjával

A boutonok FM, majd kvalitatív EM módszerekkel történő osztályozását a kis és boutonok felszín és térfogat értékeinek, valamint ezek arányának nagy összehasonlításával is igyekeztünk alátámasztani 50 bouton (26 nagy és 24 kicsi, FM méret szerint) 3D-EM rekonstrukcióját követően. A felszín térfogat arány összehasonlítása jelezheti az esetleg meglevő különbségeket a membránhoz kötött, receptorokon és ion csatornákon keresztül folyó, ill. a citoplazmában lokalizálódó másodlagos jelátviteli kaszkádokon át (különös tekintettel a Ca<sup>2+</sup>-ra) zajló preszinaptikus funkciók súlyát illetően. (54A-C ábra). A boutonok (26 nagy és 24 kis bouton, LM méret szerint) 3D-EM rekonstrukciót követően mért térfogatát, felületét és a felszín/térfogat arányát az 54A-C ábra mutatja. A felület és térfogat összehasonlításokból kiugróan nagy értékeivel kitűnt egy kívülálló bouton (54A,B ábra). Másrészről ugyanez a nagyméretű bouton átlag körüli felület/térfogat aránnyal illeszkedett a csoportjába (54C ábra). A boutonok két csoportjában a bouton felszín (átlag  $\mu$ m<sup>2</sup> ± sd, kicsi: 1,0 ± 0,5, nagy: 4,5 ± 2,7) és térfogat (átlag  $\mu$ m<sup>3</sup> ± sd, kicsi: 0,1 ± 0,07, nagy: 0,7 ± 0,6) is szignifikánsan különbözött a kívülálló boutont beszámítva (t-próba, df = 48, összes p < 0.02) és az összehasonlításból kihagyva egyaránt (t-próba, df = 47, összes  $p < 1.5 \ge 10^{-5}$ ) (Bonferroni korrekció a többszörös összehasonlítások miatt) (54A-B ábra). A transzformált adatokkal  $(2\sqrt{\text{felszín és }}3\sqrt{\text{térfogat}})$  számolt felület/térfogat arány (átlag ± sd, kicsi: 2,2 ± 0,2, nagy:  $2,5 \pm 0,4$ ) szintén szignifikánsan különbözött a Bonferroni korrekcióval számolt p = 0.017 kritikus értéken (t-próba, df = 48, p = 0,016) (54C ábra). Eredményeink tehát alátámasztották a boutonok méret szerint történő osztályozására tett fénymikroszkópos megfigyeléseinket.

A boutonok felszíne és térfogata közötti összefüggést korrelációjuk segítségével tanulmányoztuk (54D-F ábra). Az összehasonlítás felfedte a térfogat és felszín erős korrelációját (Spearman R = 0,95) és azt, hogy a boutonok, hasonlóan az FM szintű kategorizáláshoz, egyetlen bouton kivételével 2 csoportot képeznek (54D,E ábra). Fontos ismételten megjegyezni, hogy az 5 axonális "tágulat" az elemzésben nem szerepelt (14A táblázat). A korrelációval azonosított csoportoktól elkülönülő bouton azonos volt a legnagyobb felszín és térfogat értékekkel rendelkező kívülállóval (54A,B,D árba). A kis és nagy boutonok csoportosulása a kívülálló kihagyásával és a skálák nagyításával még szemléletesebbé vált (54E ábra). Hisztogramok tanulmányozásával a kis és nagy boutonokat elválasztó mérethatárokat is azonosítottuk: 2,4-2,9  $\mu$ m2 (54G ábra) és 0,5-0,6  $\mu$ m3 (54H ábra) mérettartományokban nem találtunk boutonokat. Továbbá, a felszín

területe alapján a kis és nagy boutonok egyértelműbben megkülönböztethetők voltak, mint a térfogat alapján, ahol a méreteloszlásban nagyobb ugrások voltak (54G,H ábra).

A mitokondriumok felülete és térfogata a boutonokéhoz hasonlóan szintén erősen korrelált (13. Táblázat). Továbbá, a mitokondrium felület erősen korrelált a boutonéval. A mitokondrium és bouton térfogat közötti korreláció ugyan gyengébb volt, mint a felszín esetében tapasztalt, de még így is szignifikánsnak mutatkozott (13. Táblázat). Ugyanakkor a PSD területe sem a bouton, sem a mitokondrium felülettel nem korrelált (13. Táblázat), ami felvetette a PSD szerepét a boutonok klasszifikációjában.

A FM és EM klasszifikáció nem teljesen egyezett, mert 12 végződést, amit FMal nagy boutonként azonosítottunk, a 3D kvantitatív elemzés a kis boutonok csoportjába sorolt (54D,E ábra, 13. táblázat). Az 54E ábrán látható, hogy az átcsoportosított boutonok felszín és térfogat méretei a kis boutonok között a legnagyobbak voltak (lásd az ábrán a háromszögekkel csoportot képző köröket). A csoportosítás független volt a PSD jelenlététől és a mitokondrium tartalomtól (54E,F ábra). Eredményeink igazolták, hogy az egy dimenziós FM-s mérettel (átmérő) szemben a 3D-EM méréseken alapuló felszín és térfogat korreláció megbízhatóbb módszer a boutonok méret szerinti osztályozásának az agykéregben.

**13. táblázat.** Az összehasonlításokhoz használt változók korrelációi a PSD-vel szinaptizáló 32 bouton adatai alapján. Mitokondriumot 24 boutonban találtunk, az összehasonlítások ezekre a boutonokra vonatkoznak. Mindegyik korreláció szignifikáns volt (p < 0.05) kivéve a PSD területére vonatkozó összehasonlításokat.

változók	B	M	felsz.	felsz.	felsz.	térf.
	felsz vs.	felsz vs.	M vs.	PSD vs.	PSD vs.	M vs.
	térf*	térf*	B	B	M	B
Pearson R	0,96	0.94	0,84	-0,06	0,08	0.50

\*: transzformált értékekkel számolva ( $^2\sqrt{felszín}$  és  $^3\sqrt{térfogat}$ ); felsz: felszín, térf: térfogat, B: bouton, M: mitokondrium, PSD: posztszinaptikus denzitás



54. ábra. A BDA-jelölt boutonok (n = 55) felszínének és térfogatának összehasonlítása. (A) Felszín, (B) térfogat és (C) felszín/térfogat hányados a kicsi és nagy boutonok csoportjaiban. Α dimenziók összeegyeztethetősége érdekében az adatokat transzformáltuk (2Vfelszín, ill. 3Vtérfogat). Az ábrák az egyedi boutonokat (üres körök) és az átlagot (vízszintes vonal) mutatják. A fekete pont a körökben a PSD-vel azonosítható szinapszist létesítő boutonokat jelöli. A kívülálló bouton egyértelműen azonosítható a kiugróan nagy felszín (A) és térfogat (B) értékeivel (az (A,B) grafikonon az y tengelyt a jobb ábrázolhatóság érdekében megszakítottuk). Érdekes, hogy kiugróan nagy mérete ellenére a bouton felszí/térfogat aránya átlagos volt (C, nagy fekete kör). (D) A felszín és térfogat erősen korrelál. Látható a kis (háromszögek) és nagy (körök) boutonok csoportosulása. A nagyméretű kívülálló boutont (A,B) fekete kör jelöli. A PSDvel asszociált boutonokat kis, fekete szimbólum mutatja a háromszögekben és körökben. (E) A PSD nélküli (üres szimbólumok), ill. azzal asszociált (kis fekete szimbólumok) kis és nagy boutonok hasonló eloszlása. A felszín és térfogat esetükben is erősen korrelált (R = 0,87). Megfigyelhető, hogy néhány LM-al azonosított nagy bouton (körök) a kicsik (háromszögek) csoportjába sorolódott. A boutonok jobb azonosíthatósága érdekében a kívülállót nem ábrázoltuk. (F) Α mitokondriumot tartalmazó (folyt.) (fekete háromszögek) és nem tartalmazó (szürke háromszögek) boutonok nem különülnek el és esetükben is nagy a felszín-térfogat korrelációja (R = 0,77). **(G,H)** A felszín és térfogat értékek gyakorisága a kis és nagy boutonok csoportjában. A klasztereket elválasztó mérethatárokat a 2,4 – 2,9  $\mu$ m<sup>2</sup> és a 0,52 – 0,62  $\mu$ m<sup>3</sup> intervallumokban hiányzó adatok jelzik. Függőleges tengelyfelirat a középső (D-F) és alsó (G,H) sorban a sor többi diagramjára is vonatkozik.

4. A kis- és nagy BDA-jelölt boutonok szinapszisainak alapvető morfológiai jellemzői

A különböző típusú kérgi boutonok funkciójának megértése érdekében a szinaptikus jelátvitel hatékonyságában és a plaszticitásban szerepet játszó morfológiai tulajdonságaikat hasonlítottuk össze. Ehhez szükség volt a PSD pontos körülhatárolására. Sajnálatosan a PSD-t nem lehetett minden esetben egyértelműen körülrajzolni az érintő irányú metszési sík, ill. hisztológiai műtermék (nem kívánt csapadék képződés) megjelenése miatt. Emiatt 18 boutont a további elemzésből kizártunk. Az egyetlen szinapszist létesítő óriás varikozitást, mint kívülállót szintén kizártuk, így 31 (15 nagy és 16 kicsi) BDA-jelölt bouton képezte a 3D-EM kvantitatív összehasonlításaink tárgyát. Az előző elemzések érvényességét illetően fontos megjegyezni, hogy szinaptikus vezikulumok azonosíthatók voltak a kizárt boutonokban. A boutonok számának alakulását a 14A táblázat foglalja össze.

**14. táblázat**. A kis és nagy boutonok számának alakulása fénymikroszkópos (FM), valamint 3D-elektronmikroszkópos (EM) kategorizálás (felszín és térfogat korrelációja) alapján.

	Összes	PSD-vel	
beadással és 2 eset área 3b b	eadással.		
volt. A 3D-EM kategorizáláss	sal azonosított 7 l	bouton 3 állatból szál	rmazott, egy área 1
amelyekben a posztszinaptik	kus denzitás (PSD	) mérete egyértelmű	en meghatározható
	legalatonat az s		aconon regezean en

(A) A részletes kvantitatív vizsaálatokat az 55-ből azon a 32 boutonon végeztük el.

	Összes		PSI	D-vel
	FM	EM	FM	EM
Kicsi	24	36	16	24
Nagy	25	13	15	7
Óriás	1	1	1	1
Összes	50	50	32	32

(**B**) Az átcsoportosítással érintett, PSD-vel asszociált boutonok száma a kis és nagy csoportban 3D-EM kategorizálás (3D-EM boutonok) után (54D,E ábra). FM-bouton: fénymikroszkópos kategorizálás, BA3bij: área 3b beadás, BA1ij: área 1 beadás, intra: BDA-jelölt boutonok az injektált áreában, inter: BDA-jelölt boutonok a szomszédos área 3b-ben vagy área 1-ben.

Csoport	Injektált área	BA3bij	BA1ij	Összes
Nagy FM- boutonok	összes	12	3	15
	intra	5	-	5
	inter	7	3	10
Nagy FM	összes	8	-	8
átcsoportosítva	intra	4	-	4
kis EM-be	inter	4	-	4
	összes	4	3	7
Nagy 3D-EM- boutonok	intra	1	-	1
	inter	3	3	6
Kis 3D-EM- boutonok	összes	11	13	24
	intra	7	7	14
	inter	4	6	10

A tisztán körülhatárolható PSD-vel asszociált boutonok csoportjainak méretében további változásokat okozott, hogy 3D-EM osztályozással a nagy boutonok kb. fele (8/15) a kis boutonok csoportjába került (14B táblázat, szintén ld. 54D,E ábra). Az átcsoportosított boutonok área 3b beadással jelölt, inter-áreális axonvégződések voltak (14B táblázat). Továbbá, az átcsoportosítást követően a nagy csoportban egyetlen (intraáreális) kivétellel a boutonok inter-áreálisan jelölt végződések voltak. Összességében a további egy- és többváltozós 3D ultrastrukturális elemzésben 31 boutont tanulmányoztunk, hetet a nagy boutonok csoportjából és a 8 átcsoportosított boutonnal együtt 24 kis boutont, amiből 15 intra-áreális (7 área 1 beadásból, 8 área 3b beadásból) és 16 inter-áreális (9 área 1, és 7 área 3b beadásból) végződés volt (14B táblázat).

A szinapszisokat jellemző alapvető morfológiai tulajdonságok 24 kis és 7 nagy buoton közötti előfordulási gyakoriságát az 55. ábra mutatja. A sokszoros szinapszis előfordulási valószínűsége mindkét csoportban alacsony volt (55A ábra). Ezzel szemben viszonylag gyakran detektáltunk lebenyes PSD szerkezetet (55B ábra). Az összetett, sokszoros vagy lebenyes PSD-t képező szinapszisok aránya magasabb volt a nagy, mint a kis boutonok csoportjában (55A,B ábra). Ugyanakkor mindkét csoport hasonlóan nagy arányban (kb. 70%) tartalmazott mitokondriumot (55C ábra). A teljesség kedvéért megemlíthető (nem mutatjuk), hogy az elemzésből kizárt nagy, kívülálló varikozitás lebenyes szerkezetű, többszörös kontaktust létesített és több mitokondriumot is tartalmazott. Összességében az eredmények azt mutatták, hogy a PSD típusa (egyszerű vagy összetett), a boutonok mérete szerint változik.



**55. ábra.** Az alapvető ultrastrukturális tulajdonságok előfordulási valószínűsége a BDAjelölt boutonok felszín-térfogat korreláció alapján azonosított csoportjaiban. (**A**) Egyazon posztszinaptikus struktúrával sokszoros szinaptikus kapcsolatot létesítő boutonok aránya. (**B**) A lebenyes PSD-vel kapcsolódó boutonok aránya. (**C**) a mitokondriumot tartalmazó boutonok aránya. Az egyetlen szinaptikus kapcsolatot létesítő óriás varikozitást az elemzésből kihagytuk.

5. A kis- és nagy boutonok 3D ultrastrukturális jellemzőinek összehasonlítása egy- és sokváltozós módszerekkel

a. Bouton osztályok jellemző változóinak azonosítása egyváltozós tesztekkel

A vizsgált tulajdonságok közül a boutonok és a mitokondriumok mérete igen, míg a PSD mérete, valamint az alak tényező (AT), amit boutonok és a PSD esetén vizsgáltunk, nem különbözött lényegesen a két csoport között (56. ábra). A boutonok felületének és térfogatának két csoport közötti szignifikáns eltérése alátámasztotta a korreláció szerinti csoportosítás alkalmasságát (t-próba, df = 29, p =  $10^{-7}$  mindkét esetben, 56A,B ábra). Ugyancsak egyezően a FM-s csoportosítással kapott eredménnyel (54C ábra) a boutonok térfogategységre eső felületének mérete a felület nagy relatív növekedését mutatja a nagy boutonok specializációjában (t-próba, df = 29, p = 0,018; 56C ábra). A mitokondriumok mérete felszínben (t-próba, df = 21, p = 0,0001) és térfogatban (t-próba, df = 21, p = 0,00008) mérve is nagyobb volt a nagy végződésekben, mint a kis boutonokban (56D,E ábra). Ugyanakkor a mitokondriumok boutonra vonatkoztatott relatív mérete lényegesen nem különbözött a két csoportban (t-próba, felszín: df = 21, p = 0,53, térfogat: df = 21, p = 0,2; 56F,G ábra). Következésképp, a boutonok mérete mellett a mitokondriumok mérete is fontos megkülönböztető tényező a boutonok csoportosításában.

A PSD területe nem különbözött a két csoport között (t-próba, df = 29, p = 0,87), de a bouton egységfelszínre vetített értéke nagyobb volt a kis, mint a nagy boutonok csoportjában (t-próba, df = 29, p = 0,008; 56H,I ábra). A mitokondrium egységfelszínre vetítve a PSD mérete marginális szignifikanciával eltért a kis boutonok javára (t-próba, df = 21, p = 0,052; 56J ábra). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a PSD relatív és nem abszolút mérete játszik fontos szerepet a szinaptikus jelátvitelben.

Az alak tényező (AT) a boutonok esetében a gömbbel való hasonlóság, míg a PSD esetében a cirkularitás mértéke. A boutonok AT-je nem különbözött lényegesen a két csoport között (t-próba, df = 29, p = 0,09), bár a nagyobb boutonok a kicsiknél kevésbé voltak gömb-szerűek, feltehetően a nagy boutonokat inkább jellemző invaginációk és a protrúziók miatt (56K ábra). Az AT a PSD-k esetében hasonló értékű volt az axonvégződések két csoportjában (t-próba, df = 29, p = 0,41; 56L ábra).

Összességében a változónkénti összehasonlítások eredményei szerint a PSD és a mitokondrium a kis boutonokban tendenciózusan nagyobb részt tett ki, mint a nagyokéban (56F,G,I,J ábra), ami a bouton felület és térfogat szinaptikus funkciók specializációjában játszott fontosságára utal.

Bonferroni korrekcióval (p = 0,004) a boutonok felszín/térfogat arányának (56C) és PSD/bouton felszín arányának (56I) két csoport közötti különbsége nem volt szignifikáns. A többi esetben a különbség a p érték korrekciója után is szignifikáns maradt. Nagyobb elemszám szükséges e változók két csoport közötti különbözőségének megállapításához.



**56.** ábra A kis és nagy boutonok ultrastrukturális jellegzetességeinek összehasonlítása. **(A)** Bouton-térfogat, **(B)** felszín és **(C)** felszín/térfogat hányados. A térfogat egységre eső felszín arányát az 54C ábrában leírtak szerint transzformált adatokkal (2Vfelszín, ill. 3Vtérfogat) számoltuk. **(D)** Mitokondrium-felszín a boutonokban, **(E)** mitokondriumtérfogat a boutonokban, **(F)** mitokondrium-felszín/bouton-felszín arány, **(G)** mitokondrium-térfogat/bouton-térfogat arány, **(H)** PSD-felszín, **(I)** PSD-felszín/boutonfelszín arány, **(J)** PSD-felszín/mitokondrium-felszín arány, **(K)** bouton alak-tényező (AT), **(L)** PSD AT. Az AT PSD esetén (átlag±szórás: 1,1 ± 0,7) nem különbözött 1-től (egymintás t-próba, df = 29, p = 0,4), míg boutonok esetén (átlag±szórás: 0,9 ± 0,2) kisebb volt 1-nél (egymintás t-próba, df = 30, p = 0,04). A körök az egyes boutonokat jelölik, a vízszintes vonal az átlagot mutatja. \*: 0,01 < p < 0,05; \*\*: 0,005 < p < 0,01, \*\*\*: p < 0,005. (folyt.)

k-EM: kis boutonok, n-EM: nagy boutonok 3D-EM-val azonosítva (az utolsó sorban a vízszintes tengelyfeliratok mindegyik diagramra érvényesek).



b. Bouton osztályok morfológiai jellemezőinek azonosítása főkomponens elemzéssel

**57. ábra** A főkomponens elemzés (PCA) eredménye. (**A**) A főkomponensek sajátértéke, valamint az általuk magyarázott szórás mértéke. (**B**) A változók fontossága a modell által magyarázott szórásuk arányában (modell jósága). (**C**) A faktorsúlyok (a változó hozzájárulása a PCA modellhez) eloszlása a két főkomponens (P1, P2: transzformált értékek) mentén. A változók hatása az origótól mért távolossággal arányos. Az átlósan ellentétes kvadránsok változói negatívan korrelálnak. (**D**) A kis (fekete négyszög) és nagy (üres kör) boutonok csoportosulása az első két főkomponens mentén a boutonok súlytényezőinek (T1, T2) eloszlása alapján. A boutonok súlytényezői a változók normalizált értékeinek főkomponensek mentén az origótól mért távolságát fejezik ki. Az összes eset a 3x szórás értéket jelző ellipszisen belül látható, azaz a mintában nem volt kiugró érték. M/B sf: mitokondrium felszín/bouton felszín arány, PSD/M sf: PSD felszín/mitokondrium felszín arány, PSD/B sf: PSD felszín/bouton felszín arány, PSD/B sf: PSD alak tényező.

Főkomponens (PCA) elemzéssel kívántuk feltárni az egyes változók együttes és viszonylagos szerepét a boutonok osztályozásában, ill. neurofiziológiai tulajdonságaik kialakításában. A PCA-t az előző fejezetben ismertetett 12 változóval végeztük, mely a bouton, mitokondrium és PSD-re vonatkoztatott mért (felület és térfogat) és származtatott (relatív felszín és térfogat) értékeket, valamint az AT-ket (csak bouton és PSD esetén) tartalmazta. A PCA az adatokban rejlő redundáns korrelációk kiszűrésével határozza meg a változók fontosságát. A változók eltérő skálázása miatt az adatokat a z-értékkel (nulla átlag, egységnyi szórás) helyettesítve standardizáltuk. A PCA első két főkomponense együttesen az összes variancia 55%-ért felelt (57A ábra). A legnagyobb varianciáért felelős változó a mitokondrium felszín volt, beleértve a relatív (bouton felszínre vonatkoztatott) és abszolút mértékét is, valamint a mitokondrium térfogat (57B ábra). A legkevésbé fontos (legkisebb varianciát eredményező) változó a PSD AT-je volt. Érdekes és egyúttal megerősíti az egyváltozós összehasonlítás eredményét (56C ábra), hogy a boutonok térfogat egységre vonatkoztatott relatív felszín értéke gyenge megkülönböztető erővel bírt a boutonok azonosítását illetően (57B ábra). Az 57C ábrán látható, hogy a mitokondriummal kapcsolatos változók nem vagy csak kevéssé korrelálnak más változókkal, ami mitokondriumok szerepét hangsúlyozza boutonok a a klasszifikációjában. Hasonló módon, a boutonra vonatkozó abszolút (felület, térfogat) és relatív (felület/térfogat) mértékek is függetlenek voltak a többi változótól (57C ábra). A PCA elemzés azt is megmutatta, hogy a mintánk viszonylag homogén volt, nem tartalmazott kiugró értékekkel bíró boutonokat (57D ábra). Fontos eredmény volt, hogy PCA-val az első két főkomponens alapján a boutonok két csoportját viszonylag jól el lehetett különíteni (57D ábra). A kis és nagy boutonok elkülönülése az első két főkomponens mentén igazolja a boutonok és mitokondriumok méretének fontosságát a boutonok csoportjának megkülönböztetésében.


**58. ábra** Emberi temporális kéregből származó 4. és 5. rétegi boutonok PCA elemzésének eredménye. **(A)** A főkomponensek jelentősége, **(B)** a változók fontossága, **(C)** a faktorsúlyok eloszlása és **(D)** a boutonok csoportosulása. Részleteket ld. az 57. ábraszövegben. Négyszögek: 4. rétegi boutonok, körök: 5. rétegi boutonok. A kívülállók (kereszt) egy kivétellel 5. rétegi boutonok voltak. Alak tényezőként a spher (gömbszerűség) és circ (körszerűség) szerepel. A többi jelölés megegyezik 57. ábráéval. Megjegyzendő, hogy az elemzéshez 9 változót használtunk szemben a BDA-jelölt boutonok elemzéséhez használt 12 változóval (57. ábra).

A mintánk kis elemszáma miatt, főleg a nagy boutonok csoportjában, az eredményeink általánosíthatóságát humán temporális kérgi minták (Yakoubi és mtsi., 2019a,b) elemzésével kívántuk igazolni. Lübke és kollégái kimutatták (Yakoubi és mtsi., 2019a,b), hogy az 5. rétegben (L5) nagyobbak a boutonok, mint a 4. rétegben (L4). Kíváncsiak voltunk, hogy a boutonok méretük (felszín és térfogat) alapján csoportosulnak-e, ha több más változó is szerepel az elemzésben. Ez esetben a humán temporális kérgi minta 296 szinaptikus boutonból állt, 150 db L4-ből és 146 db L5-ből. Az ultrastrukturális változók egy kivétellel megegyeztek a szomatoszenzoros kéregben használttal: a humán adatok nem tartalmazták a mitokondrium felszín méretét. Így a 12 helyett 9 változóval tudtunk számolni (ld. B panel az 57 és 58 ábrákon). Továbbá, a humán adatokban használt cirkularitás és szfericitás megfelel а főemlős szomatoszenzoros kéregben használt PSD és bouton AT-knek. Hasonlóan a szomatoszenzoros kéreghez a humán temporális kéregben is az első két főkomponens felelt a szórás nagy részéért (együtt 63%, 58A ábra). A legfontosabb megkülönböztető változó a bouton-felszín mérete volt, amit a többi boutont jellemző mérték követett (58B ábra). A boutonokat jellemző változók után a mitokondrium térfogatban kifejezett mérete következett a változók fontosságának sorában (58B ábra). Hasonlóan a majom szomatoszenzoros kéreghez a PSD-t jellemző változók viszonylag kis variabilitást magyaráztak a humán temporális kérgi mintában is (58B ábra). Legkevésbé fontos változó a mitokondrium boutonra vonatkoztatott relatív térfogata volt (58B ábra). A faktorsúlyok eloszlása alapján a méretek, beleértve a boutonokat, mitokondriumot és a PSD-t is, együtt változtak és feleltek leginkább a boutonok közötti különbségekért (58C ábra). A mitokondrium/bouton térfogatot kivéve a méretek a többi változótól, így a boutonok és a PSD alaktényezői, valamint a PSD/bouton és a bouton felszín/térfogat származtatott mértékei, viszonylag függetlenek voltak. Figyelemre méltóan, a boutonok halmazában 3 csoportot lehetett azonosítani, egyet-egyet a L4 és L5 boutonok alkottak, valamint egy harmadikat, amiben a boutonok a két rétegből vegyesen fordultak elő (58D ábra). Ez az eredmény egyrészt összhangban volt Yakoubi és mtsi. (2019b) megfigyelésével, miszerint a L5 boutonok nagyobbak a L4 boutonoknál, de ezen túlmenően felfedte, hogy a kérgi boutonok morfológiailag heterogén csoportokat alkotnak. Tudni szerettük volna, hogy a méret valóban meghatározó szerepet játszik a boutonok szegregációjában, amit a felszín-térfogat függvény ábrázolásával vizsgáltunk. Ennek eredménye alátámasztotta a PCA elemzését, amennyiben a boutonok hármas tagolódásának trendje ugyanúgy kirajzolódott (59. ábra). A majom szomatoszenzoros kérgi adatokhoz hasonlóan a boutonok felszín-térfogat mérete az ember temporális kérgében is erősen korrelált (Spearman R = 0.9).

dc\_1938\_21



59. ábra A felszín és térfogat korrelációja 4. és 5. rétegi, emberi temporális kérgi boutonok esetében. pont: 4. réteg, kör: 5. réteg. Megfigyelhető, hogy а legnagyobb értékek kizárólag 5. rétegi, a legalacsonyabbak pedig néhány kivétellel 4. rétegi boutonokból származtak.

A majom és emberi adatok elemzésével kapott eredmények összehasonlíthatósága érdekében a PCA-t ismételten elvégeztük a majom szomatoszenzoros kérgi adatokon, de ezúttal a mitokondrium felszínnel számolt változók kihagyásával. Az így kapott 9 változóval az első két főkomponens a humán adatokhoz hasonló mértékben (61%) magyarázta a varianciát. A változók kihagyása megváltoztatta a többi változó fontosságát a boutonok megkülönböztetésében, méghozzá a humán adatok esetében tapasztalthoz nagyon hasonlóan (60A ábra). A boutonokkal kapcsolatos mértékek bírtak a legerősebb megkülönböztető képességgel, míg a mitokondrium/bouton térfogat a leggyengébbel (vö. 58B és 60A ábra). Ismételten fontos eredmény volt, hogy csupán a 9 változót használva a kis és nagy boutonok csoportjainak elkülönülése ugyanúgy megfigyelhető volt, mint 12 változóval (60B ábra). Ez az eredmény erőteljes bizonyítéka a boutonok méretük (felszín és térfogat) alapján történő csoportosításának.



**60. ábra** BDA-jelölt boutonok PCA elemzésének eredménye a változók kisebb csoportján (9 db), mely megfeleltethető az emberből származó adatok elemzéséhez használt változóknak. **(A)** változók fontossága, **(B)** boutonok csoportosulása. Négyszögek: kis-, körök: nagy boutonok. A jelölések megegyeznek 57. ábráéval.

D. Az agykérgi hálózat aktivitásának réteg-specifikus modulációja: a nemszövet specifikus alkalikus foszfatáz TNAP eloszlása és szubcelluláris lokalizációja

Eddigi eredményeink az agykérgi áreák közötti és áreán belüli kommunikáció strukturális alapjainak szerveződésére vonatkoztak. Ebben a fejezetben az agykérgi jelátvitel, beleértve a szinapszisok egy jól azonosítható populációját, rétegspecifikus szabályozásával kapcsolatos eredmények kerülnek bemutatásra.

# I. A TNAP agykérgi lokalizációja főemlősökben

## 1. TNAP enzimhisztokémiai-aktivitás az agyban

A nem szövetspecifikus alkalikus foszfatáz (TNAP) enzimhisztokémiai specificitását először a kémhatás változtatásával ellenőriztük agykérgi mintákon (61. ábra). Az optimális pH 9,5-s értéken (Bishayee és Bachhawat, 1972; Fedde és Whyte, 1990) korábbi munkák eredményeivel összhangban erőteljesen jelölődtek az erek (Hoshi és mtsi., 1997, Bannister és Romanul, 1963; Friede, 1966; Manocha, 1970; Bell és Scarrow, 1984; Fonta és Imbert, 2002). Az érfestés mellett az idegszövetben a neuropilben ugyancsak intenzív enzimhisztokémiai aktivitást (TNAP-aktivitás) detektáltunk (61A ábra). Semleges közegben (pH 7,5) a neuropil nem jelölődött, de az endotélium még gyenge TNAP-aktivitást produkált (61B,C ábra). Savas kémhatáson (pH 4,3) TNAP-aktivitást nem láttunk (61D ábra). Hasonlóképpen, az enzim gátlása (levamisole és EDTA; 61E ábra), valamint a szubsztrátum kihagyása (61F ábra) TNAP-aktivitást gátolta.

Főemlősökben, az agyban idegszövethez köthető TNAP-aktivitást csak az agykéregben találtunk; kéreg alatti struktúrákban, mint pl. a talamusz, striatum, colliculus superior és formatio hippocampalis, kizárólag az erek festődtek (62B,C ábra). Kivételt a retina jelentett, ahol idegszövethez köthető, fajspecifikus aktivitásmintázatot mutattunk ki (Kántor és mtsi., 2014).



**61. ábra** A TNAP enzimhisztokémiai kimutatása nitrokék-tetrazolium-klorid (NBT) és 5bromid-4-klorid-3-indolil-foszfát, 4-toluidin só (BCIP) (NBT-BCIP) jelöléssel a látókéregben, selyemmajomban. (**A**) Alkalikus környezetben (pH 9,5) TNAP aktivitás mutatható ki az érfalban és a neuropilben. (**B-D**) Semleges oldatban (pH 7,5; B panel, keretezett rész C-n kinagyítva) és savas közegben (pH 4,3; D panel) a neuropilben a TNAP aktivitás teljesen megszűnt, míg az érfalakban semleges pH-n még gyengén kimutatható. (**E**) Az enzim gátlásával (EDTA 1 mM és levamisole 10 mM) és (**F**) a szubsztrátum (BCIP) kihagyását követően TNAP aktivitás nem látható. V1/V2: elsődleges/másodlagos látókérgi área, szaggatott vonal: V1/V2 határ. Méretarány: 1 mm (A,B,D) és 0,25 mm (C).

A TNAP-aktivitás az agykéregben a neuropilben jellegzetes rétegeloszlás formájában, áreánként változó intenzitással jelent meg (62. ábra). Sejtek nem jelölődtek. Négy régióban tapasztaltunk kiemelkedően magas TNAP-aktvitást (62A ábra): 1) az occipitális lebenyben a primer látókéreg területén, 2) a temporális lebenyben a laterális sulcus hátsó falában ahol a hallókéreg található, 3) a parietális lebenyben a laterális sulcus és a félteke mediális fala közötti részen, ahol a szomatoszenzoros kéreg található és 4) a frontális lebenyben elülső részén (62B,C ábra). Ezen kívül erős, összefüggő TNAPaktivitást azonosítottunk az agykéreg felszínén (62. ábra).



**62.** *ábra* A TNAP-aktivitás eloszlása az agykéregben, selyemmajomban. (A) Paraszagittális metszetsorozaton TNAP-enzimhisztokémiával 3 erősen jelölődő kérgi területet lehet azonosítani: látó, halló és szomatoszenzoros. (**B**,**C**) Egyedi metszetek különböző medio-laterális síkokból, amin jól látható a TNAP erőteljes aktivitása a primer látókéregben (V1) az occipitális régióban, a szomatoszenzoros kéregben (Szom.) a parietális lebenyben, valamint a sulcus lateralis (LaS) hátulsó falán a hallókéregben (Audit.) a temporális lebenyben. Hasonlóan markáns TNAP aktivitást mutattunk ki a frontális régió elülső részében. D: dorzális, A: anterior, M: mediális irányok. Méretarány: 5 mm.

A TNAP-aktivitás lokalizációja céljából a TNAP-jelöléssel szomszédos metszeteken citokróm-oxidáz (CO) enzimhisztokémiai festést alkalmaztunk, ami széles körben elterjedt módszer a szenzoros kérgi áreák és rétegek azonosítására. V1-ben szelektív TNAP-aktivitás jelent meg az ugyancsak erős CO-aktivitással bíró 4A rétegben (63A ábra). Eltérően azonban a 4C rétegben homogén CO-aktivitástól, a TNAP aktivitást bilamináris mintázat jellemezte, erőteljesen jelölte a 4Cα réteg tetejét és a 4Cβ alját, de alacsony aktivitást produkált a kettő között (63A ábra). Ez a mintázat megfeleltethető az oldalsó térdestestből eredő talamokortikális afferentáció végződési mintázatának a 4C rétegben (Livingstone és Hubel, 1982).



**63. ábra** A TNAP-pozitív érzőkérgi területek és rétegek azonosítása citokróm-oxidáz (CO) aktivitásuk segítségével. (**A**) CO enzimhisztokémiával (bal oldali ábra) az elsődleges (V1) és másodlagos (V2) látókéreg közti határ a 4. réteg jelölődése alapján egyértelműen azonosítható (szaggatott vonal). A szomszédos metszetpáron végzett TNAP enzimhisztokémia (NAP, jobb oldali ábra) a CO-hoz hasonlóan a 4. réteg, különösen a 4C alréteg erőteljes jelölődését eredményezte. (**B,C**) A primer szomatoszenzoros (S1) és hallókéregben (Audit.) a CO-aktivitás szintén a 4. rétegben a legerősebb. A szomszédos metszeteken látható, hogy a TNAP-aktivitás ugyancsak a 4. rétegre lokalizálódik (NAP). A szaggatott vonalak a CO-aktivitás segítségével azonosított área határokat jelölik. Méretarány: 0,5 mm.

A parietális lebeny elülső részében azonosított, medio-laterális orientációjú, erősen TNAP-aktív sáv (62A ábra) ugyancsak erős CO-aktivitást produkált a TNAPpozitív réteggel átfedésben (63B ábra). A lokalizáció és a CO-festődés alapján a területet az SI szomatoszenzoros kéregként tudtuk azonosítani, valamint megállapítható volt, hogy TNAP-aktivitás a 4. rétegben látható (63B ábra). A 4. rétegi lokalizációt Nissl festéssel is megerősítettük (nem mutatjuk). Ettől a területtől rostrálisan a szemcsesejt réteg eltűnt, ugyanakkor megjelentek a motoros kéregre jellemző, acetilkolin-észteráz (AchE) pozitív Betz-sejtek (nem mutatjuk, Carlson és mtsi., 1986).

Hasonlóképpen, a laterális sulcus hátsó falában az erős TNAP-aktivitású területet erős CO-aktivitás is jellemezte (63C ábra). A CO-, valamint a nem prezentált AchE-aktivitás alapján a TNAP-aktív réteg a hallókéreg belső, mag régiójában a 4. rétegnek feleltethető meg (Morel és mtsi., 1993; Jones és mtsi., 1995; Hackett és mtsi., 2001).

# 2. Rétegeloszlás az emberi agykéregben

Az emberi agykéregben szintén erőteljes TNAP-aktivitást találtunk az idegszövetben és az endotéliumban (64. ábra). Hasonlóan a majom agykéreghez, a TNAP-aktivitást jól azonosítható rétegeloszlás jellemezte a neuropilben. Eltérően a majom agykéregtől a TNAP-aktív réteg az área határokon átnyúlva, látszólag megszakítás nélkül húzódott végig a középső-mély kérgi rétegekben. Ez a jellegzetes TNAP-aktivitás megjelent az occipitális lebenyben az área 17 és 19-ben, a pre-motoros kéregben (área 6), a dorzolaterális (área 9 és 46) és mediális (área 24 és 32) prefrontális kéregben, valamint az alsó temporális kéregben. Ezen kívül, ugyancsak a majomban megfigyeltekkel egyezően, erős TNAP-aktivitást észleltünk az 1. réteg legkülső részében. Emberben sem láttunk idegszövet-specifikus TNAP-aktivitást sejttesben és a fehérállományban.

Tekintettel arra, hogy emberben, az agykéregben a TNAP-aktivitás folytonos réteget képzett, meg kívántuk határozni ennek pontos lokalizációját primer szenzoros, és magasabb rendű asszociációs mezőkben egyaránt. V1-ben szomszédos metszeteken végzett Nissl és mielin festéssel a TNAP aktivitást a 4C rétegben lokalizáltuk (65A,B ábra). Érdekes módon az enzim aktvitással arányos optikai denzitás (OD) a TNAP-pozitív réteg alsó része felé, feltételezhetően a 4Cbéta alrétegben felerősödött. Lejjebb a 4/5 rétegek határán a TNAP-aktivitás ugrásszerűen visszaesett. A leírt mintázat minden esetben kimutatható volt V1-ben. A látókéreghez hasonló módon egy esetben az elsődleges szomatoszenzoros kéregben is azonosítottuk a TNAP-aktív kérgi réteget (nem mutatjuk). A postcentralis gyrusban, ára 3-ben szintén a 4. rétegben mértük a legerősebb a TNAP-aktivitást.



**64. ábra** TNAP enzimhisztokémiai kimutatása emberi agykéregben, koronális metszeteken. A különböző kérgi területekről származó mintákban az erekben tapasztalható aktivitás mellett a felszínnel párhuzamosan erős TNAP-pozitív csík fut a szürkeállomány mélyén, ill. középső részén. BA: Brodmann área. Nagyobb nagyításon, ill. ahol a felszín épen maradt, pl. temporális kéreg, megfigyelhető a kéregfelszín erős TNAP-pozitivitása. Méretarány: 500 μm.



65. ábra TNAP-aktivitás lokalizációja emberben a primer látókéregben. (A) Fentről lefelé: citoarchitektúra (Nissl festés), TNAP enzimhisztokémia és mieloarchitektúra kimutatása szomszédos metszeteken. Mindegyik festés réteges szerkezetet mutat. (B) Nissl festéssel (felső kép) a sűrűn jelölődött szemcse sejtek segítségével azonosított negyedik (szaggatott réteg vonalak között). A panel bal oldalán a réteghatárok jelölése látható (felszín fent). Α szomszédos metszeten (alsó kép) TNAP-aktivitás szintén а szaggatott vonalakkal határolt középső rétegeket jelölte. Fehér nyilak (jobb alsó sarok): egy nagy hosszanti metszetsíkjai a ér szomszédos metszeteken. (C) A TNAP-aktivitás

rétegeloszlásának meghatározása optikai denzitás (OD) mérésével. A három görbe a metszet 3 különböző részéről származó sűrűségértékeket mutatja a felszíntől (0% kérgi mélység, függőleges tengely) a fehérállományig (100% kérgi mélység). Az optikai denzitást a legnagyobb érték arányában adtuk meg (relatív OD, vízszintes tengely). A legerősebb TNAP-aktivitást 40%-60%-s kérgi mélységben detektáltuk. Ez a mélység megfelelt a Nissl festést követően ugyancsak optikai denzitásméréssel azonosított 4. rétegnek (szürke sáv). Méretarány: 2 mm (A), 200 μm (B).

Az elsődleges kérgi áreákhoz hasonlóan vizsgáltuk a TNAP lokalizációját asszociációs kérgi mezőkben, így a prefrontális kérgi área 46 és 9-ben, a premotoros área 6-ban, ill. a primer motoros mezőben, valamint a temporális kéregben. Eredményeinket a temporális kéreggel szemléltetjük (66. ábra). Az asszociációs kérgi áreákban a TNAP-aktivitás lokalizációja egymáshoz hasonló volt, ugyanakkor eltért az elsődleges szenzoros kéregben találttól.



66. ábra A TNAP-aktivitás réteg-lokalizációja а temporális kéregben, emberben. A TNAP jelölést középső ábrasor а mutatja, mellettük a **bal** ábrasoron a 4. réteg azonosítására alkalmas festéssel jelölt szomszédos metszetpárok láthatók: mielin kimutatása (A), Nissl festés (B) és SMI-32 neurofilamentum immunjelölés (C). A piros nyilak az illesztéshez használt struktúrákat jelölik a metszetpárokon. A 4. rétegben a szomszédos rétegekhez képest több mielinizált rost található (A), nagy a szemcsesejt sűrűség (B) és alacsony intenzitású SMI-32 а jelölődés (C). A TNAPpozitív rétea minden esetben а 4. réteg (szaggatott vonalak) alatt

jelent meg. A **grafikonok** a metszetpárokon látható jelölések intenzitásának rétegprofilját mutatják a 61C ábrán leírtak szerint. A 246 sz. esetből származó két különböző szövetmintán (246-1, 246-4) a TNAP-jelölés optikai denzitásértékeinek rétegeloszlása 3-3 metszeten mérve (fekete, szürke és üres háromszögek, ill. körök) (A,B). A szaggatott vonalak a metszetpárokon azonosított 4. réteg mélységét jelölik. A különböző mintákon a csúcsértékeket Nissl festéssel a kérgi mélység 48%-56%-a közt, míg TNAP-jelöléssel 52%-77%-a között találtuk. A 248-2 esetben (C) az SMI-32 jelölés intenzitásának csúcsértékei közül az alsó, aminek mélysége megfelel az 5. rétegi lokalizációjának (téglavörös markerek, 2 mérés értékei), átfedett a TNAP-pozitív réteglokalizációjával (kék markerek, 2 mérés értékei) a kérgi mélység 50-70% között. Ebben az esetben a 4. réteg a kéregvastagság 42%-49,5%-a közé esett. Méretarány: 200 µm. A 4. réteget azonosító mielin (66A ábra) és Nissl (66B ábra) festéseket alkalmazva megállapítottuk, hogy a szomszédos metszeteken a TNAP ez alatt az 5. rétegben fejtett ki jelentős aktivitást. Ezt a megfigyelést az SMI-32 neurofilamentum immunhisztokémia alátámasztotta. Az SMI-32 az irodalomból ismert adatokkal egyezően nagy koncentrációban volt jelen a 3. és 5. rétegi piramissejtekben, míg közöttük a 4. réteg gyengén jelölődött (Del Rio és DeFelipe, 1994) (66C ábra). A TNAP-pozitív sáv a gyengén jelölődő 4. réteg alatt húzódott ez esetben is. Több mintán, metszeten, ill. egy metszeten több különböző helyen mérve OD elemzéssel kvantitatív bizonyítékát is adtuk a TNAP 5. rétegi lokalizációjának (66A-C ábra). Az erős TNAP-aktivitást jelző OD értékek minden esetben a szomszédos metszeteken azonosított 4. réteg alatt csúcsosodtak. A kettős OD csúcsot produkáló neurofilamentum jelölés esetén a TNAP-aktivitás csúcs értékei a mélyebb, 5. rétegi alsó csúccsal fedtek át (66C ábra).

A TNAP-aktivitás OD méréssel azonosított rétegeloszlását a különböző kérgi áreákban a 67. ábra foglalja össze. Az előzőkben leírtak szerint az elsődleges látókérgi mezőt kivéve, ahol a TNAP-aktivitás a 4. rétegben a legerősebb (67A ábra), a többi áreában (67B-D ábra) a TNAP-aktivitás a 4. réteg alatt az 5. rétegben volt a legerősebb. Ugyancsak megfigyelhető a kéreg felszínén mért intenzív TNAP-pozitív réteg.



67. ábra A TNAP aktivitásmintázat rétegeloszlása különböző kérgi áreákban, emberben. Optikai denzitásértékek (OD)primer а látókéregben (A), а prefrontális kéregben (B) és két különböző esetben, 246 (C) és 248 (D) a temporális kéregben. A relatív távolságot a 4. rétea aljától (Nissl festéssel azonosítva), mint referencia ponttól (az abszcissza nulla pontja) mértük a kérgi vastagság arányában. Α felszínhez közelebbi rétegeket növekvő negatív értékek jelölik, míg a nagy pozitív értékek a mély rétegeket jelölik (a tengelyek hossza minden esetben -0,8 -0,6 intervallum, 0,2-s lépésközzel). A függőleges tengelyen a lépésköz 0,05 (A,B) és 0,1 (C,D). Az egyes vonal típusok a metszet különböző területeiről (A), különböző metszetekről (B), ill. a temporális kéregből származó különböző mintákból (C; több metszet/blokk) származó mérési adatokat jelölnek. (D) Az SMI-32 (folytonos vonal) és a TNAP (szaggatott vonal) jelölésből származó

adatok együtt ábrázolva. A hosszan szaggatott vonal egy metszetről származó két mérést mutat, a röviden szaggatott vonal 3 szomszédos metszet adatait jelöli. A görbéket mozgóátlaggal simítva (ablakméret: 3 pont) illesztettük az adatokra.

# 3. Szubcelluláris lokalizáció

A TNAP-aktivitást szubcelluláris szinten ólom-citrát jelöléssel mutattuk ki, ami a szemcsés csapadékképződés miatt viszonylag jó lokalizációt tesz lehetővé. Kísérleteink végzésekor megfelelő specificitással rendelkező, a pontosabb lokalizációt lehetővé tevő antitest nem állt rendelkezésre. Hasonlóan az NBT-BCIP festéshez (61. ábra), az ólomcitrát jelölés is erős TNAP-aktivitást eredményezett az erek falában, ill. ezen kívül az idegszövetben, mely mintázat a szubsztrát kihagyásával, ill. az enzim gátlásával teljesen eltűnt (68. ábra).



68. ábra TNAP enzimhisztokémiai kimutatása ólom-citrát ielöléssel elektronmikroszkópos (EM) szinten a V1-ben selyemmajomban. (A) TNAP-pozitív kapilláris keresztmetszete a szürkeállomány mély rétegéből. Mind az endotélium, mind pedig az abluminális felszín erősen jelölődött. Érdemes megfigyelni a TNAP-aktivitás hiányát a neuropilben. (B) A kapilláris hosszmetszetén megfigyelhető jelölés mellett erős TNAP-aktivitás látható a környező fehérállományban is. (C,D) Kontroll kísérletekben TNAP-aktivitás nem figyelhető meg. Kapilláris kereszt (C, szürkeállomány), és hosszmetszete (D, fehérállomány) a TNAP szubsztrátjának (6-glycerofoszfát) kihagyásával (C) és az enzim gátlásával (EDTA és levamisole) (D). Méretarány: 500 nm (A,D), 16 μm (B,C).

A fénymikroszkópos megfigyelésekkel egybehangzóan a TNAPenzimhisztokémia EM szinten is a középső, granuláris rétegben eredményezett erős jelölést (69. ábra). V1-ben a 4C rétegben a TNAP-aktivitást jelző ólom szemcsék nagy sűrűségben akkumulálódtak az idegsejtnyúlványok körül, azokat körberajzolva (69B ábra). A felsőbb és alsóbb rétegekben csupán gyenge enzimaktivitást detektáltunk (69A,C ábra). Az EM és FM enzimhisztokémia tehát konzisztens jelölést eredményezett.



69. ábra TNAP-aktivitás ultrastrukturális szinten V1-ben. (A) Az elszórtan megjelenő csapadékkal jelzett gyenge aktivitás (és/vagy aspecifikus precipitáció) а szupragranuláris rétegben. (B) A sűrű csapadékkiválás a neuropilben erős TNAP-ativitást jelez az extracelluláris térben a szemcsesejt rétegben. A szinaptikus kapcsolatokat kiemelkedően magas TNAP-aktivitás könnyen azonosíthatóvá teszi. (C) A szupragranuláris réteghez hasonló alacsony TNAPaktivitás, ill. háttérjelölés infragranuláris az rétegben. Méretarány: 500 nm, mindegyik ábrára alkalmazva.

A neuropilben a TNAP-aktivitás a jelölt struktúrák felszínén, a szűk extracelluláris térben volt a legerősebb (70. ábra). Ez a lokalizáció megfelel az ismereteinknek, miszerint a TNAP a sejtmembránhoz kötött ektoenzim (Low és Saltiel, 1988). A szinaptikus kapcsolatok különösen erősen jelölődtek, ami legjobban a szinaptikus rés tangencionális metszési síkjában volt látható (70A ábra). A PSD vastagsága alapján elkülöníthető 1. típusú, serkentő jellegű (70A,E,F ábra) és 2. típusú, gátló jellegű (70B–D ábra) szinapszisok egyaránt jelölődtek. Megfigyeltünk a GABAerg végződésekre jellemző TNAP-pozitív, 2. típusú boutonok által létesített axoszomatikus szinapszisokat is (70B,C ábra). Továbbá, amennyire a morfológia alapján megállapítható volt, gliális jelölést nem láttunk.

Intracellulárisan csapadék képződést főleg a sejtmag heterokromatikus állományában láttunk (nem mutatjuk). Sejten belül, ha volt, az extracellulárisnál jóval gyengébb, kisebb szemcsés jelölés látszott (70. ábra).



**70. ábra** TNAP-aktivitás szubcelluláris lokalizációja V1-ben a 4C rétegben. A neuropilben a sejtnyúlványok körül az extracelluláris jelölés a szinapszisokban volt a legerősebb. (**A**) Szinapszisok kereszt- (nyílhegyek) és tangencionális (nyíl) metszete. (**B-D**) Szimmetrikus, gátló jellegű axoszomatikus (B,C) és axodendritikus (D) szinapszisok (nyilak). A fémcsapadék megfigyelhető mind a pre- és a posztszinaptikus struktúrák felszínén, de legnagyobb sűrűségben a szinaptikus résben. Képkivágás: a (B) ábrán mutatott szinapszis nagyobb nagyítással. (**E,F**) Kerek vezikulumokat tartalmazó axonvégződések serkentő jellegű, aszimmetrikus szinaptikus kapcsolatai. A reakciótermék legerősebben ez esetben is a szinaptikus résben halmozódott fel.



**71. ábra** A TNAP-aktivitás lokalizációja a fehérállományban V1-ben selyemmajomban a születés után 3 héttel. (**A**) TNAP-aktivitás kizárólag a mielin mentes, csupasz axon nyúlványok körül látható. A velőshüvely TNAP-negatív. Az axonokra jellemző gazdag mikrotubulus tartalom megfigyelhető mind a velőshüvelyes, mind a csupasz nyúlványokban. (**B**) Nagy nagyításon látható, hogy a TNAP-aktivitást azonosító csapadék csak az axon nyúlvány mielin mentes, csupasz felszínén jelenik meg. A mielinnel borított felszín nem jelölődött. Nyilak: a milein borítás szélei. Méretarány: 500 nm (A), 200 nm (B).

Ugyancsak erős TNAP aktivitást mutattunk ki a részlegesen mielinizált fehérállományban (71. ábra). Fiatal állatban EM-al a fehérállományban TNAP aktivitást kizárólag a mielinnel nem borított, csupasz axon szegmensek extracelluláris felszínén lehetett kimutatni (71. ábra). Részlegesen mielinizált axonokon a TNAP aktivitás és a mielin borítás egymástól elkülönült (71B ábra). Fontos észrevétel, hogy az axonok felszínén a TNAP aktivitás és a mielin borítás komplementer elrendeződése a mielinhüvely kialakulása után is megmaradt, ugyanis erős TNAP aktivitás csak a Ranvier-befűződésben volt felnőtt állatokban (72. ábra). Sorozatmetszeten jól megfigyelhető, hogy TNAP aktivitás csak a befűződésben volt, a para- és internodális szakaszok TNAP-negatívak voltak (72. ábra).



**72. ábra** TNAP-aktivitás lokalizációja a Ranvier-befűződésben sorozatmetszeten, V1-ben a fehérállományban, felnőtt selyemmajomban. A tangencionális metszési síkon a TNAPaktivitást jelző csapadék csak a nyilakkal jelölt Ranvier-befűződésben látható a csupasz axon szegmens mentén (E-G). A TNAP-aktivitás a befűződés kezdetén jelenik meg (C,D). A fekete nyílhegyek és fehér nyilak közötti paranodális régió, a jellegzetes oligondendrocita citoplazma hurkokkal, valamint a befűződések közötti internodális velőshüvelyes szegmensek nem jelölődtek. Csillag: axon dudor. PNM2: születés utáni 2. hónap. Méretarány: 500 nm, érvényes az összes panelre.

# II. A TNAP szerepe az idegsejt aktivitás szabályozásában

## 1. A TNAP neurális aktivitásfüggő működése

A primer szenzoros áreák 4., talamorecipiens rétegének magas TNAP aktivitása felvetette a kérdést, hogy az átfedő réteg-lokalizációjú citokróm-oxidáz (CO) enzimhez hasonlóan a TNAP enzimaktivitását is szabályozza a talamo-kortikális afferentáció aktivitása. A kérdést tetrodotoxin (TTX) egyik szemet célzó, egyszeri intraokuláris injekciójával kívántuk megválaszolni V1-ben, rézusz majomban. Öt nappal a TTX injekciót követően az addig homogén (63A ábra) TNAP aktivitás foltossá vált a 4.

rétegben (73A ábra). A kiterített látókéregből tangencionálisan készített szomszédos metszeteken a TNAP és CO aktivitás megegyező csíkos mintázatot produkált (73B,C ábra). A CO aktivitásmintázat alapján megállapítottuk, hogy a TNAP aktivitás az okuláris dominancia oszlopok elrendeződése szerint változott, azaz csökkent a deprivált szem reprezentációjában és változatlan volt az intakt szem okuláris dominancia oszlopaiban (Horton és Hocking, 1998).

Annak eldöntésére, hogy a TNAP aktivitás csökkenését nem a TTX egyéb, nem az idegi aktivitást blokkoló hatása okozta, mint pl. glikoproteinek anterográd transzportjának gátlása (Riccio és Matthews, 1985), 2 hetes monokuláris deprivációt alkalmaztunk opak lencsével és a szemrés levarrásával fiatal (67 napos) selyemmajmokban (Fonta és mtsi., 2000). A szenzoros depriváció a TNAP aktivitás TTX kezeléshez hasonló kolumnáris mintázatát eredményezte a 4C rétegben V1-ben (73D ábra). A TNAP aktivitás csökkenése a 4C $\alpha$  és  $\beta$  alrétegekben identikus mintázatban változott, ami ugyancsak a monokuláris depriváció hatását bizonyította. Mivel a CO aktivitást ilyen rövid idejű szenzoros depriváció nem befolyásolja (Fonta és mtsi., 1997), a TNAP az afferens aktivitás érzékenyebb indikátorának bizonyult.



**73. ábra** Az érzékszervi bemenet hatása a TNAP-aktivitásra V1-ben. (**A-C**) Tetrodotoxin intraokuláris injekciójával előidézett monokuláris depriváció hatása a TNAP- (NAP) és citokróm-oxidáz (CO) aktivitásra a 4C rétegben rézusz majomban. (A) Csökkent TNAPaktivitás az injektált szem okuláris dominancia oszlopaiban (piros nyílhegyek) paraszagittális metszeten. (B) A egyoldali retinális aktivitás blokkolásával gátolt CO és TNAP-aktivitás által kirajzolódó okuláris dominancia oszlopok (folyt.)

tangencionális metszeteken. A szomszédos metszetekről készített rajzokon látható, hogy a CO és TNAP (AP) jelölés mintázata tökéletesen átfedett. (C) A CO és TNAP-aktivitás átfedő mintázata kinagyított részleten. Fekete kötök: azonos érek keresztmetszetei. (**D**) Két hetes, opak lencsével és szemhéjlevarrással előidézett monokuláris depriváció hatása a TNAP-aktivitásra selyemmajomban. Piros nyílhegyek: a deprivált szem okuláris dominancia oszlopaiban lecsökkent TNAP-aktivitás V1 keresztmetszeti képein. Méretarány: 0,5 mm.

#### 2. A TNAP szerepe a mielinizációban és a szinaptogenezisben

A TNAP Bevezetőben említett idegrendszeri fejlődésben játszott szerepe és az előzőkben ismertetett lokalizációja az ingerület terjedés szempontjából kritikus helyeken felvetette a kérdést az enzim mielinizációban és szinaptogenezisben játszott szerepét illetően. A kérdésre a TNAP génre null-mutáns (TNAP-KO) és vad (WT) egerek összehasonlításával kívántunk választ adni. A TNAP-KO egerek csupán a születést követő 1-2 hétben életképesek, így kutatásunkat is erre az időszakra kellett szűkíteni, a prenatális terminust nem vizsgáltuk. A TNAP mielinizációban játszott szerepét a gerincvelőben tanulmányoztuk, ahol ez a folyamat már születés előtt elkezdődik és jóval előrébb tart, mint az agykéregben, ahol a mielinizáció csak a születés után indul a rágcsálókban (Coffey és McDermott, 1997; Foran és Peterson, 1992). Ezzel szemben az agykéreg a szinaptogenezis tanulmányozására megfelelő struktúra, hiszen ez a folyamat az emlősökben, beleértve az egeret (Li és mtsi., 2010) a postnatális életkorban zajlik.

## a. A gerincvelő összehasonlító morfológiája a génmódosított állatokban

A TNAP-KO egerekben szembetűnő makroanatómiai elváltozást a gerincvelőben nem láttunk (74A ábra). A fehérállomány százalékos arányát 7 különböző postnatális napon (P1, P2, P4, P6, P7, P8 és P10) mértük mielin festés segítségével, állatonként több gerincvelői keresztmetszeten WT és TNAP-KO egerekben (2. táblázat, 74A ábra). Mindkét csoportban a gerincvelő keresztmetszeti területe az életkorral arányosan növekedett (lineáris regresszió, p << 0,01, WT: r = 0,86; KO: r = 0,83) (74B ábra). A töretlen növekedés eredményeként a gerincvelő keresztmetszeti területe P10-ben TNAP-KO egerekben 1,6-szor, a WT csoportban 1,7-szer nagyobb volt, mint P1-ben (74B ábra). A génmódosítás ugyanakkor hátráltatta a gerincvelő növekedését, amint azt a vad kontrolhoz képest kisebb meredekségű egyenes mutatja TNAP-KO egerekben (74B ábra). A 74B ábrán az is látszik, hogy a növekedésbeli lassulás P4 után vált igazán nyilvánvalóvá. Ezzel összhangban P6-P10 adatokat együtt véve TNAP-KO állatokban a gerincvelő keresztmetszeti területe szignifikánsan kisebb volt, mint a vad csoportban (p = 0,014, Mann–Whitney U próba). Ezzel szemben P1-P4 korban a gerincvelő keresztmetszeti területe a TNAP-KO és a WT csoportban hasonló volt (p = 0,85, Mann–Whitney U próba).



**74. άbra** A fehérállomány méretének alakulása a születést követő 10 napban vad (WT) és TNAP génre null-mutáns (KO) egerekben. (**A**) A gerincvelő nyaki szakaszának keresztmetszete 8 és 10 nappal (P8 és P10) a születés után a kétféle egérben. A felső képek mielin festéssel az alsó bal oldali krezil kék, mellette jobb oldalon pedig TNAPhisztokémiával készültek. Megfigyelhető a szürkeállomány erős TNAP-aktivitása. A fehérállományban a TNAP-aktivitás rostos szerkezetben látható. A ventrális irány lefelé mutat. Méretarány: 200 μm. (**B**) A gerincvelő teljes keresztmetszeti területének változása az életkorral milein festéssel kezelt metszeteken. A szimbólumok egyedi állatokat jelölnek. Háromszögek: WT, körök: KO. A kis, kitöltött körök és háromszögek az alakjuknak megfelelő állatcsoport átlagait mutatják. Az illesztett egyenesek WT esetén folytonos vonallal, KO esetén szaggatott vonallal jelölve. (**C**) A fehér- és szürkeállomány növekedési üteme P1 és P10 között. Az ábrán a növekedési rátát a (P10-P1)/P1 területaránnyal határoztuk meg. (**D**) A fehérállomány arányának változása az életkorral. A jelölés megegyezik a (B) ábránál leírtakkal.

A fejlődés során a fehér, és szürke állomány külön mért keresztmetszeti területe egyaránt nőtt (74C ábra). A szürke állomány hasonló növekedési arányt produkált a vad (52%) és a TNAP-KO (50%) állatokban. Ettől eltérően a fehérállomány nagyobb arányban növekedett a vad (117%), mint a génmódosított (83%) állatokban és a növekedés üteme erősen korrelált a teljes gerincvelői keresztmetszet területének

életkorral arányos növekedésével (vad: r = 0,98, KO: r = 0,86). A fehérállomány keresztmetszeti területe egyenes arányban változott az életkorral mindkét csoportban (lineáris regresszió, p < 0,01, vad: r = 0,8; KO: r = 0,7) (74D ábra). Ugyanakkor a fehérállomány növekedése lassabb volt a TNAP-KO, mint a vad állatokban, ami az egyenesek eltérő meredekségén látszott (KO: 0,7, vad: 1,4). A növekedési ütemben megfigyelt különbség különösen P4/P6 életkortól vált szembetűnővé.

A gerincvelői fehérállomány finomszerkezete felületes ránézésre normálisnak tűnt kivéve, hogy az axonok keresztmetszeti képe meglehetősen szabálytalan volt a TNAP-KO állatokban a kontroll vad típussal összehasonlítva (75A-D ábra). Összesen 100877 véletlenszerűen kiválasztott axont számoltunk meg, 41641-et a KO-ban és 59236ot a WT-ben. Az alaposabb vizsgálathoz az axonokat mielinizáltságuknak megfelelően 3 típusba soroltuk: I típusú rostokat citoplazmát tartalmazó oligodendrocita nyúlványok borították, II típusú rostok esetén az oligodendrocita nyúlványokat már egy kompakt, lamellás mielinhüvely is borította, a III típusú rostokat pedig az érett velőshüvelyre jellemző kompakt, lamellás mileinhüvely burkolta (75A-E ábra). Elektronmikroszkópos mérésekkel kimutattuk, hogy a velőshüvelyes axonok (II és III típusok, 75E ábra) száma KO állatokban lényegesen kisebb volt P2-ben és csak fokozatosan érte el a WT csoportban mért szintet P8 életkorra (75F ábra, 15. táblázat). A különböző mielinizáltságú axonok (75E ábra) száma és aránya eltérően változott a két csoportban (75F ábra). P2 életkorban a II és III típusokat is magába foglaló velőshüvelyes axonok (nem számítva az I típusba tartozó rostokat) aránya vad típusban (20%) a KO (10%) duplája volt. A WT csoportban a velőshüvelyes axonok (II és III típusok együtt) több, mint 92%-a a II típusba tartozott, míg KO állatokban nem találtunk érett velőshüvelyes axonokat (75F ábra). P8 életkorban a velőshüvelyes axonok aránya hasonló volt a WT (80%) és KO (77%) csoportokban. Ezzel szemben a III típusba tartozó rostok aránya a vad kontrollban (27%) duplája volt a KO (14%) állatokban mérthez képest, ami megkésett mielinizációra utalt a génmódosított állatokban (75F ábra).

A mielinizációt a g-aránnyal jellemeztük, ami maga az axon (A jelzéssel a 73E ábrán) és a teljes velőshüvellyel borított axon keresztmetszeti területeinek hányadosa az értékek négyzetgyökével számolva. A g-arányt I és II típusba sorolt rostoknál az oligodendroglia nyúlványokkal (O jelzéssel a 75E ábrán), míg a II és III típusba sorolt rostoknál az érett velőshüvellyel (M jelzéssel a 75E ábrán) borított axonokra számoltuk. Születés után 7 nappal (P7) a g-arány mindhárom axon típusban jelentősen eltért a WT és TNAP-KO egerek között. Az I típusba tartozó axonok esetén az arány génmódosított egerekben 0,7-re nőtt a vadban számolt 0,67-ről (p = 0,002, egytényezős ANOVA). Hasonló változást tapasztaltunk a II típusba tartozó axonoknál, ahol a g-arány a WT csoport 0,71-es értékéről nőtt a TNAP-KO csoport 0,73-as értékére (p = 0,02, egytényezős ANOVA). Ezzel ellenkező irányú változást mutattunk ki a III típusba tartozó axonoknál, ahol a g-arány a WT-ban mért 0,78-ról csökkent a TNAP-KO-ban mért 0,76ra (p << 0.01, egytényezős ANOVA). Az I típusba tartozó axonok esetén a két csoport közötti eltérés a TNAP-KO-ban vékonyabb oligodendrocita nyúlványoknak volt köszönhető (KO: 0,53±0,37 µm2, WT: 0,84±0,9 µm2; p << 0.001, t-próba). A III típusban viszont az axon keresztmetszete volt kisebb KO-ban, mint WT-ben (KO: 1,68±0,85 µm<sup>2</sup>, WT: 1,96±0,96 µm<sup>2</sup>; p = 0,048, t-próba), a mielin hüvely keresztmetszeti területe nem különbözött a két csoport között. A II típusú rostok esetén az axon keresztmetszeti területe valamivel nagyobb volt TNAP-KO-ban, mint WT-ben, de a különbség statisztikailag nem volt szignifikáns.

A méretbeli eltérések mellett TNAP-KO állatokban gyakran találtunk sejtes degradációra utaló jeleket (lizoszómák, endoszómák, multivezikuláris test) a Ranvierbefűződések para- és juxtanodális régiójában az oligodendrocita nyúlványok citoplazmájában (nem mutatjuk).

Összefoglalva, a TNAP gén inaktivációja a gerincvelőben P4 után jelentősen csökkentette a fehérállomány mennyiségét a velőshüvelyes rostok részarányának csökkenésével, a mielin hüvely elvékonyodásával, az axon méret csökkenésével, valamint a mielin degradációjával a Ranvier-befűződések körül.

**15. táblázat**. Az axonok száma a 3 elektronmikroszkópiával azonosított típusban gerincvelői keresztemtszeken (1 állat/életkor). WT: vad típus, KO: TNAP gén (Akp2<sup>-/-</sup>) inaktiváció

	WT				KO			
Axon típus	Ι	II	III	Össz.	Ι	II	III	Össz.
P2	1341	305	26	1672	493	54	0	547
P7	40912	5209	1057	47178	25353	3737	1656	30746
P8	2085	6069	2232	10386	2355	6854	1139	10348
Össz.	44338	11583	3315	59236	28201	10645	2795	41641



75. ábra Velőshüvelyes rostok a gerincvelőben, vad (WT) és (KO) ТNAP-КО állatokban születés után 2 (P2) és 8 (P8) nappal. Fény-(A,B) és elektronmikroszkópos (C,D,E)képek a funiculus ventralisból, 8 napos egerekből. Félvékony (A,B) és ultravékony (C,D) metszetek uqyanazon műgyantába ágyazott mintából WTP8 (A,C) és KOP8 (B,D) állatokból. (A,B) Toluidin-kék azúr II festéssel a mielinhüvely erősen jelölődő, körszerű alakzatok formájában azonosítható. (C,D)Α vad típushoz hasonlítva állatokban génmódosított а velőshüvelyes rostok szabálytalan alakúak. Az eltérő mielinizáltságú axonokat I, II és III jelöléssel 3 típusba soroltuk. (E) A (C)-n mutatott terület nagyobb nagyításban. M: milein, O: oligodendrocita nyúlványok, A: axon. (**F**) A TNAP qén inaktiválásának hatása а velőshüvelyes rostok típusainak (II és III osztályok) részarányára 2

és 8 napos korban. Méretarány: 10 μm (A,B) és 500 nm (C,D,E).

b. Az agykéreg összehasonlító morfológiája a génmódosítást követően

A parietális kéreg rétegszerkezete egyetlen vizsgált korcsportban (P2, P7, P8) sem tűnt lényegesen eltérőnek a TNAP-KO és a WT csoportokat összehasonlítva (76A,B ábra). Ezzel szemben ultrastrukturális elváltozások a velőshüvely és a szinapszisok kialakulásának zavarát jelezték TNAP-KO állatokban. A továbbiakban a szinaptikus elváltozásokra fokuszálunk.



**76. ábra** Az agykéreg rétegzettsége. (**A**) vad típusú (WT) és (**B**) génmódosított (TNAP-KO) egerek toluidin-kék azúr II festéssel készült félvékony metszetein 2 napos (P2) korban. Méretarány: (B) 250 μm, érvényes (A)-ra.

P2 állatokban sem a WT, sem pedig a TNAP-KO csoportban nem találtunk szinaptikus membrán specializációval rendelkező kontaktusokat. Ezzel szemben P7 és P8 állatokban számos szinaptikus kapcsolatot azonosítottunk mindkét kísérleti csoportban (77A,B ábra). A szinapszisok ultrastruktúrájában ugyanakkor lényeges különbségeket azonosítottunk: a WT-hoz képest a TNAP-KO állatok agykérgében a pre- és posztszinaptikus membránspecializáció és a szinaptikus vezikulumok megléte, sűrűsége és eloszlása az esetek nagy hányadában kialakulatlan volt (77A,B ábra). Tizennyolc szinapszis (11 TNAP-KO és 7 WT) P7 állatokban készített sorozatmetszete azt is kimutatta, hogy a membránspecializáció a TNAP-KO állatokban jóval kisebb (átlagban 2,5 metszet kiterjedésű), mint a WT egerekben (átlagosan 5,7 metszet kiterjedésű) (77C-F ábra).

**77. ábra** (következő oldal) Az agykéreg szinaptikus szerveződése vad (A,C,E) és TNAP-KO (B,D,F) egerekben P7-ben. (**A**,**B**) Nyilakkal jelölt szinapszisok az érett szinapszisokra jellemző struktúrákkal. Képkivágás: éretlen szinaptikus struktúrák kifejlett membrán specializációval és szinaptikus réssel (nyilak), de a szinaptikus vezikulumok hiányával KO egerekben. (**C**,**D**) Érett és éretlen szinapszisok közötti ultrastrukturális különbségek szemléltetése 3D rekonstrukciókon. Világos árnyalat: posztszinaptikus dendrit, sötétebb árnyalat: preszinaptikus axonvégződés, sötét körök: szinaptikus vezikulumok. A szinaptikus membrán specializációt fekete szín jelöli. KO állatokban kisméretű membrán specializáció és ritkán előforduló szinaptikus vezikulumok találhatók. (**E,F**) A 3D rekonstrukcióhoz használt sorozatok 1-1 metszete, amin a szinapszis strukturális specializációja a legkifejezettebb volt. A nyilak a grafikus rekonstrukciók és a metszetek egymásnak megfelelő részeit kötik össze. Nyílhegy: szinaptikus membrán specializáció, a: axonvégződés, d: posztszinaptikus dendrit. Méretarány: (A,B) 1 μm, (képkivágás, E,F) 500 nm.



A fenti megfigyelések alapján a szinapszisokat fejlett és éretlen kategóriákra osztottuk (77C-F ábra), hogy az arányukat a két állatcsoportban összehasonlíthassuk. Az összehasonlítás a fejlett szinapszisok arányának csökkenését eredményezte TNAP-KO egerekben (78. ábra, 16. táblázat). A különböző korú állatok adatait együtt véve kétszempontos ismétléses ANOVA megerősítette, hogy a génmódosítás lényeges hatással bírt az érett és éretlen szinapszisok számának alakulására (p = 0,03). A post hoc összehasonlítás alátámasztotta az ANOVA eredményét, bizonyítva a fejletlen szinapszisok nagyobb számát a fejlettekéhez képest TNAP-KO egerekben (p = 0,03, t-próba) (16. táblázat). A WT egerekben a fejlett és fejletlen szinapszisok száma kiugróan alacsony volt, ami az adatok nagy szórását eredményezte a WT csoportban (16. táblázat).

Eset	Érett	Fejletlen	Össz.	Eset	Érett	Fejletlen	Össz.
P7WT339	191	190	381	P7KO337	125	169	294
P7WT341	168	132	300	P7KO340	103	131	234
P8WT	176	89	265	P8KO	110	166	276
Átlag	178,3	137,0	315,3	Átlag	112,6	155,3	268,0
±szórás	±11,7	±50,7	±59,5	± szórás	±11,2	±21,1	±30,8

**16. táblázat**. Az érett és fejletlen szinapszisok száma 7 és 8 napos (P7 és P8) vad (WT) és génkiütött (KO) állatok agykérgében. sd: szórás



**78. ábra** Az érett szinapszisok aránya P7 (2-2 állat, kör) és P8 (1-1 állat, négyszög) napokon vad típusú (WT) és TNAP-gén inaktiválást (KO) követően egerekben.

#### 3. A TNAP szerepe a másodlagos jelátvitelben, idegsejtekben

a. A TNAP pozíciója a szignáltranszdukciós hálózatban

A TNAP neurotranszmisszióban játszott szerepének megértéséhez megvizsgáltuk a molekuláris interakcióit a hippokampális piramissejt Ma'ayan és mtsi. (2005) által leírt másodlagos jalátviteli hálózatában. Bár a szubcelluláris lokalizáció szűkíti a TNAP lehetséges molekuláris interakcióinak számát az idegsejtekben, tanulmányunkban abból az alapvetésből indultunk ki, hogy a TNAP intracelluláris lokalizációja pontosan még nem ismert. Adatbázisok segítségével a hálózatot sejt típustól függetlenül kiegészítettük a TNAP ismert, idegsejtekben is megtalálható molekuláris interakcióival (17. táblázat). Számos közvetett kölcsönhatást kihagytunk az elemzésből, kivéve kettőt: a mitogénaktivált protein kinázzal (MAPK) és az M1R muszkarinos acetilkolin receptorral. A MAPK a TNAP-ot a csont morfogenetikus fehérjén (BMP) és a SMAD-on keresztül szabályozza, ahogy azt oszteoblasztokban kimutatták (Osyczka és Leboy, 2005). Sajnos az elemzésekbe bevont SMAD-okkal ellentétben a BMP-t nem lehetett integrálni a piramissejt molekuláris jelátviteli hálózatba, mivel a felhasznált adatbázisokban nem találtunk erre adatokat. A MAPK azonban kitüntetett fontossággal bír a neuronális funkciók szabályozásában. Emiatt és figyelembe véve a MAPK és a TNAP közötti szoros kapcsolatot (Osyczka és Leboy, 2005), e kölcsönhatás hozzáadásával jövőbeli vizsgálatokat inspiráló eredményekre számíthattunk. Az M1R-kölcsönhatást illetően a rendelkezésre álló irodalmi adatok arra utalnak, hogy a TNAP a hiperfoszforilált *tau* defoszforilálásával szabályozza e receptor működését (Diaz-Hernandez és mts., 2015; Kellett és Hooper, 2015). Ugyanakkor ismert az ektofoszforilációs helyek fontossága a receptorok és ioncsatornák működésének szabályozásában (Redegeld és mtsi., 1999), és érdekes kérdés volt ennek fontosságát feltárni a jelátviteli hálózatban. E kérdés vizsgálatára a TNAP - M1R interakcióját használtuk fel példaként, miután a M1R rendelkezik extracelluláris foszforilációs hellyel és a TNAP közvetve, a *tau*-n keresztül is kapcsolatban áll vele. Így a hálózat korlátozott módosításával (egy él hozzáadásával) kívántuk jobban megérteni egy lehetséges interakció jelentőségét.

Forrás	ID	Cél	ID	PubMed ID
TNAP	P05186	EGFR	P00533	10585492
TNAP	P05186	GABAAR	P14867	1335848
TNAP	P05186	M1R	P11229	20634292
TNAP	P05186	D1R	P21728	21803776
TNAP	P05186	AMPAR	P42262	18665261
TNAP	P05186	TAU	P10636	20634292
TNAP	P05186	NIK	Q99558	15208311, 21173796
TNAP	P05186	P2X7	Q99572	21289095
TNAP	P05186	PLP	NA	7550313
TNAP	P05186	ADENOSIN	NA	22761898
TNAP	P05186	AMP	NA	22761898
TNAP	P05186	ADP	NA	19008000
TNAP	P05186	ATP	NA	19008000
SLC30A7	Q8NEW0	TNAP	P05186	15525635
MAPK	P28482	TNAP	P05186	15905316
P2X7	Q99572	TNAP	P05186	21289095
FIVEHT2	BR P41595	TNAP	P05186	20573958

**17. táblázat**. A TNAP-al reagáló molekulák, valamint összeköttetéseik, melyeket a Ma'ayan és mtsi. (2005) által piramissejtben leírt másodlagos jelátviteli hálózatba illesztettünk. ID: UniProt katalógusszám.

A TNAP lehetséges partnereiként azonosított új molekulák és ezzel együtt az élek hozzáadása nem változtatta meg számottevően a hippokampális piramissejt jelátvivő hálózat átmérőjét és átlagos úthosszát (18. táblázat). Az átlagos fokszám és a csúcsköztiség index sem változott lényegesen a hálózat frissítését követően. Az élköztiség viszont valamelyest csökkent az új komponensek hozzáadásával, ami marginális helyzetű interakciók megjelenésére utal a hálózat bővítésével. Hasonlóan, a klaszterezési együttható (ld. tranzitivitás a 18. táblázatban) is csökkent kismértékben a hálózat kiegészítése után. A tranzitivitás és az élköztiség értékek, ill. kisebb mértékben az élsűrűség csökkenése kevésbé "behuzalozott" molekulák jelenlétére utal a kibővített hálózatban. A fokszám és köztiség centralitások eloszlása hasonló volt a kiinduló és a kiegészített hálózatokban (utóbbit a 79A-C ábra mutatja).

**18. táblázat**. Az eredeti és a frissített hálózatok általános tulajdonságainak összehasonlítása.

	Eredeti	TNAP-al*
Csúcsok száma	551	563
Élek száma	1806	1839
Sűrűség	0,006	0,0058
Átmérő	20	20
Átlagos úthossz	5,9	6,1
Tranzitivitás (lokális, átlag)**	0,147	0,143
Tranzitivitás (globális)**	0,0576	0,0567
Be-fok (átlag)	2,30	2,32
Ki-fok (átlag)	2,30	2,32
Csúcsköztiség (átlag)	1773,6	1780,01
Élköztiség (átlag)	602,06	485,14

\*: Az összes új molekulával és kapcsolataival együtt.

\*\*: A hálózat szimmetrikussá tételével kapott irányítatlan hálózatban.

**79. ábra** (következő oldal) A TNAP pozíciója a másodlagos jelátviteli hálózatban. (**A**) Fokszám centralitás eloszlások. Be: bemenő élek száma, Ki: kimenő élek száma. Összehasonlításként a TNAP be- és kimenő fokszámait a folytonos és szaggatott egyenesek mutatják. (**B**) A csúcsköztiség (NB) értékek eloszlása. Az egyenes a felső kvartilist (fQ) mutatja. (**C**) Az élköztiség (EB) értékek eloszlása a hálózatban. Az egyenesek a felső (fQ), és alsó (aQ) kvartiliseket mutatják. Az aQ ráfekszik az abszcisszára. (**D**) A TNAP interakcióit reprezentáló élek konvergenciafoka (CD) és átfedés indexe (O<sub>d</sub>). A TNAP interakcióinak irányát a molekulák elé (kimenet), ill. után (bemenet) írt '>' mutatja.



A centralitást tekintve a TNAP a vizsgált mértékekben eltért a hálózat átlagos vagy medián értékeitől (19. táblázat). A TNAP fokszáma, ami egy lokális centralitás mérték, mindkét irányban, de különösen a kimenetek számában meghaladta a hálózat megfelelő átlag értékeit. Ezzel együtt a TNAP fokszámai elmaradtak a hálózatban található legnagyobb értékektől (79A ábra, 19. táblázat). Hasonló eredményt kaptunk a globális hálózati mutatók, mint pl. a köztiség centralitások esetén (79B,C ábra). Mind a csúcsokra, mind pedig az élekre számolt köztiség centralitás nagyobb volt TNAP esetén, mint a hálózati átlag, ill. medián (19. táblázat). Azonban a fokszámhoz hasonlóan a TNAP mindkét köztiség értéke alatta maradt a hálózatban kapott maximális értékeknek: csúcsköztiségben a TNAP-é volt a 12. legnagyobb, míg a legnagyobb élköztiség értéke a 2. volt a hálózatban (19. és 20. táblázat). A TNAP által létesített összeköttetések legkisebb élköztiség értéke is többszöröse volt a hálózatban kapott legkisebb értéknek (19. táblázat). A TNAP csúcsköztisége, és élköztiség értékek tekintetében az éleinek durván a fele a teljes hálózat megfelelő értékeinek felső kvartilisébe esett (azaz nagyobb volt, mint NB = 1063,93 és EB = 469,2) (79B,C ábra, 19. táblázat). Csupán két interakcióját reprezentáló él EB értéke volt kisebb 76,45-nél, az alsó kvartilis csúcsértékénél. A legnagyobb centralitás értékekkel a másodlagos jelátvitelben meghatározó szerepű molekulák és interakcióik, pl. Ca<sup>2+</sup>, G-fehérjék, cAMP és kinázok rendelkeztek (20. táblázat). A szinaptikus transzmisszióban szerepet játszó molekulák közül csak az NMDA volt centrális pozícióban (20. táblázat).

		Teljes hálózat	TNAP
	átlag	2,32	
Be-fok	medián	1	4
	maximum	30	
	átlag	2,32	
Ki-fok	medián	1	13
	maximum	46	
	átlag	1780,08	
Csúcsköztiség	medián	277,89	14055,6
	maximum	49230,22	
	átlag	485,14	1537,63
Élleägtigég	medián	222,88	402
Elkozuseg	maximum	12744,65	12078,69
	minimum	0,5	30,88
	átlag	0,054	
Klaszterezési együttható	medián	0	0,013
	maximum	0,5	

19. táblázat. A TNAP és a teljes hálózat centralitás értékeinek összehasonlító táblázata.

Az "Eredmények" A.II.1.d. fejezetben bemutattuk, hogy az agykéreggel összehasonlítva molekuláris hálózatokban a konvergenciafok (CD) kisebb jelentőséggel bír. Ugyanakkor a 11A ábrán, különösen a random hálózatot mutató B panellel összehasonlítva jól látszik, hogy a kontroll funkciókat megjelenítő bal felső kvadránsban néhány molekula a többségtől elkülönülve kiemelkedő értékeket mutat, ami arra utal, hogy e tulajdonságot illetően a CD hasznos mérték lehet a molekuláris hálózatok elemzésében. A konvergenciafokot tekintve a TNAP élei szintén magas értékeket produkáltak, a 17 összeköttetéséből 10-nek |1| körül volt az értéke (79D ábra). Fontos eredmény volt, hogy a TNAP kimenő éleinek többsége pozitív CD értékkel rendelkezett (azaz konvergens tulajdonságú volt), míg a bemenetei esetén egy kivétellel a CD negatív (azaz divergens) volt (79D ábra). A TNAP tehát a hálózati aktivitás koordinációjában lényeges kontrolláló szerepet játszó komponens (vö. "Eredmények" A.II.1.c). Összességében a TNAP nagy centralitás értékei, főleg a csúcs- és élköztiségek révén más, a felső kvartilisbe eső indexszel rendelkező molekulákkal együtt, az idegsejt funkciók szabályozásában kulcsszereplőnek bizonyult a vizsgált hálózatban.

Csúcsköztiség	Élköztiség	Be-fok	Ki-fok
CALCIUM	САМР→РКА	GBETAGAMMA	PKA
PKC	MAPK→TNAP	GALPHAI	PKC
GBETAGAMMA	CALCIUM→CALMODULIN	NMDAR	CALMODULIN
MAPK	CALCIUM→PKC	GALPHAO	CAMKII
NMDAR	RAF1→MEK1	DYNAMIN	CALCIUM
CASPASE3			
CAMP			
PIP2			
MEK1			
РКА			
CALMODULIN			

**20. táblázat**. A hálózat legnagyobb centralitás értékű elemei csökkenő sorrendben listázva.

b. TNAP-függő szignáltranszdukciós pályák

Először a TNAP hálózatelméleti értelemben vett szomszédjaival létesített interakciók súlyát vizsgáltuk meg. A hálózatban a TNAP számos magas élköztiség értékkel rendelkező interakcióban szerepel, ami ezek kulcsfontosságú szerepét bizonyítja a neuronális jelátvitel molekuláris kaszkádjaiban (21. táblázat, 79C ábra). A MAPK → TNAP kölcsönhatás EB értéke a második legnagyobb a hálózatban. A MAPK-val létesített kölcsönhatása mellett megemlítendő a TNAP epidermális növekedési faktorral (EGFR) létesített magas centralitású (21. táblázat) interakciója (Kim és mtsi., 1999), amelyek a TNAP alapvető sejtfunkciókban játszott szerepét hangsúlyozzák (Wong és Guillaud 2004). A többi, magas EB értékű (a hálózat felső kvartilisébe eső) interakcióban a TNAP mint 'kiinduló', ráható molekula szerepel (21. táblázat). Ezek közül kiemelendő, hogy sok a purinerg jelátvitelhez kapcsolódik (ATP, ADP, adenozin és P2X7). A TNAP a B6 vitamin aktív formájával, a piridoxál-foszfáttal (PLP) kialakított magas EB értékű kölcsönhatása a TNAP neurotranszmitter szintézisben játszott szerepének fontosságára utal (Coburn, 2015). A TNAP Alzheimer kórban játszott szerepét illetően (Diaz-Hernandez és mtsi., 2015; Kellett és Hooper, 2015) fontosak lehetnek a M1R és a tau fehérjékkel kialakított kölcsönhatásai: bár az M1R-el magasabb EB értékű volt az interakciója, mint a tau-val, ezek egyike sem volt jelentős értékű az általunk vizsgált hálózatban (21. táblázat). Ugyanakkor a  $tau \rightarrow M1R$  interakció EB értéke (3259,08) a hálózatban a felső kvartilisbe esett.

Élek	EB
MAPK→TNAP	12078,68
$TNAP \rightarrow PLP$	4013,00
$TNAP \rightarrow ATP$	3238,31
$TNAP \rightarrow P2X7$	1267,88
$TNAP \rightarrow ADENOSINE$	1201,00
$TNAP \rightarrow ADP$	803,00
$TNAP \rightarrow EGFR$	770,06
FIVEHT2BR→TNAP	465,41
TNAP→AMP	402,00
TNAP→NIK	377,38
SLC30A7→TNAP	351,19
TNAP→D1R	349,04
TNAP→AMPAR	347,56
P2X7→TNAP	194,52
TNAP→M1R	182,17
$TNAP \rightarrow GABAAR$	67,52
$TNAP \rightarrow TAU$	30,88

**21. táblázat**. A TNAP éleinek köztiség centralitása csökkenő sorrendben. Az alsó és felső kvartilisekbe eső értékek dőlt-félkövér betűtípussal kiemelve. EB: élköztiség.

A TNAP interakcióit jellemző éltulajdonságokat az EB-hez hasonlóan globális mértéknek számító konvergenciafok elemzésével folytattuk, ami segít megérteni az élek információ elosztó (konvergens, azaz célzott, avagy divergens, azaz terítő) szerepét a hálózatban (bővebben ld. "Eredmények" A.II.1.) (79D ábra). Érdekes, hogy a TNAP egyetlen konvergens bemenetét a MAPK-tól kapta, ami az egyik legnagyobb EB értékű él a hálózatban. A MAPK így a TNAP-on keresztül a jelátviteli hálózat jelentős részének aktivitását integrálva célzottan képes szabályozni a hálózat egy körülírható, um. TNAPfüggő - bár nem kicsi, amint a CD = 0,5 alapján megítélhető - részét. Ez a kapcsolat a viszonylag nagy átfedés indexével is kitűnt (0,25 szemben a 0,05 átlaggal és a 0,009 mediánnal a TNAP interakciói között) (79D ábra), ami visszacsatolásként szabályozhatja a bemeneti és cél halmazok molekuláris interakcióit. A TNAP többi, erősen konvergens kapcsolatában a TNAP a "forrás" molekula (79D ábra). Ilyenek a purinerg rendszerrel létesített kapcsolatok (az AMP, ADP, adenozin és ATP molekulákon keresztül) és a aktivitásának egyrészt a purinerg rendszer, másrészt a B6-enzimeken keresztül a neurotranszmitter szintézis (Coburn, 2015) szabályozása felé tereléseként értelmezhető a TNAP-on keresztül. Bár a TNAP  $\rightarrow$  GABAA receptor interakció is erősen konvergens, ennek a kapcsolatnak az EB értéke kicsi volt.

A TNAP erősen divergens interakcióiban a TNAP a szabályozott "cél" molekula (79D ábra). Közülük kettő, a P2X7 (purinerg), ill. a FIVEHT2BR (szerotonerg), a szinaptikus jelátvitelben játszik szerepet. Ugyanez valószínűsíthető a harmadik, cink transzporter SLC30A7-el kialakított interakciójáról, a cink neurotranszmisszióban játszott szerepén keresztül (Tóth, 2011; McAllister és Dyck, 2017). A 3 interakció hálózati divergenciája a purinerg, szerotonerg és cink transzmisszió hatásának TNAP-on keresztüli közvetítését jelzi a másodlagos jelátvitel rendszerébe. Kisebb volt a divergenciája a TNAP további 2, ugyancsak a szinaptikus jelátvitelben szereplő interakciójának az AMPAR, M1R molekulákkal, valamint a *tau* proteinnel is (79D ábra). Eltérően azonban az erősen divergens interakcióitól a TNAP az utóbbiakban, mint "forrás" szerepelt.

Kiemelhető még, hogy a TNAP interakciói közül a TNAP  $\rightarrow$  P2X7 átfedés indexe volt a legnagyobb (0,28, 79D ábra). Ez az interakció a teljes hálózatban talált két reciprok összeköttetés egyike volt (a másik a CAMPGEFII és RIM közötti). A TNAP  $\rightarrow$  P2X7 interakciót nagy EB és konvergens éltulajdonság, míg a reciprok párját kis EB és átfedés, de erős divergencia jellemezte (22. táblázat, 79D ábra). A teljesség kedvéért megemlíthető, hogy az M1R bemeneteit adó TNAP és a nagy EB-vel rendelkező *tau* felőli él ellentétes konvergencia/divergencia (TNAP-al kissé divergens, míg *tau*-val közepesen konvergens (CD ~ 0,5)) és átfedés (TNAP-al kicsi, *tau*-val viszonylag nagy (0,29)) tulajdonságokkal rendelkezett (79D ábra).

#### c. A TNAP szerepe funkcionális csoportok interakciójában



80. ábra Klaszterméret (a molekulák száma csoportonként) eloszlások 3 különböző klaszterező eljárást követően. CW: Community Walktrap, MCL: Markov kaszterezés, CNM: Clauset–Newman–Moore klaszterezés. Abszcissza: klaszter azonosító száma.

A TNAP funkcionális csoportok közti, ill. csoportján belüli közvetítő szerepét klaszterelemzéssel vizsgáltuk. Három klaszterező módszer eredményeit összehasonlítva kívántuk a hálózat csoportszerkezetét megérteni. A 3 módszer közül a Community Walktrap (CW) 23, a Markov klaszterezés (MCL) 19, míg a Clauset–Newman–Moore

dc\_1938\_21

(CNM) 13 klaszterbe sorolta a molekulákat. A klaszterek méretét mindhárom esetben gyorsan lecsengő eloszlás jellemezte, de a CNM produkálta a leghomogénebb eloszlást (80. ábra). Míg a CNM csak 1 db 10-nél kisebb csoportot talált, addig a másik két módszerrel a csoportok több, mint fele volt kisebb 10-nél (MCL: 11 db, CW: 13 db klaszter) és ezek közül több 4-nél is kevesebb molekulát tartalmazott (22. táblázat). A CNM-hez képest tehát a MCL és CW töredezettebb csoportszerkezetet azonosított a szignáltranszdukciós hálózatban.

A klaszterek funkcióját részben a DAVID annotációs program segítségével azonosítottuk (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, v6.7, http://david.abcc.ncifcrf. gov/; Huang da és mtsi., 2009a,b) (22. táblázat). Párhuzamosan az intracelluláris molekuláris kaszkádok szerinti azonosításban specifikusabb Reactome Pathway Database (http://www.reactome.org/; Croft és mtsi., 2014) adatbázist is használtuk e célból. A kétféle adatbázis használata egymással összhangban volt, tehát a klaszterek funkcionális tulajdonságait adatbázistól függetlenül meg lehetett határozni. A klaszterek nagy része átfedő sejtfunkciókkal rendelkezett. Hét főbb funkcionális csoportot azonosítottunk: 1. másodlagos jelátviteli kaszkád, 2. szinaptikus transzmisszió, 3. intracelluláris proteinkináz kaszkád, 4. sejt proliferáció/túlélés, 5. transzkripció és transzláció szabályozása, 6. apoptózis és 7. citoszkeleton/transzport/extracelluláris mátrix (22. táblázat). A különböző klaszterező eljárások eredményét együtt vizsgálva azt láttuk, hogy a 4.-et kivéve mindegyik funkcionális csoportban volt egy nagy, több, mint 50 molekulából álló klaszter, amit több kisebb kísért (22. táblázat). Csak 2 funkcionális csoport, a "szinaptikus transzmisszió" és az "intracelluláris proteinkináz kaszkád", állt kizárólag nagy, 50-nél több molekulát tartalmazó klaszterekből (22. táblázat). Megjegyzendő, hogy a TNAP mindhárom klaszterező módszerrel a "másodlagos jelátviteli kaszkád" funkcionális csoportba került, amiben G-protein- és cAMP-függő neuronális jelátviteli pályák is találhatók (22. táblázat).

22. táblázat. A különböző klaszterező eljárásokkal azonosított csoportok funkcionális annotációja. A klaszterek méretük (csoporttagok száma) szerint csökkenő sorrendben számozva. Klaszterméret: kövér: ≥ 100, kövér: ≥ 50, kövér: ≥ 10, normál: ≥ 4, dőlt: < 4. CW: Community Walktrap, MCL: Markov klaszterezés, CNM: Clauset-Newman-Moore klaszterezés.</p>

Funkció	CW*	MCL	CNM
1. Másodlagos jelátviteli kaszkád	<b>3</b> , 7	3	3, 10
2. Szinaptikus jelátvitel	2	1	1, 7, 9
3. Intracelluláris protein kináz kaszkád	<b>1</b> , 4, 5	2, 4	2, 4
4. Sejt proliferáció/növekedé/túlé	elés 8, 11, 12, 17, 18	<b>7</b> , 9, 13, 14, 15, 17	12, 13
5. Transzkripció és transzláció szabályozás	<b>10</b> , 13, 14, 22	<b>8</b> , 11, <i>18</i>	8
6. Apoptózis	<b>6</b> , <b>9</b> , 15, <i>19</i> , <i>21</i>	<b>5</b> , 16, <i>19</i>	5
7. Citoszkeleton/transzport/ extracelluláris mátrix	16, 23	<b>6</b> , 10, 12	6, 11

\*a 3 tagot számláló 20-s klaszterhez funkciót nem rendeltünk.

A TNAP-interakciók partner molekulái megtalálhatók voltak mind a saját csoportjában (CW 3. klaszter: 8 interakció, MCL3: 7, CNM3: 8), mind pedig más csoportokban (CW: 4 csoport, MCL: 6 és CNM: 4). A TNAP klaszteren belüli és azok közötti öszeköttetéseit a legkevésbé fragmentált csoportstruktúrát eredményező CNM klaszterezés példáján a 81. ábra mutatja. Mindegyik módszer egy klaszterbe sorolta a TNAP és a vele kapcsolódó ADENOSINE, ADP, AMP, D1R, FIVEHT2BR, M1R és PLP interakcióit. A TNAP klaszterek közötti összeköttetéseinek többsége a "szinaptikus transzmisszió" és az "intracelluláris proteinkináz kaszkád" csoportokkal létesült (22. táblázat). A MAPK-t, amivel a TNAP nagy centralitás értékű összeköttetésben áll, mindhárom módszer az "intracelluláris proteinkináz kaszkád" csoportba sorolta (CW4, MCL4 és CNM2 klaszterek) (22. táblázat). A tau-t a CW és CNM az "intracelluláris proteinkináz kaszkád" csoportba sorolta, az MCL szerint pedig "transzkripció/transzláció szabályozásért" felelős molekulákkal került egy funkcionális csoportba. Egyik módszerrel sem találtunk direkt összeköttetést a TNAP és az "apoptózis", valamint a "citoszkeleton/transzport/extracelluláris mátrix" csoportok között (22. táblázat).


**81. ábra** A piramissejt másodlagos jelátvivő hálózat molekuláinak CNM klaszterezéssel feltárt csoportosulása. A színek a molekulák csoportazonosságát, a 13 klasztert pedig G1-G13 jelöli. A TNAP a G3 csoportba tartozik és irányított interakcióit piros nyilak mutatják.

Fontos megemlíteni, hogy a TNAP a neurotranszmissziót az eddig tárgyaltaktól eltérően is képes modulálni. Sok ioncsatorna és neurotranszmitter receptor rendelkezik extracelluláris foszforilációra/defoszforilációra alkalmas helyekkel, melyek az ektoenzim TNAP támadáspontjai lehetnek (a téma egyik összefoglaló közleménye: Redegeld és mtsi., 1999). A szóbanforgó molekulák listáját a 23. táblázat mutatja, amit az UniProt (<u>http://www.uniprot.org/</u>) és a PhosphoSite (<u>http://www.phosphosite.org</u>) adatbázisok segítségével állítottunk össze.

#### dc\_1938\_21

	-		-	•	
Receptorok	ID	Ioncsat.	ID	folytatás	
P2X1	P51575	AMPAR	P42261	Receptorok	ID
P2X4	Q99571	GIRK	P48549	SRPR	P08240
P2X6	O15547	IP3R	Q14643	SSTR1	P30872
P2Y1	P47900	KAR	P39086	SSTR2	P30874
A1R	P30542	KIR21	P48049	SYNDECAN	P18827
A2AR	P29274	KIR23	P48050	TRKA	P04629
ALPHA1AR	P35348	KIR41	P78508	TRKB	Q16620
ALPHA2AR	P08913	KV11	Q09470		
ALPHA7NACHR	P36544	KV12	P16389		
BETA2AR	P07550	KV14	P22459		
BR1R	P46663	KV41	Q9NSA2		
CB1R	P21554	KV42	Q9NZV8		
CB2R	P34972	LTYPECA	Q13936		
D1R	P21728	NTYPECA	Q00975		
D2R	P14416	PQCaCh	O00555		
D3R	P35462	RTYPECA	Q15878		
DOPR	P41143	RYR	P21817		
EGFR	P00533	SEC61P	P61620		
EPHB2	P52799	VDAC2	P45880		
ERBB	P04626				
FAS	P25445				
FIVEHT1AR	P08908				
FIVEHT2AR	P28223				
FIVEHT4R	Q13639				
GABAAR	P14867				
GABABR	Q9UBS5				
IGF1R	P08069				
IR	P06213				
KOPR	P41145				
LRP	Q9BQ69				
M1R	P11229				
M2R	P08172				
M4R	P08173				
MGLUR5	Q13255				
MGLUR7	Q14831				
MOPR	P35372				
NMDAR	Q12879				
NOPR	P41146				
PAFR	P25105				
PAR2	P55085				
PDGFR	P09619				
RET	P09455				

**23. táblázat**. A neurotranszmissziót szabályozó, extracelluláris foszforilációs helyekkel rendelkező fehérjék. ID: UniProt katalógusszám, loncsat.: ioncsatornák.

### AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

A. A funkcionális integráció és az aktivitás koordinációjának hálózatszerkezeti alapjai az agykéregben

I. Helyettesítéses plaszticitás a vizuo-taktilis kéregben

A dorzális látópálya, ezáltal a parietális lebenyi asszociációs struktúrák, különösen a multimodális intraparietális régió (VIP, LIP) kitüntetett szerepet játszik a tapintás útján szerzett információ V1-be jutásában. Ebben a folyamatban hálózat szintjén meghatározó a dorzális látópálya nagy élsűrűsége, ami a vizuo-taktilis kéreg legnagyobb klikkjeinek kialakulását eredményezte azokkal az extrastriatális áreákkal (V3, MT), amelyek a szomatoszenzoros információ elsődleges vizuális kéregbe jutásában megkerülhetetlennek tűnnek. A parietális multimodális kérgi áreák koordinatív funkcióját a különböző szenzoros modalitások interakciójában magas fokszámuk és a hálózat funkcionális alegységeit reprezentáló klasztereket összekötő híd szerepük biztosítja. A V1-be vetülő tapintási információt közvetítő legrövidebb utak élsúlyait (EB, feszítőfa) valamint a beés kimeneti áreák halmazainak szenzoros modalitását figyelembe véve az área 1-ből eredő, VIP-en, majd V3 és MT-n átkapcsolva a V1-ben végződő pálya tűnt a helyettesítéses plaszticitásban a legfontosabbnak. Eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy a helyettesítéses plaszticitásban a kérgi hierarchia szupramodális csúcs területei, pl. área 46 nem vesznek részt, ezért a funkcióért alapvetően alacsonyabb szintű multimodális asszociációs áreák felelősek.

#### II. A hálózati jelfolyam koordinációja: a konvergenciafok

Az agykérgi jelfolyam hálózati szintű szabályozását jól jellemzi az általunk bevezetett éltulajdonság, a konvergenciafok, CD. A nagyléptékű kérgi hálózatban a konvergencia és divergencia reciprok éltulajdonság és az általuk azonosított két alhálózat, mint egymás tükörképei, megfeleltethető a felszálló pályák, ill. visszacsatolások rendszerének. Figyelemre méltó az is, hogy az áreák CD értékek alapján azonosított topológiai hierarchiája megfeleltethető az agykérgi hálózat anatómiai és funkcionális hierarchiájának. A csúcsok összevont CD értékei (CDn) alapján az áreák forrás és elosztó tulajdonságok szerint jellemezhetők. Az elosztó funkció mentén az áreák jobban elkülönülnek, mint a forrás tulajdonság alapján, ami az elosztó funkció hálózati működés

koordinációjában játszott meghatározó szerepére utal az agykéregben. A CD egyedi hálózati tulajdonság, amivel a kérgi hálózat jól megkülönböztethető más természetes és mesterséges hálózatoktól.

#### III. A kognitív kontroll hálózatszerkezeti jellemzői

A csúcsokra összevont CD értéke megadja az adott kérgi área információ elosztó, ill. forrás jellegét a sűrűn összekötött hálózatokban. Ennek segítségével azonosítottuk a PFCáreák közötti munkamegosztás hierarchikus felépítését, amiben a dorzolaterális área 46 és FEF elosztó funkcióval bírnak, szemben az inkább forrásként azonosítható ventrolaterális és ventromediális régiókkal. Az elülső cinguláris kéregre a kétféle, elosztó és forrás funkció egyaránt jellemző. Kimutattuk azt is, hogy a PFC elosztó funkcióját nem annyira híd szerepén keresztül, mint inkább a magasrendű kérgi áreákkal szoros együttműködésben, egy klaszterbe tömörülve látja el és e klaszterben az área 46 és a FEF is centrális pozícióban vannak. A PFC-áreák által létesített összeköttetések kis átfedés indexei arra utalnak, hogy az agykérgi hálózatban a kognitív kontroll nem poliszinaptikus körök reverberáló aktivitásának az eredménye.

#### B. Köztes szintű hálózati motívumok a szomatoszenzoros kéregben

I. Az áreán belüli és áreák közötti interakciók funkcionális anatómiája

A disztális ujjbegy reprezentációkban kolumnáris méretű kérgi területek által létesített oldalirányú összeköttetések topográfiai jellemzőit tanulmányozva megállapítottuk, hogy a tapintásban meghatározó szerepű elsődleges szomatoszenzoros área 3b és a taktilis információ feldolgozásának következő szintjét képviselő szomszédos área 1 homotóp disztális ujjbegy reprezentációi erőteljes reciprok kapcsolatot létesítenek. Ugyanakkor áreákon belül a szomszédos disztális ujjbegy reprezentációk között lehet jelentős, szintén reciprok összeköttetéseket azonosítani. Nagyfelbontású fMRI és egysejt aktivitás mérésekkel bizonyítottuk a struktúra és funkció szoros kapcsolatát a hálózat-szerveződés köztes szintjén, kimutatva, hogy nyugalmi állapotban a disztális ujjbegy reprezentációban mért neurális aktivitás korrelációinak mintázata megfelelt a populáció szinten azonosított összeköttetések áreán belüli (szomszédos ujjak reprezentációi közötti) és áreák közötti (azonos ujjbegy reprezentációk közötti) mintázatának.

#### II. Összeköttetési mintázatok idegsejt populációk szintjén

Pályajelölés és IOS együttes alkalmazásával kimutattuk, hogy a legnagyobb sűrűségű afferens terület a beinjektált disztális ujjbegy reprezentációra lokalizált és egybeesik a pRF-el. Az axonfolt csoportok által reprezentált efferens területek kiterjedése az área 3b intrinzik összeköttetéseit kivéve szintén megegyezett a pRF méretével, míg área 3b-ben az intrinzik AFCS-k mérete kisebb, mint a pRF. Az área 3b és 1 hierarchikus viszonyát összeköttetéseik laterális kiterjedésének összehasonlításával támasztottuk alá. Kimutattuk, hogy a felszálló pályát erőteljes topográfiai szelektivitás, míg a visszacsatolást és az intrinzik összeköttetéseket kiterjedtebb laterális eloszlás jellemzi. Figyelembe véve a nagyítási faktor különbségeit az intrinzik összeköttetések área 1-ben nagyobb bőrfelületet reprezentálnak, mint área 3b-ben. További különbség a két área összeköttetéseiben a kapcsolatok erősebb klaszterezettsége área 3b-ben. A vizsgált pályákat (intrinzik, FF, FB) anizotrop eloszlás és, a pontszerűen lokalizált felszálló pályát kivéve, az ujjbegyeket keresztező, azaz a szomszédos ujjbegyeket összekapcsoló orientáció jellemzi. A köztes szintű hálózati motívum szerkezetét a 82. ábra foglalja össze.

#### C. Az élek szerkezete és szerepe az agykérgi kommunikációban

#### I. Axonmorfólógia

Az axonok fénymikroszkópos képe alapján két típust különböztettünk meg a szürkeállományban: egy kanyargós lefutású, boutonokat képező csoportot és egy boutonokat nem képező, vastag, viszonylag egyenes lefutású csoportot. Utóbbi típust feltehetően mielinizált axonok alkották, amit alátámasztott, hogy EM-al BDA-jelölt, mielines axonok tangencionális metszeteit azonosítottuk a szürkeállományban. A kétféle axon eloszlása markánsan eltért, míg a vastag, boutonokat nem képező rostok döntően a két área azonos disztális ujjbegy reprezentációi között létesítettek reciprok kapcsolatokat, addig a vékony, boutonokkal tarkított axonok áreán belül, és azok között egyaránt sűrű hálózatot alkottak. Az áreák gyors kommunikációját biztosító pályák tehát a látókéreghez hasonlóan a szomatoszenzoros kéregben is azonosíthatók és erős topografikus szelektivitással jellemezhetők.

#### II. Preszinaptikus boutonok osztályozása

Kimutattuk, hogy a PFC-ben a magasabb rendű MD talamokortikális végződései nagyméretűek, sok mitokondriumot tartalmaznak és komplex, többszörös kontaktust

létesítenek, hasonlóan az elsőrendű magok szenzoros kérgi talamokortikális axonvégződéseihez. BDA-jelölt kortiko-kortikális axonvégződések 3D elektronmikroszkópos struktúráját egy és többváltozós statisztikai módszerekkel vizsgálva megállapítottuk, hogy mókusmajmok szomatoszenzoros kérgében a boutonok két osztályba sorolhatók. Az ultrastrukturális tulajdonságok közül a szinaptikus boutonok és a mitokondriumok felszíne, térfogata valamint a PSD összetettsége (lebenyes, többszörös) voltak a legfontosabb megkülönböztető tulajdonságok. A bouton-osztályok elkülönítésének hatékony módszere méretük alapján, az erősen korreláló felszín-térfogat relációban történő ábrázolásukkal lehetséges. Emberi agykéregből nyert adatok elemzése a boutonok méret szerinti osztályozhatóságát alátámasztotta. Az általunk vizsgált szomatoszenzoros kérgi pályák mindegyikében (intrinzik, FF és FB) azonosítottunk kis és nagyméretű boutonokat. A nagyméretű kortiko-kortikális boutonok ultrastruktúrája sok hasonlóságot mutat a talamokortikális axonvégződésekével, ami felveti funkcionális hasonlóságukat.

# D. A szinaptikus jelátvitel réteg-specifikus, populáció szintű szabályozása a nem-szövetspecifkus alkalikus foszfatázon (TNAP) keresztül

#### I. A TNAP regionális, és szubcelluláris lokalizációja

Kimutattuk, hogy a retinát nem számítva főemlősök központi idegrendszerében, az idegszövetben erős TNAP aktivitás csak az agykéreg meghatározott rétegeire lokalizálódik. Majmokkal összehasonlítva emberben a primer szenzoros kéregben a talamorecipiens 4. rétegen és az agykéreg felszíni rétegén kívül az asszociációs kérgi területeken az 5. réteg mutat erőteljes TNAP enzimhisztokémiai aktivitást. A TNAP szubcelluláris lokalizációjával felfedtük, hogy erősen expresszálódik az ingerületátvitelben kritikus fontosságú szinaptikus résben és Ranvier-befűződésben.

#### II. A TNAP szerepe az idegsejt aktivitás szabályozásában

A TNAP ingerületátvitelben játszott szerepét támasztja alá, hogy féloldali szenzoros deprivációval specifikusan az érintett okuláris dominancia oszlopokban blokkoltuk az enzimaktivitást a primer látókéregben. Továbbá, a TNAP gén inaktivációja gátolja a mielinizációt és a szinaptogenezist. Hálózatelemzéssel kimutattuk, hogy a TNAP fontos szereplő a másodlagos- és a szinaptikus jelátvitelért felelős molekuláris interakciókban. A konvergenciafok és más globális centralitás mértékek (NB, EB) alapján a TNAP képes hálózati szinten koordinálni a jelátvitelért felelős molekuláris interakciókat. Ezzel

összhangban a TNAP számos saját klaszterén kívüli interakciót létesít. Közvetlen interakcióit és szubcelluláris lokalizációját tekintve a TNAP fontos tényező a purinerg jelátvitelben, a neurotranszmitter szintézisben, a *tau* fehérje és a szinaptikus résben található receptorok foszforilációjában.



**82. ábra** Kolumnáris hálózati motívum a szomszédos 3b és 1 áreák összeköttetéseinek példáján mókusmajomban. **Balra** a postcentralis szomatoszenzoros kérgi área helyzete és kiterjedése mókusmajom agykérgi felszínére vetítve a bal féltekén. Piros kör jelöli a jobboldalon kinagyított kéz reprezentáció területét. Rostrális irány balra, dorzális felfelé. Sur és mtsi. (1982) közleményéből. **Jobbra**: A kéz reprezentációja 3b és 1 áreákban. Az área 3b Rostrális (A) és kaudális (P) határait szaggatott vonal jelöli. D1-4: disztális ujjbegy reprezentációk, különböző színekkel jelölve. A tenyér (palm) reprezentációja szürke. Az arc (face) és kéz reprezentáció határát dupla vonal jelöli. A <u>piros nyilak</u> a D2 ujjbegy-reprezentációk áreán belüli és azok közötti összeköttetéseinek oldalirányú kiterjedését mutatják. Área 3b-vel összehasonlítva megfigyelhető área 1 intrinzik és inter-áreális (FB) összeköttetéseinek nagyobb kiterjedése a reprezentációs térképen. M: mediális, L: laterális irányok. LS: sulcus lateralis, CS: sulcus centralis, FL: alkar. Méretarány: 1 mm. Qi és mtsi. (2011) alapján módosítva.

### DISZKUSSZIÓ

A. A funkcionális integráció és az aktivitás koordinációjának hálózatszerkezeti alapjai az agykéregben

#### I. Módszertani megfontolások

A *keresztmodális plaszticitás* vizsgálatára alkalmazott hálózatelemzés legkérdésesebb eleme a neurális összeköttetések ismerete. Ez különösen érvényes a látóés szomatoszenzoros kérgi áreák közötti heteromodális kapcsolatokra. Figyelembe véve, hogy alacsony-köztes hierarchia-szintű szomatoszenzoros kérgi áreák (3a, 1 és 2) közvetlen kapcsolatot létesítenek a magasabb rendű VIP-el (Lewis és Van Essen, 2000), elképzelhető, hogy hasonló még nem ismert heteromodális összeköttetések az itt megismerteken túl további alternatív pályákat biztosítanak a taktilis információ V1-be jutásában.

Ugyanakkor érdemes megemlíteni, hogy vizsgálatainkat elvégeztük olyan hálózatokon, amiben szórványosan leírt összeköttetéseket is figyelembe vettünk a temporális (Suzuki és Amaral, 1994; Luppino és mtsi., 2001) és parietális (Rizzolatti és Luppino, 2001) kérgi struktúrák és a premotoros kéreg között. Ezekből az elemzésekből származó eredményeinket nem tettük közzé. A hálózatot így kiegészítve sem változott lényegesen a klaszterszerkezet és a V1 gyökerű feszítőfa struktúrája, ami megerősítette a bemutatott eredményeink megbízhatóságát.

Eredményeink megbízhatóságának legfontosabb megerősítését azonban a kísérletes adatokkal való megegyezés adja. Így az, hogy tapintás során az MT, V3 és az intraparietális kéreg fokozott, feladatfüggő aktivitása mérhető (Burton és mtsi., 2002, 2004; Hagen és mtsi., 2002; Lacey és Sathian, 2014, 2015). Eredményeink tehát értékes információval szolgálhatnak a V1-ben feldolgozásra kerülő taktilis információ jellegét illetően vak, de látó emberekben is (Bavelier és Neville, 2002; Theoret és mtsi., 2004).

A *PFC egyes áreáinak kognitív kontrollban* játszott pontos szerepét feltáró topológiai jellemzők azonosításában szintén a felhasznált kísérletes adatok hiányossága jelenti a legfőbb akadályt. Ugyanakkor a CD tanulmányozásával különböző agykérgi hálózatok esetében konzisztens eredményeket kaptunk. Összességében eredményeink igen jól összeegyeztethetők az agykérgi áreák hierarchikus jelfeldolgozásban játszott szerepének ismereteivel (Felleman és Van Essen, 1991; Barone és mtsi., 2000; Ercsey-Ravasz és mtsi., 2013; Markov és mtsi., 2014b). Ezzel együtt sem zárható ki, hogy újabb összeköttetések bevonása a CDn tulajdonságok változását eredményezi. Azonban,

tekintettel a CD globális tulajdonságára és hogy a CDn az áreák folytonosan változó tulajdonsága, feltehető, hogy újabb összeköttetések az érintett áreák esetében kis változást okoznának koordinatív funkciójuk meghatározásakor.

Végül pedig amellett sem mehetünk el szó nélkül, hogy a rézusz majomból származó eredmények csak kellő óvatossággal értelmezhetők emberen, hiszen a két faj agykérgi felépítése, így az egyes régiók homológiája és funkcionális egyezése nem ismert pontosan (Passingham, 2009). Összességében azonban kijelenthető, hogy eredményeink jó egyezése a kísérletes adatokkal bizonyítja a hálózatelemzés fontosságát és a rézusz majom, mint modell alkalmasságát az agykéreg működésének megértésében, így a helyettesítéses plaszticitásban és a kognitív kontrollban.

#### II. A szenzoros helyettesítésért felelős pályák a vizuo-taktilis kéregben

A vizuo-taktilis hálózat klaszterszerkezetében a dorzális látórendszer szoros kapcsolatban van a szenzomotoros kéreggel, ami alátámasztja azt az elképzelést, hogy korai vakokban a dorzális látópálya meghatározó szerepet játszik a kereszt-modális plaszticitásban (Maurer és mtsi., 2005). Ennek további megerősítését adja, hogy a dorzális látópálya struktúrái dominálták a vizuo-taktilis hálózat legnagyobb klikkjeit is. Továbbá, a vizuo-taktilis hálózatban a dorzális látórendszeri parietális áreák közös klasztert képeztek az alacsonyabb szintű occipitális látókérgi áreákkal. Újabb kutatási eredmények alapján bebizonyosodott, hogy a látókéreg egy teljesen feltérképezett, irányított és súlyozott anatómiai hálózatában a parietális és occipitális régiók között különösen erős összeköttetés van, ami része a látókérgi nagy sávszélességű (sok projekciós neuron által étesített) strukturális "gerinchálózatnak" (Ercsey-Ravasz és mtsi., 2013; Markov és mtsi., 2013b). A bimodális vizuo-taktilis hálózatban a 46, 7a és VIP áreák különböző klasztereket összekötő centrális pozíciója ugyancsak összhangban van a kísérletes eredményekkel, melyek a prefrontális és parietális kéreg szerepét bizonyítják a vizuo-taktilis integrációban (Andersen és mtsi., 1997, 2004; Driver és Spence, 1998; Macaluso és Driver, 2001; Spence, 2002; Macaluso és mtsi., 2003). A központi helyzetű parietális és prefrontális kérgi áreák közül a V1-ben végződő, postcentralis szomatoszenzoros kéregből kiinduló legrövidebb utak csak a VIP-en kapcsolódtak át, mielőtt az MT, V3 vagy PO áreákon keresztül elérték a V1-et. Nem mellékesen a VIP-et is tartalmazó klikkek átlagos NB értéke a legnagyobbak között volt. Mindezzel összhangban kísérletes eredmények alapján ismert a VIP multimodális funkciója mind rézusz majomban és emberben (Duhamel és mtsi., 1998). Érdemes megemlíteni a LIP VIP-hez hasonló híd pozícióját, ami az intraperietalis régió kiemelt szerepére utal a keresztmodális vizuo-taktilis plaszticitásban (Wittenberg és mtsi., 2004). Szintén meg kell említeni más, az elemzésből kellő információ hiányában kihagyott áreákat, mint pl. az AIP, aminek vannak szomatoszenzoros kéreggel létesített kapcsolatára utaló adatok (Lewis és Van Essen, 2000). Összességében arra követeztethetünk, hogy az intraparietális kéreg fontos szerepet kap a látókéreg keresztmodális taktilis funkcióiban. Ezt a feltevést alátámasztja Burton és mtsi. (2004) tanulmánya, amiben kimutatják az elülső parietális sulcus körüli kérgi terület szomatoszenzoros funkcióját korai vakokban. Hasonlóképpen, Wittenberg és mtsi. (2004) korai vakokban az inferior parietális kéreg szerepét azonosították az SI és V1 között a funkcionális kapcsoltság megerősödésében, összhangban az intraparietális kéreg általunk kimutatott híd szerepével.

Ahogy már említésre került, az SI és V1 közötti legrövidebb utak a VIP, MT, V3 és PO áreákon kapcsoltak át. Érdemes kiemelni, hogy a feszítőfán azonosított pályák közül a tapintással kapcsolatos ingerek kérgi belépését jelentő primer szomatoszenzoros área 3b a magasabb feldolgozási szintet képviselő área 1-en keresztül kapcsolódik V1-el (Kaas, 1983, 2004 Iwamura, 1998; Tabot, 2013; Rossi-Pool és mtsi., 2021). A megerősítéses tanulással létrehozott feszítőfa, az EB számításával azonosított bemeneti és célterületek száma és szenzoros modalitása valamint a klikkek összetétele együttesen az área 3a, és a tapintásban meghatározó szerepet játszó área 1-ből induló, MT és V3 átkapcsoló neurális pályák meghatározó szerepét valószínűsíti áreákon а szomatoszenzoros információ V1-be jutásában. Az MT vizuo-taktilis integrációban játszott esetleges kulcsszerepének további megerősítését adja, hogy mind a teljes vizuotaktilis kéreg, mind pedig dorzális látórendszert reprezentáló klaszter legnagyobb klikkjeiben szerepelt. Ez a feltevés összhangban van az MT látókban kimutatott szerepével a taktilis mozgásfeldolgozásban (Hagen és mtsi., 2002). Szintén lényeges adat az MT aktivitásának jelentős növekedése Braille olvasás közben korai vakokban, míg ugyanez nem mutatható ki késői vakokban és látókban (Burton és mtsi., 2002). Hasonlóan az MT-hez, taktilis ingerlés V3-ban is megnövekedett aktivitást vált ki korai vakokban (Burton és mtsi., 2004). Figyelembe véve a VIP szerepét a multimodális mozgásfeldolgozásban (Bremmer és mtsi., 2001), eredményeink a mozgásfeldolgozásért felelős áreák szerepét valószínűsítik a funkcionális helyettesítésben a vizuális inputjától megfosztott V1-ben. Következtetéseink ugyancsak jelentős megerősítést kaptak egy közelmúltban megjelent tanulmány által, amiben látókban nem mérhető, gyors információáramlást mutattak ki az általunk azonosított áreákon keresztül SI-ből V1-be vakokban (Ioannides és mtsi., 2013).

A dorzális látópálya mellett fiziológiai munkák eredményei a ventrális látórendszer aktivitását is leírták Braille olvasás közben vakokban (Burton és mtsi., 2002; Maurer és mtsi., 2005). Elemzésünk alapján feltehető, hogy a ventrális látókérgi klaszter legnagyobb klikkjében szereplő V4 lényeges csomópont ebben a funkcióban a két vizuális látópálya közötti híd pozíciója által. Ugyancsak a V4 helyettesítéses plaszticitásban játszott szerepét támasztja alá, hogy a VIP área V3-al és MT-vel létesített kapcsolatainak EB alapján azonosított célterületei között szerepel a V4 is, míg fő bemeneti területeit szenzomotoros struktúrák alkotják. Arra azonban nincsenek adatok, hogy a ventrális látópálya elsődleges szerepet játszana a V1-ben kimutatható helyettesítéses szenzoros plaszticitásban.

#### III. A hálózat aktivitásának koordinációja és szerepe a kognitív kontrollban

#### 1. Az agykérgi jelfolyam topológiája

A konvergenciafok bevezetésével kapott eredményeink rávilágítanak, hogy az agykérgi működés lényegét adó integráció-szegregáció egymást kiegészítő folyamataiban (Zeki és Shipp, 1988; Tononi és mtsi., 1998; Sporns és mtsi., 2004; Friston, 2005) a hálózat irányítottsága és a reciprocitás döntő szerepet játszik (Kale és mtsi., 2018). A CD segítségével kimutatható, hogy a globális konvergencia és divergencia a reciprok élek kiegyensúlyozott, szimmetrikus tulajdonsága és alátámasztja a kísérletes megfigyelések alapján javasolt "hierarchikus ellenáram" rendszerének elméletét (Markov et al., 2013b; Vezoli et al., 2021). Az, hogy a kiegyensúlyozottság a vizsgált alhálózat, így klikkek és körök méretének növekedésével arányosan nőtt jelzi, hogy a lokális interakciókon túl az integráció globális szinten fontos hálózati tulajdonság. Eredményeink szerint a kérgi hálózat-topológiában, az áreák be- és kimeneteinek konvergens, ill. divergens tulajdonságának kialakulásában a globális, hálózati szintű elosztó funkció (bal felső kvadráns 9. és 10. ábrák) erősebb szelektív tényező a forrás jellegű tulajdonságnál (jobb alsó kvadráns 9. és 10. ábrák). Ez az elképzelés jól összeegyeztethető az agykéreg asszociációs áreák számának növekedésével lezajló evolúciós expanziójával (Rakic, 2009; Krubitzer és Seelke, 2012; Krubitzer és Dooley, 2013; Molnár és mtsi., 2014). Hasonló globális, topológiai szelekciós tényező az agykérgi hálózat növekedése során a hatékony kommunikáció érdekében az egyedi összeköttetések hosszának minimalizálása, mint mindent felülíró szabály helyett az átlagos úthossz minimumon tartása (Kaiser és Hilgetag, 2006; Avena-Koenigsberger és mtsi., 2017).

A jelenleg népszerű nézet szerint a magas szintű agykérgi integráció a RC által meghatározott mag-periféria szegregáción alapul (Griffa és Van den Heuvel, 2018). A csúcsokra kiszámolt CDn ugyanakkor az áreák specializációjának egyedi szintű mérőszáma, miden egyes hálózati összetevő, így kérgi área koordinatív szerepét meghatározza. A CDn fontosságára rávilágít, hogy az általa meghatározott koordinatív funkció megfelel az áreák kísérletes adatok alapján ismert hierarchikus szerveződésben meghatározott szerepének (Felleman és van Essen, 1991; Scannell és mtsi., 1995; Hilgetag és mtsi., 2000b; Murray és mtsi., 2014). Ennek megfelelően az érzékszervi információkat adaptív, izomorf módon reprezentáló elsődleges szenzoros kérgi áreák (Kaas, 2000) forrásként azonosíthatók, melyekből az információ divergens efferens pályák mentén terjed szét a hálózatban a kérgi hierarchia magasabb szintjein. A hierarchia csúcsán álló áreák a divergens, a hálózat nagy részét célzó bemenetein beérkező információ konvergens kimeneteken keresztüli célzott elosztásával szabályozzák a magas szintű kérgi integrációt. Ennek jó példája a PFC, amit alább részletesen tárgyalunk. A különböző klasztereket összekötő híd áreák (pl. VIP, V4) szintén elosztó tulajdonságokkal rendelkeznek. Ez a pozíció egyben az információáramlás szűk keresztmetszetét képezi a klaszterek és/vagy pályarendszerek (pl. ventrális és dorzális látórendszer) (Goodale és Milner, 1992; Young, 1992; Jouve és mtsi., 1998; Hilgetag és mtsi., 2000a) interakcióiban nagy kihívást jelentő feladatokban, élethelyzetekben. Fontos megemlíteni, hogy a szűk keresztmetszetet képező, elosztó áreák megfelelnek az ismert hálózati csomópontoknak (hub), melyek fő funkcióját az információáramlás koordinációjában látják (Sporns és mtsi., 2007). A köztes hierarchia szintű áreák, mint pl. az MT, V3 és Brodmann área 2 vegyes konvergens és divergens ki- és bemenetei, tehát a elosztó és forrás jellegű funkciók keveredése, megfelelő strukturális alapját képezheti a felszálló pályák és visszacsatolások közötti intenzív interakcióknak és magyarázhatja a figyelmi funkciók erős fiziológiai hatásait ezekben áreákban (Kastner és Ungerleider, 2000; Boynton, 2005; Roe és mtsi., 2012; Angelucci és mtsi., 2017). Mindezen túl lényeges, hogy az agykérget számos szerkezeti és funkcionális gradiens és adaptív dinamika, beleérve az interakciók bizonyos mértékig flexibilis hierarchiáját is, jellemzi, amiben az általunk leírt konvergenciafok alapú topológiai tulajdonság csupán egy ezek közül (Hilgetag és Goulas, 2020). A CD, mint a koordinációt jellemző hálózati mérték jelentőségét ugyanakkor kiemeli, hogy az áreák intrinzik integrációs időállandója hasonló hierarchikus specializációval jellemezhető (Murray és mtsi., 2014; Spitmaan és mtsi., 2020). A jövő feladata annak feltárása, hogy miként határozzák meg e tulajdonságok külön valamint együttesen az agykéreg működését. Ugyancsak a jövő feladata annak kiderítése, mennyire határozza meg az általunk leírt CD és az ebből származtatott CDn az áreák közötti interakciókat (Varga és mtsi., 2021).

#### 2. A kognitív kontroll-hálózat topológiája

A PFC-ben nagy vonalakban regionális munkamegosztás rajzolódik ki az áreák információáramlásban játszott szerepe alapján. A be- és kimenetek konvergenciafoka szerint a dorsolaterális régió (PFC DL) az área 46 és FEF-el erős elosztó funkcióval jellemezhető. E régióban kivételként szerepel az área 9, mely inkább forrás jellegű struktúra. A többi régióra szintén a forrás tulajdonság jellemző. Fontos kiemelni, hogy a forrás tulajdonság a PFC-ben kevésbé kifejezett, mint az elosztó funkció. Információ forrásként leginkább az elülső cinguláris (ACC) régiót alkotó 32 és 25 áreák valamint a ventrolaterális (PFC VL) área 45 azonosíthatók. Az orbitális régió (PFC ORB), 11, 12 és 13 áreák, és a póluson elhelyezkedő área 10 gyenge forrás jellege az elosztó funkció erősödésére utal viszonylag kis átlagos konvergens bemenettel és divergens kimenettel. Ez legjobban az ACC-hez köthető área 24-ben tapasztalható, ahol a forrás és elosztó jelleg erősen keverednek. Figyelemmel a PFC-áreák közötti szoros kapcsolatrendszerre (Barbas és Pandya, 1989; Pandya és Yeterian, 1998; Kötter é mtsi., 2001) eredményeink alátámasztják a PFC-ben zajló hierarchikus jelfeldolgozásra tett megfigyeléseket (Négyessy, 2003, átdolgozott verzió). Ezzel összhangban kimutatták pl., hogy a nyugalmi állapotú hálózatban némely PFC-área vezérli másikak aktivitását (Yan és He, 2011). Regionális szinten eredményeink összeegyeztethetők az áreákra jellemző integrációs időállandóval meghatározott hierarchikus elrendeződéssel (Murray és mtsi., 2014). Az intrinzik időállandó legrövidebb az orbitofrontális kéregben, hosszabb a dorsolaterális prefrontális kéregben és a leghosszabb integrációs időállandó az elülső cinguláris régiót jellemzi.

Elosztó szerepéből adódóan a PFC DL globális konvergencia csomópont, szűk keresztmetszetet képez az agykérgi információáramlásban, ami topológiai magyarázatát adja a terület korlátozott kapacitásának az információfeldolgozásban. Figyelemre méltó egybeesés, hogy magatartási feladatokban a PFC DL-t azonosították a pszichológiai refraktor periódusért (PRP) felelős agyi struktúraként (Marois, és Ivanoff, 2005; Sigman és Dehaene, 2008; Zylberberg és mtsi., 2010; Tombu és mtsi., 2011). Elméleti modellek

szerint a PRP-t komputációs korlátok eredményezik: szemben ugyanis az érző és motoros rendszerek erősen párhuzamos feldolgozásával a központi végrehajtó funkció soros feldolgozás eredménye, így információs szűk-keresztmetszetet képez (Sigman és Dehaene, 2008; Zylberberg és mtsi., 2010). Direkt bizonyítékot eredményeink a PFC DL soros működésére nem adnak, de valószínűsíthető, hogy ennek részben hálózat-topológiai okai vannak.

A hídság értékek az előzőkben tárgyaltak alapján az elvárásokkal ellenkezően alakultak: az área 46 és 24 alacsony, míg a PFC VM, ORB és VL régiók áreái magas értékeket produkáltak. Ennek oka, hogy a fuzzy klaszterezés a PFC-áreákat a magasrendű asszociációs kérgi áreákkal egy csoportba, a 2. klaszterbe sorolta. Az alacsony hídság értéket az área 46 és 24 többi PFC-áreánál (área 9-et kivéve) sokkal erősebb elköteleződése okozta a 2. klaszterrel. A magasrendű asszociációs áreák csoportképzését okozó sűrű hálózat felidézi a "globális munkatér" (global workspace) modelljét, miszerint e struktúrák együttműködése felelős a magasrendű kognitív funkciókért (Dehaene és Changeux, 2011; Gisiger és mtsi., 2000). A globális munkatérben az área 46 kimagasló NB értéke alapján központi jelentőségű csomópont. Az área 24 NB értéke a 2. klaszterben közepes nagyságú, de a PFC-ben a harmadik legnagyobb. A klaszterelköteleződés és az NB értékek együttesen alátámasztják mind az área 46 és 24 központi jelentőségét a kognitív kontrollban (Constantinidis és Procyk, 2004; Gazzaniga és mtsi., 2009; Banich és Compton, 2011).

Összefoglalva, tekintettel az átfedés elhanyagolható mértékére, az áreák láncolata alkotta hosszú neurális körök reverberáló aktivitása elhanyagolható jelentőségű, míg az elosztott jelfeldolgozás koordinációja meghatározó az agykérgi információáramlás szabályozásában. A globális konvergencia csomópontok, elsősorban az área 46 és 24 feltehetően soros feldolgozáson alapuló kontroll szerepet játszanak a jelfolyam koordinációjában (Zylberberg és mtsi., 2010). Eredményeink a kognitív kontroll feldolgozáson alapuló meghatározását hangsúlyozzák. A PFC-hez köthető kognitív folyamatok elemei meglehetősen absztraktak lehetnek különösen, hogy a kérgi reprezentációk plasztikusan formálódhatnak az áreák interakcióinak eredményeként (Wood és Grafman, 2003). Mindezek alapján a PFC szerepének feldolgozáson alapuló meghatározása előnyösebbnek tűnik a lokalizációs módszernél (Wood és Grafman, 2003). Eredményeinkből az is következik, hogy a különböző PFC-áreák egymást kiegészítő feladatokra specializálódtak. A PFC-áreák reciprok összeköttetéseken keresztül egymással szorosan kapcsolt klaszterében (Averbeck és Seo, 2008) a

funkcionális specializáció arra utal, hogy a kognitív kontroll a különböző PFC-áreák összehangolt interakcióin alapul.

#### B. Köztes szintű hálózati motívumok az agykéregben

- I. Módszertani megfontolások
- 1. Kétirányú BDA-jelölés

Főemlősökben az agykérgi összeköttetések kétirányú, afferens és efferens struktúráinak egyidejű jelölésére javasolt módszer a kis- és nagy molekulasúlyú BDA-keverék alkalmazása (Rockland és Knutson, 2000, 2001; Li és mtsi., 2003). A kétirányú pályajelölés egyik lehetséges hátránya a retrográd jelölődő idegsejtek axonjainak feltöltődése, ami "másodlagos" célterületek megjelenését eredményezheti. Ennek lehetőségét nem tudtuk teljesen kizárni (főleg, mert a mintavételezett sorozatmetszeteken nem lehetséges az idegsejtek teljes rekonstrukciója), de bizonyos jelek alapján a hatását minimálisnak értékeltük. Egyrészt, a rekonstruált axonok BDA-beadási helytől távoli axonfoltok irányában szétágazódó mintázata arra utalt, hogy a jelölt axonok eredete a beadási hely. Főként, az axonfoltok átfedtek a retrográd erősen jelölt területekkel. Feltéve ugyanis az idegi kapcsolatok divergenciáját, az axonfolt-jelölődést, ahol alacsony a retrográd jel erőssége.

Egyéb pályajelöléses módszerre visszavezethető különbségek az eltérő túlélési idővel és más technikai melléktermékekkel magyarázhatók. A hosszabb túlélési időt követően tapasztalt erősebb axonfolt jelölődés az anterográd terjedési preferenciájú, nagy molekulasúlyú BDA 10K (Rockland és Knutson, 2000), kis molekulasúlyú és retrográd is erősen terjedő BDA 3K-val összehasonlítva lassabb transzportjával magyarázható. Az eredményeket befolyásoló technikai tényezők közül mindenek előtt a pályajelölő anyag injektálására használt kapilláris belső átmérőjének eltéréseit kell megemlíteni. Nagyobb átmérőn több jelölő anyag jut a szövetbe, ami több idegi struktúra anterográd és retrográd jelölődését eredményezi. Tapasztalataink szerint kisebb hatással voltak a BDA transzportra azok a mikrosérülések, amiket az az elektrofiziológiai térképezés során az elektród okozott. Az esetleges egyedi eltéréséket az adatfeldolgozáshoz használt kvantitatív módszerek (pl. normalizálás) megválasztásával is igyekeztünk csökkenteni. Összességében elmondható, hogy konzisztens jelölődési mintázatot azonosíthattunk a mintánkban. Más a jelölést befolyásoló tényezőket, mint az esetleges mikroléziók vagy a

BDA beadás mag régiójának rétegeloszlása, az Eredmények fejezetben (ld. B.I.2., B.I.4., B.I.5.) tárgyaltuk.

#### 2. A funkcionális térképek és metszetek illesztésének pontossága

Az illesztések pontosságát több torzulást eredményező tényező befolyásolja: ezek lehetnek foto-optikai eredetűek (szférikus aberráció), hisztológiából származók (egyenetlen zsugorodás) vagy a rekonstrukciós eszköz mikro-mechanikai pontosságára visszavezethetők. Meg kell említeni, hogy összevetve a látókéregben alkalmazott hasonló módszerekkel (Ts'o és Gilbert, 1988; Malach és mtsi., 1993; Levitt és mtsi., 1994; Bosking és mtsi., 1997; Kisvarday és mtsi., 1997; Sincich és Blasdel, 2001; Ts'o és mtsi., 2001; Buzas és mtsi., 2006), viszonylag nagy metszeteket használtunk, ami tovább nehezíti a precíz illesztést. Azonban az Eredmények fejezetben (ld. B.I.3.) ismertetett kontroll méréseink alapján az illesztések pontosságát a kérdéseink megválaszolását tekintve megfelelőnek ítéltük. A beadási helytől távoli pontatlanságok az eredményeket lényegesen nem befolyásolták.

#### 3. Axonfoltok azonosítása

Az axonfoltok szinaptikus integrációban játszott meghatározó szerepét a boutonok itt talált kiemelkedően magas sűrűségével igazoltuk. Korábbi munkákból ismert volt a terminális axon arborizációk folt-szerű struktúrája a szomatoszenzoros kéregben (Krubitzer és Kaas, 1990a; Lund és mtsi., 1993; Manger és mtsi., 1997). Lund és mtsi. (1993) azt is leírták, hogy a szomatoszenzoros kéregben az axonfoltok kevésbé kifejezettek, mint a látókéregben. Saját megfigyeléseink szerint axonfoltok egyértelműen azonosíthatók, bár a jelölődésük erőssége változó. A gyengén jelölődő axonfoltok körülhatárolása jóval kevésbé egyértelmű, mint az erősen jelölteké és bizonyára több gyengén jelölt axonfolt azonosítatlan maradt. Az axonfoltok körülhatárolásának szubjektív volta ellenére az általunk azonosított foltok mérete hasonló volt a korábban közölt adatokhoz (Lund és mtsi., 1993; Sincich és Blasdel, 2001) és szintén összeegyeztethető volt a szomatoszenzoros kérgi funkcionális modulok méretével (200-300 µm; Chen és mtsi., 2001; Friedman és mtsi., 2004).

#### 4. Réteg-lokalizáció

A tangencionális metszetek szabályos mintavételezése miatt kieső metszetek hiányában az agykérgi rétegek pontos meghatározására nem volt lehetőség. Ennek ellenére a Módszertanban ismertetett metódust követve sikerült reprodukálni Burton és Fabri (1995) eredményét az erős szupragranulársi jelölődést illetően. Ugyanakkor kisebb arányú infragranuláris jelölődést kaptunk, mint az idézett tanulmány. A szupragranuláris jelölés dominanciája a két alacsony szintű szomatoszenzoros kérgi área összeköttetésében szintén összhangban van a látókérgi hierarchiában azonosított kapcsolatok rétegeloszlásával (Barone és mtsi., 2000; Vezoli és mtsi., 2004).

#### 5. Statisztikai összehasonlítások

A kis esetszám miatt a statisztikai összehasonlítások megbízhatósága elmaradt az elvárttól. Ez különösen érvényes populációk közötti összeköttetések összehasonlításaira. Az elemszámbecslés megmutatta, hogy a 80%-os megbízhatóság eléréséhez az esetszámot meg kellett volna háromszoroznunk. A kis esetszám főemlős kísérletekben általános probléma, amit sok, egymást kiegészítő adat gyűjtésével próbáltunk kompenzálni. E hiányosság ellenére a kvantitatív eredmények összhangban voltak a kvalitatív megfigyeléseinkkel. Ennek egyik példája a 39. ábrán megfigyelhető kisebb kiterjedésű és sűrűségű anterográd és retrográd jelölés az inter-áreális kapcsolatok esetén az áreán belülivel összehasonlítva. Ez a kvantitatív adatokon is megjelenik, ami a 40B, 42A ábrákon látható. Ugyancsak az eredményeink megbízhatósága mellett szól, hogy az egyes esetek között, bár voltak kívülállók, konzisztens eredményeket kaptunk (ld. a vonalak esésének irányát pl. a 40., 41. és 46. ábrákon). Nagy eltérések a nyers adatokban látszottak (terület, hosszúság) részben a pályajelölés mintavételezéssel kapcsolatos érzékenysége miatt (Vezoli és mtsi., 2004), másrészt a populációra jellemző állatok közötti várható különbségek miatt. Relatív értékek (arányok) használatával javult az adatok konzisztenciája az egyedek között. Végül azt is meg kell említeni, hogy különböző struktúrák összehasonlítása csak kellő elővigyázatossággal lehetséges, mert nehéz ekvivalens mértékeket találni (pl. axonfoltok és projekciós neuronok kiterjedésére). Az említett hátrányokat figyelembe véve eredményeink hozzájárulnak az intrinzik és interáreális összeköttetések viszonyának jobb megértéséhez a hierarchikus kapcsolatban álló áreák hálózatában.

II. Az áreán belüli és áreák közötti interakciók funkcionális anatómiája a szomatoszenzoros kéregben, főemlősökben

#### 1. Áttekintés

A szomatoszenzoros kéreg 3b és 1 áreáiban általunk kimutatott idegi kapcsolatok eloszlása nagy vonalakban megfelelt a korábbi pályajelöléses munkák eredményeinek (Krubitzer és Kaas, 1990a; Burton és Fabri, 1995; Manger és mtsi., 1997; Fang és mtsi., 2002). Azonban a korábbi tanulmányoktól eltérően munkánk során a tapintásban kiemelkedő fontosságú disztális ujjbegy reprezentáció összeköttetéseire fókuszáltunk. Továbbá, az együttes IOS és elektrofiziológiai funkcionális térképezés, a kisebb, kolumna méretű kérgi területek beinjektálása valamint a hatékonyabb adatelemzési módszerek alkalmazása a disztális ujjbegy reprezentáció összeköttetéseinek korábban nem azonosított, pontosabb meghatározását tették lehetővé.

Kétirányú pályajelöléssel az axonfoltok és a legsűrűbb retrográd jelölést tartalmazó területek átfedésével bizonyítottuk a 3b és 1 áreák összeköttetéseinek reciprocitását. Az IOS-el és elektrofiziológiai térképezéssel kombinált pályajelöléses módszerrel bizonyítani tudtuk a szomszédos disztális ujjbegy reprezentációk közötti erőteljes összeköttetéseket mindkét vizsgált áreán belül. Ezzel szemben a két área között erős összeköttetést a homotóp disztális ujjbegy reprezentációk között mutattunk ki. Szembetűnő különbség volt, hogy área 3b-vel összehasonlítva área 1-ben a disztális ujjbegy reprezentációk erősebb kapcsolatokat létesítettek a beinjektált ujj-reprezentáció proximális területeivel is, ami alátámasztja a fiziológiai mérési eredményeket (Iwamura és mtsi., 1983b). Összességében eredményeink azt bizonyítják, hogy áreán belül több ujjbegyből származó információ integrálásával az összeköttetések a globális tapintási érzet kialakulásában játszanak fontos szerepet. Ettől eltérően az áreák közötti összeköttetés ujj, sőt ujjbegy-specifikus információt közvetít.

Az área 3b és área 1 között egysejt aktivitás-méréssel meghatározott funkcionális kapcsolatmintázat konzisztens a nyugalmi állapotú BOLD korrelációval azonosított kapcsolatmintázattal és megegyeztek a pályajelöléssel azonosított medio-laterális és antero-posterior főtengelyekkel jellemezhető axonális összeköttetési mintázattal. Bár az anatómiai és funkcionális hálózatok közötti egzakt kapcsolat nem ismert, abban egyetértés van, hogy a nyugalmi funkcionális kapcsolatmintázat bizonyos mértékig megfeleltethető az anatómiainak (pl. Vincent és mtsi., 2007; Honey és mtsi., 2009; ill. összefoglaló munkák: Deco és Corbetta, 2011; Behrens és Sporns, 2012). A

szomatoszenzoros kéregben Matsui és mtsi. (2011) szoros összefüggést találtak az anatómiai kapcsolatmintázat és a mikroelektromosan aktivált effektív hálózati konnektivitás között. Eredményeink további bizonyítékul szolgálnak az anatómiai és a nyugalmi állapotú funkcionális hálózatok szoros kapcsolatára, de a korábbi adatoktól eltérően a milliméter skálájú köztes szintű hálózatokban. A három különböző adatsor (egysejt aktivitás, BOLD és pályajelöléses) egyöntetűen bizonyítja az erős ujjbegyek közötti interakciókat az áreán belüli, és az azonos ujj reprezentációk interakcióját a két área közötti jelátvitelben (82. ábra).

Az idegsejt aktivitás korrelogramjainak aszimmetriája az információáramlás eltérő sebességéből adódhat az áreák közötti és áreán belüli összeköttetések mentén. A 3b és 1 áreák közötti, fokozott spontán aktivitás alatt mért kereszt korrelogramok aszimmetriája a felszálló pályák domináns aktivitásával magyarázhatók az inter-áreális interakciókban. Az idegi összeköttetések sűrűségeloszlásának megfelelően az interáreális interakció erősebb az azonos, mint a szomszédos ujjbegy reprezentációk között. Ugyancsak összhangban a pályajelöléses munkák eredményeivel, área 3b-ben jelentős ujjak közötti interakciók azonosíthatók az idegsejt aktivitások korrelációja segítségével. Az áreán belüli interakciók aszimmetrikus korrelogramjai a közös bemenettel szemben a horizontális összeköttetések szerepére utalnak az idegsejtek közötti kommunikációban. Az inter-áreális interakciókat jellemző kereszt-korrelációkkal összehasonlítva az áreán belüli interakciók erősebb aszimmetriáját az aktivitás lassabb terjedése okozhatja. Figyelemre méltó, hogy ez az eredmény összhangban van a különböző vastagságú rostok általunk leírt eloszlásával: a gyorsabb vezetőképességű, feltehetően mielines rostok elsősorban az áreák közötti homotóp területeket kötik össze, míg áreán belül a laterális kapcsolatokat vékony, csupasz axonok létesítik. Az áreán belüli és azok közötti kapcsolatmintázatbeli és dinamikai különbségek a kétféle pálya eltérő szerepére utal az aktív tapintásban, egyrészről az ujj-specifikus információ integrációjában, másrészt a különböző ujjakból származó információ koordinációjában (Johansson és Flanagan, 2009; Keysers és mtsi., 2010). Azaz, a kéz reprezentáció területén a disztális ujjbegy reprezentációk közötti horizontális összeköttetések az információ integrációjáért felelősek az egyes áreákban, míg az áreák közötti funkcionális transzformáció ujjbegy specifikus, a homológ bőr reprezentációk közötti információ frissítését szolgálhatja.

#### 2. Funkcionális következtetések: integráció a kéz reprezentáció területén 3b és 1 áreákban

A hagyományos nézet szerint área 3b-ben a RF egyetlen ujjra lokalizált. Ezzel szemben egyre több adat bizonyítja a különböző ujjakból származó taktilis információ integrációját mind altatott, mind éber majmokban (Chen és mtsi., 2003; Reed és mtsi., 2008; Lipton és mtsi., 2010). Área 3b-ben a környéki gátlás legerőteljesebben a szomszédos ujjbegyek között mérhető (Thakur és mtsi., 2012). Hasonló ujjak közötti integráció ismert área 1-ben is (Friedman és mtsi., 2008; Chen és mtsi., 2009) és ugyancsak erőteljes környéki gátlás jellemzi área 1-ben a taktilis információfeldolgozást (Sripati és mtsi., 2006). Összhangban az előbbiekkel elektrofiziológiai tanulmányok komplex téridőbeli RF struktúrát írtak le 3b és 1 áreákban (Sripati és mtsi., 2006; Reed és mtsi., 2010a, 2012; Thakur és mtsi., 2012). A tölcsér illúzió jó példa az ujjak közötti integráció funkcionális jelentőségére. Képalkotó eljárásokkal sikerült kimutatni, hogy a szomszédos ujjak egyidejű ingerlése az érzetnek megfelelő lokalizációval egyetlen kérgi terület aktivációját eredményezi (Chen és mtsi., 2003, 2007; Friedman és mtsi., 2008). E jelenségek és fiziológiai folyamatok strukturális alapját ismereteink szerint legalábbis részben az áreán belüli horizontális összeköttetések biztosítják (Angelucci és Bressloff, 2006; Shushruth és mtsi., 2009). Eredményeink összhangban a fiziológiai adatokkal arra utalnak, hogy az áreán belüli összeköttetéseknek köszönhetően az ujjak közötti integráció már área 3b szintjén elkezdődik megalapozva a tapintott objektum globális tulajdonságainak több ujjból eredő információn alapuló reprezentációját. A laterális kapcsolatok ugyancsak fontos szerepet kaphatnak a tapintási utóhatások ujjak reprezentációi közötti átvitelében (Kappers, 2011), valamint a több ujjat igénylő haptikus explorációban (Dijkerman és de Haan, 2007).

Área 3b-vel összehasonlítva área 1-ben az idegsejtek akár több ujjat átfedő, nagyobb bőrfelületről származó információt integrálnak és magasabb rendű inger tulajdonságokra érzékenyek, mint pl. a textúra, érdesség vagy mozgás (Bensmaia és mtsi., 2008; Pei és mtsi., 2010; Tremblay és mtsi., 1996). Emellett área 1-ben a RF-k erősebb nemlineáris dinamikával jellemezhetők, mint área 3b-ben, ami pl. komplex térbeli tulajdonságok sebesség invariáns kódolását teszi lehetővé (Sripati és mtsi., 2006). A feltevések szerint a szomatoszenzoros kérgi hierarchia nagyrészt az área 3b efferensek konvergenciájának eredménye área 1-ben (Jones, 1975; Iwamura, 1998). E nézettel összhangban área 3b-ben pályajelölő anyagok több ujj reprezentációjába történő injektálása átfedő jelölődést eredményez área 1-ben a különböző ujjbegy reprezentációkban (Liao és mtsi., 2013). Érdekes, hogy área 1-ben a RF-k ugyanabban a kolumnában (600 µm) is változatos mérettel és formával jellemezhetők. Ugyanakkor ezek mindegyike tartalmaz egy részt, ami ugyanazt a kis bőrfelületet (hotspot) reprezentálja (Favorov és Whitsel, 1988). Ennek köszönhetően populációs válaszok 2-dezoxiglükóz (Tommerdahl és mtsi., 1993) vagy IOS (Chen és mtsi., 2003; Friedman és mtsi., 2008) tanulmányozásával kis, lokális aktivitási foltként azonosíthatók egy disztális ujjbegy ingerlését követően. Eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy a lokális "hotspot"-ok kialakításában a felszálló inter-áreális kapcsolatok játszanak fontos szerepet, míg a RF méretének változékonyságáért az áreán belüli összeköttetések és a visszacsatolások felelősek. Ezek a megfontolások, legalábbis részben rávilágítanak a szomatotópiás térképek kialakulásának és áreák közötti különbségeinek okaira (Sur és mtsi., 1980).

Az áreán belüli összeköttetések további szerepére Reynaud és mtsi. (2012) tettek javaslatot, kimutatva, hogy V1-ben a kontextusfüggő moduláció lényeges mechanizmusát jelentő lokális bemenet normalizációja laterális interakciókon alapul. Feltehető, hogy área 1-ben hasonló laterális interakciók lényeges szerepet játszanak invariáns választulajdonságok kialakításában, mint a sebesség, textúra forma és intenzitás esetén tapasztalható (Sinclair és Burton, 1991; Pei és mtsi., 2010). Pei és mtsi. (2011) kimutatták, hogy área 1-ben az idegsejtek irányszelektivitása az área 3b-ben lokalizált lokális mozgásdetektorok vektor átlagainak eredménye. Ez alapján felmerül, hogy az inter-áreális integráció hasonló divizív komputáción alapul, mint az áreán belüli.

#### III. Összeköttetési mintázatok idegsejt populációk szintjén

#### 1. Áttekintés

Mindenek előtt fontos hangsúlyozni, hogy kizárólag a nagy sűrűséggel jelölt területek összeköttetési mintázatát tanulmányoztuk, míg a gyengén és diffúzan jelölt területeket, ami a retrográd jelölt neuronok kb. 1%-át tartalmazza, figyelmen kívül hagytuk. Az áreán belüli összeköttetések valamint az két áreát összekötő felszálló pálya és visszacsatolás kiterjedésének összehasonlításával számos, a laterális kérgi interakciók hierarchikus szerveződésének szomatoszenzoros kéregben addig nem ismert anatómiai jellemzőjét azonosítottuk. Kimutattuk, hogy a látókéreghez hasonlóan (Angelucci és Bressloff, 2006; Markov és mtsi., 2014b) a felszálló pálya kis területre lokalizált és feltehetően meghatározó tényező a RF centrumának (hotspot) kialakításában (Favorov és Whitsel, 1988). Ezzel szemben a visszacsatolás és az áreán belüli összeköttetések viszonylag nagy laterális kiterjedése képezheti az ecRF kialakításának, ill. általánosabban a taktilis integratív folyamatoknak a neurális hálózati alapját a postcentralis szomatoszenzoros kéregben. Bár área 3b és área 1 intrinzik összeköttetéseinek laterális kiterjedése lényegesen nem különbözött, a CMF kisebb értéke miatt a horizontális összeköttetések área 1-ben a perifériás bemenet nagyobb térbeli integrációját eredményezik (Sur és mtsi., 1980; Friedman és mtsi., 2008). E funkcióval összhangban elsőként mutattuk ki, hogy az áreán belüli kapcsolatokhoz hasonlóan az inter-áreális összeköttetések, mind a felszálló pálya és a visszacsatolás, az ujjak reprezentációját keresztezve anizotrop eloszlással jellemezhetők.

Az IOS kiterjedésével összehasonlítva kimutattuk a különböző összeköttetések (intrinzik, FF és FB) szerepét a populációs válaszban (ld. bővebben alább). Mérési eredményeink alapján pontosítani tudtuk és kiegészítettük az információáramlás irányára az előző fejezetben tett megfigyeléseinket. Az áreák között ugyanis aszimmetrikus a kommunikáció abban az értelemben, hogy área 3b-ben az área 1-ből eredő visszacsatolás axonfoltjainak laterális eloszlása hasonló kiterjedésű, mint az intra-áreális összeköttetéseké és nagyobb, mint az área 3b-ből eredő felszállópálya afferens területe área 1-ben. Összességében a két szomszédos, reciprok kapcsolatban álló área összeköttetéseinek összehasonlítása megfeleltethető a látókérgi adatoknak (Angelucci és Bressloff, 2006; Markov és mtsi., 2013b, 2014b) és lényeges információt szolgáltatott a köztes szintű kanonikus hálózati motívum szerkezetéről (82. ábra).

# 2. A szomatoszenzoros kérgi összeköttetések laterális eloszlásának hierarchikus jellemzői a. Az összeköttetések laterális eloszlása

Az agykéregben a konnektivitás szerint meghatározott hierarchia általában az asszociációs pályák rétegeloszlásának azonosításán alapul; az idegi kapcsolatok laterális eloszlásának hierarchikus jellemzőit látókérgi adatokból ismerjük (Angelucci és Bressloff, 2006; Markov és mtsi., 2013b, 2014b). A látókéreghez hasonlóan a szomatoszenzoros kéregben a visszacsatolásért felelős projekciós neuronok és efferens axonfoltok nagyobb bőrfelületről származó információ integrációját biztosító horizontális kiterjedéssel jellemezhetők, mint az erősen lokalizált felszálló pálya (Angelucci és Bressloff, 2006; Markov és mtsi., 2014b).

A populációs válaszért (pRF) felelős hálózat feltérképezésére tett kísérletünk arra az eredményre vezetett, hogy az áreán belül vetítő neuronokat nagy sűrűségben tartalmazó terület hasonló méretű, mint az IOS-terület és erősen át is fed azzal. A felszálló pálya afferensei homotóp területek populációs aktivitását azonosító IOS-területet célozzák, míg a visszacsatolás afferensei heterológ szomatotópiás reprezentációkat is elérnek, ami összhangban van Juliano és mtsi. (1990) pályajelöléssel kombinált 2dezoxiglükóz jelöléssel kapott eredményeivel. A látókérgi mintának megfelelően a visszacsatolás efferens axonfoltjainak heterológ szomatotópiás lokalizációja felveti a pálya szerepét az ecRF kialakításában a szomatoszenzoros kéregben is (Angelucci és Bressloff, 2006). Eredményeink, miszerint a visszacsatolás axonfoltjai nagyobb területen ugyanakkor kisebb sűrűséggel szóródtak és gyakran a vetítő neuronokat kisebb sűrűségben tartalmazó területekre lokalizálódtak ugyancsak összeegyeztethető a visszacsatolás aktivitást moduláló szerepével, ellentétben az erősen konvergens felszálló pálya fiziológiai tulajdonságát tekintve meghajtó hatásával (Angelucci és Bressloff, 2006; Markov és mtsi., 2013b, 2014b). Angelucci és mtsi. (2002) azt is kimutatták, hogy V1ben a visszacsatolás laterális kiterjedése a hierarchikus távolság növekedésével egyre extenzívebbé válik. Hasonlóképpen área 3b-ben a magasabb rendű áreákból (pl. área 5; Pearson és Powell, 1978; Burton és Fabri, 1995) eredő visszacsatolás laterális kiterjedése nagyobb lehet mind az área 1-ből eredő visszacsatolásénál, mind az erőteljes áreán belüli efferentáció axonfoltjainak laterális eloszlásánál.

Az összeköttetések horizontális kiterjedése által reprezentált, CMF segítségével meghatározott bőrfelület méretét figyelembe véve área 1 jóval nagyobb perifériás bemenetet integrál, mint área 3b. Ez igaz az áreán belüli kapcsolatokra valamint a visszacsatolás eredetét jelentő inter-áreális vetítő neuronokat tartalmazó kérgi területre. Míg tehát área 3b-ben a viszonylag nagy kérgi területet lefedő visszacsatolás efferens axonfoltjainak laterális eloszlása által reprezentált bőrfelület mérete nagyjából megegyezik azzal, amit área 3b intra-áreális efferenseinek laterális eloszlása reprezentál, addig a FB (área 1  $\rightarrow$  área 3b) eredetét jelentő vetítő neuronok populációjának nagy bőrreprezentációja miatt a visszacsatolás efferens axonfoltjai heterológ szomatotópiás információt közvetítenek área 3b-be. Összegezve, área 1-ben a laterális kérgi összeköttetések jóval kiterjedtebb perifériás integrációt eredményeznek, mint área 3bben, ami összhangban van a nagyobb, több ujjra terjedő RF mérettel és komplex RF tulajdonságokkal área 1-ben (Sathian, 2016; Yau és mtsi., 2016).

#### b. A vetítő neuronok klasztereződése

Eredményeink szerint a vetítő neuronok eltérő térbeli csoportosulással jellemezhetők a két áreában. Área 1-hez képest área 3b-ben a klaszterek nagyobb száma

dc\_1938\_21

az idegsejtek erősebb klaszterképző hajlamát jelzi. Érdekes, hogy a látókéregben V1 és V2 összeköttetéseiben a vetítő neuronok erősebb csoportosulása figyelhető meg V1-ben Gilbert és Wiesel (1989), Jeffs és mtsi. (2009), valamint Negwer és mtsi. (2017) közleményeiben az ábrák alapos tanulmányozásával. Markov és mtsi. (2014b) a szupragranuláris rétegben mutatták ki retrográd jelölt neuronok koncentráltabb eloszlását, ill. nagyobb topográfiai specificitását az inter-áreális kapcsolatokban, látókéregben. Az infragranuláris rétegben nem észleltek klaszteres eloszlást. Esetünkben az intra- és interáreális összeköttetések egyaránt nagy szupragranuláris aránnyal jellemezhetők mindkét szomatoszenzoros áreában. Felmerül, hogy az eltérő klasztereződés a két área eltérő sejtsűrűségével függ össze, ami nagyobb área 3b-ben, mint área 1-ben (Sur és mtsi., 1982). Érdekes, hogy az intra- és inter-áreális jelölés sűrűsége nem különbözik olyan mértékben área 1 beadást követően, mint área 3b beadást követően. Ez feltehetően az áreán belüli projekció erős granuláris rétegi jelölődésének köszönhető área 3b-ben, ahol a nagyobb sejtsűrűségért elsősorban a granuláris réteg felelős (Sur és mtsi., 1982). A granuláris réteget főleg serkentő interneuronok alkotják, melyek nagy számban jelölődhettek a BDA beinjektálása során. A feltevést, hogy área 3b-ben a granuláris réteg felelős az erőteljesebb klaszterezettségért alátámasztja, hogy az intra- és inter-áreális klaszterszám jobban különbözött área 3b, mint área 1 beadások után. Másrészt a főként szupragranuláris rétegi inter-áreális projekciós neuronok klaszterezettsége szintén nagyobb ára 3b-ben, mint área 1-ben, ami arra utal, hogy a szemcsés réteg csak részben felelős a két área klaszterszámbeli különbségéért. Figyelembe véve, hogy kolumna méretű kérgi területek összeköttetéseit vizsgáltuk, eredményeink alátámasztják Herculano-Houzel és mtsi. (2008) felvetését, hogy különböző áreákban a kolumnák interáreális összeköttetéseinek sűrűsége az áreák eltérő sejtsűrűségével arányosan változhat.

Az összeköttetések eltérő mértékű csoportosulásának egy lehetséges oka, hogy a klasztereződés és a RF mérete az egyes áreákban összefügg, és a neuronok, melyek RF mérete kisebb erősebben klasztereződnek. Ennek megfelelően área 3b-ben, ahol az idegsejtek RF mérete kisebb, mint área 1-ben, nagyobb számú klasztert találunk (Iwamura és mtsi., 1983a; Sur és mtsi., 1980, 1985). Área 3b-ben az összeköttetések topografikus szerveződését és a vetítő neuronok nagyobb sűrűségét számításba véve az erősebb klasztereződés hozzájárulhat a taktilis hiperérzékenységhez (Mancini és mtsi., 2012). Érdekes hipotézis lehet az is, hogy magasabb rendű áreákban az összeköttetések kisebb klaszterezettsége a releváns funkcionális reprezentáció alacsony mintavételi sűrűségét eredményezi az áreák közötti interakciókban. Ebben a tekintetben fontos kérdés

a mintavételi sűrűség összefüggése a RF eltérő méretével, ill. a kérgi nagyítási faktorral. E szerint área 1-ben a nagyobb RF miatt a funkcionális reprezentáció kisebb számú idegsejt aktivitásából rekonstruálható; másként nézve egyforma méretű neuronpopuláció nagyobb bőrfelületet reprezentál área 1-ben, mint 3b-ben. A nagyítási faktor által meghatározott populációs válasz méretéből kiindulva elképzelhető, hogy magasabb hierarchia szinteken kisebb számú neuron aktivitása elegendő az elsődleges szenzoros információ reprezentálásához, mint az elsődleges érzőkéregben. E kérdések megválaszolása további kutatásokat igényel. Az, hogy az agykérgi hálózatban a projekciós neuronok klasztereződése az összeköttetések fontos hierarchikus tulajdonsága összhangban van más agykérgi áreákra jellemző tulajdonságok, mint a konnektivitás, funkcionális reprezentációk és citoarchitektúra hierarchikus viszonyoknak megfelelő változásával (Dombrowski és mtsi., 2001; Hilgetag és Grant, 2010; Barbas, 2015; Barbas és García-Cabezas, 2016; Hilgetag és mtsi., 2016).

#### 3. Az összeköttetések szerepe az RF kialakításában

A tanulmányunkban feltérképezett összeköttetések laterális eloszlása megegyezik a látókéregben ismert eloszlásnak és ezáltal feltehető, hogy a RF centrumát lényegében a felszálló pálya aktvitása alakítja, míg a visszacsatolás az áreán belüli összeköttetésekkel együttesen alakítják az ecRF-t magába foglaló perifériát a szomatoszenzoros kéregben is (Girard és Bullier, 1989; Bullier és mtsi., 1996; Hupé és mtsi., 1998; Bair, 2005; Angelucci és Bressloff, 2006; Harrison és mtsi., 2007; Bardy és mtsi., 2009). Az összeköttetések anizotrop eloszlásának meghatározása további funkcionális következtetésekre ad lehetőséget, ugyancsak a látókéregben leírtakhoz hasonlóan (Sincich és Blasdel, 2001). A különböző összeköttetések eloszlásának hasonló orientációja meghatározza a térbeli integráció funkcióját, ami eredményeink szerint a 3b és 1 áreák alkotta hálózatban az ujj reprezentációkat keresztezve elsősorban a különböző ujjakból származó információ integrációja. Fontos megjegyezni, hogy az inter-áreális összeköttetések anizotrópiáját egzakt módon elsőként határoztuk meg és az área 3b-1 viszonyában ez az áreán belüli összeköttetésekhez hasonló orientációt mutatott.

Az eredményeinkben felvázolt hálózat ugyancsak szerepet játszhat az egysejt szinten kimutatott taktilis almodalitások integrációjában área 3b-ben. Pei és mtsi. (2009) kimutatták, hogy área 3b-ben az idegsejtek jelentős hányadára jellemző mind a gyorsan valamint a lassan adaptálódó választulajdonság. A szerzők szerint a kevert RF tulajdonság a különböző mechanoreceptorokból eredő felszálló pályák talamokortikális kapcsolatok

konvergenciájának eredménye área 3b-ben. Azonban, számításba véve a viszonylag hosszú ingerlést ( $\geq$  62 ms) és az ingerlés és idegsejt-válasz közötti késleltetést ( $\geq$  100 ms) az almodalitások integrációjában a kérgi interakciók is szerepet játszhatnak. A később tárgyalásra kerülő, tanulmányukban leírt reciprok, gyorsan vezető axonális összeköttetésen keresztül az área 1 válaszaiban nagy számban mérhető gyorsan adaptálódó RF-tulajdonság (Paul és mtsi., 1972) a mért időtartam alatt eljuthat área 3b-be. Ezt a feltevést alátámasztja, hogy a gyorsan adaptálódó hatás kései OFF válaszként jelentkezett a kevert választulajdonságú idegsejtek aktivitásában. Az integráció ugyancsak megvalósulhat az almodalitás specifikus kolumnák (Sur és mtsi., 1981; Chen és mtsi., 2001; Reed és mtsi., 2010a,b) interakciójával az áreán belüli összeköttetéseken keresztül área 3b-ben. Továbbá, az almodalitások área 3b-hez hasonló moduláris reprezentációja área 1-ben (Friedman és mtsi., 2004) felveti az integráció iteratív, intra-és inter-áreális interakciókon keresztül megvalósuló folyamatának lehetőségét is. Hasonló, az összeköttetések közötti rekurzív kölcsönhatásokon alapuló kérgi integráció javasolt Rockland (2015) látókérgi adatok alapján.

#### 4. A populációs válasz hálózati alapjai az agykéregben

Eredményeinkből arra következtethetünk, hogy egy kolumna méretű kérgi terület bemenetét jelentő vetítő neuronok, és a célterületet meghatározó efferens axonfoltok laterális kiterjedése az összeköttetések által meghatározott kérgi hierarchiában elfoglalt pozíciótól függ. Emberben végzett fMRI kísérletek eredményei szerint V1-ben és a vele összeköttetésben álló látókérgi áreákban a pRF és a CMF méretek közötti összefüggés az agykéregi jelfeldolgozó architektúrát jellemző univerzális tulajdonsága (Harvey és Dumoulin, 2011). Harvey és Dumoulin (2011) állítása szerint a hierarchiában közeli áreák esetén az inter-áreális kommunikáció azonos méretű feldolgozó egységekre, modulokra épül. Tanulmányunkban az IOS-áreával azonosított pRF mérete jó megegyezést mutatott az áreán belül vetítő neuronok laterális kiterjedésével és, área 3b intra-áreális kapcsolatait kivéve, az egyedi AFCS-k méretével. Hasonlóan V1-hez, ahol a pRF mérete az excentricitástól függően fordítottan arányos a CMF-al (Harvey és Dumoulin, 2011), az IOS-área is nagyobb volt área 3b-ben, mint a kisebb CMF-al bíró área 1-ben (Friedman és mtsi., 2008). Ennek megfelelően mind az afferens és efferens terület nagyobb bőrfelületet reprezentált área 1-ben, mint área 3b-ben csakúgy, ahogy a látókéregben a pRF mérete a CMF csökkenésével arányosan nő (Harvey és Dumoulin, 2011). Az összeköttetések laterális eloszlásával kapcsolatos eredményeink alapján a pRF méretét meghatározó konstans méretű kérgi egységek interakciójára vonatkozó javaslat (Harvey és Dumoulin, 2011) annyiban módosulhat, hogy az áreák kölcsönhatásában részt vevő terület mérete a hierarchikus viszony függvényében változik. Eredményeinkből arra következtetünk, hogy az agykéregben hasonló méretük miatt a populációs válasz (IOSterület) alapját a sűrűn tömörülő projekciós neuronokkal átfedő efferens axonfoltok egymásra hatása képezi. Az aktív kérgi terület mérete azonban a távoli területekre vetülő intra-áreális efferensek valamint a visszacsatolások axonfoltjainak aktivitása miatt megnövekedhet, különösen éber állapotban (Chen és mtsi., 2005). Annak tükrében, hogy a látókéregben a konnektivitás hasonló architektúrája feleltethető meg a RF struktúrának, beleértve az ecRF-t (Angelucci és Bressloff, 2006) valamint hogy az összeköttetések moduláris szerveződése általános kérgi tulajdonság főemlősökben (Lund és mtsi., 2003), két szomszédos kérgi área kolumna szintű összeköttetésivel kapcsolatos eredményeink alapján feltehető, hogy a köztes, populáció-szintű feldolgozás alapját egy általános hálózati motívum képezi. Ez a köztes szintű, hierarchikusan szervezett hálózati motívum neurobiológiai alapját képezheti az egyre bonyolultabb választulajdonságok (RF), ill. reprezentációk kialakulásának az agykéregben.

A kanonikus modul a következő megfigyeléseken alapul: a kolumna méretű kérgi terület meghatározó bemenetét az áreán belüli vetítő neuronok adják, ami célterülete a kisebb laterális kiterjedésű, alacsonyabb szintű áreákból érkező felszálló pálya axonfoltjainak; e két pálya határozza meg az idegsejtek klasszikus RF-t. A kolumnát célzó inter-áreális felszálló pálya és visszacsatolás eredetét képező sűrű projekciós neuroncsoport kisebb laterális kiterjedése miatt az intra-áreális bemenetet képező idegsejt csoport részhalmaza lehet, vagy attól elkülönült neuronok populációja. Az inter-áreális felszálló efferens pályák axonfoltjai átfednek a szomszédos área egy kolumnájába vetítő felszálló pályát vagy visszacsatolást képező neuronok alkotta afferens területet meghatározó idegsejt csoporttal. Ezzel ellentétben a szomszédos áreából eredő visszacsatolást létesítő axonfoltok az intra-áreális efferens axonfoltokkal együtt az intraáreális vetítő neuronok afferens területén túl nyúló területet innerválnak. Nagyobb hierarchikus különbség esetén azonban a visszacsatolás axonfoltjai nagyobb horizontális területet fedhetnek le. Az áreán belüli és a visszacsatolás efferens axonfoltjai tehát fontos szerepet játszanak az ecRF kialakításában. A funkcionális szelektivitásban pedig az összeköttetések anizotrop eloszlása játszik kiemelkedő szerepet. Topográfiai okok miatt hasonló szerepe lehet a klaszterezettségnek: a részletgazdag topográfiával jellemezhető alacsonyabb rendű áreákban a vetítő neuronok és az intrinzik axonfoltok erősebben csoportosulnak, csakúgy, mint a felszálló efferens axonfoltok. Ezzel szemben a visszacsatolás és a magasabb rendű áreák intrinzik axonfoltjai lazább térbeli struktúrával jellemezhetők. A kanonikus hálózati modellt a 82. ábra szemlélteti.

C. Az élek szerkezete és szerepe az agykérgi kommunikáció dinamikájában: axonok és axonvégződések strukturális jellemzői

#### I. Módszertani megfontolások

A szabályos intervallumú metszetsorozatokon az axonális összeköttetéseket csak egy-egy metszetre korlátozódó *axon szakaszok rekonstrukciójával* tanulmányozhattuk. Ahhoz, hogy az egyes axonális pályák szerepéről pontosabb képet alkothassunk szükséges az axonok folytatólagos, metszet sorozatokon keresztül történő részletesebb feltérképezése. Enélkül csak indirekt követeztetéseket vonhatunk le azok funkcionális szerepét illetően. Ugyanakkor a nagyszámú axon szakasz feltérképezése elegendőnek bizonyult az eloszlási mintázatok lényeges tulajdonságainak meghatározásához. Azt is meg kell említeni, hogy a vastag, boutonokat nem formáló axonok mileinhüvely borítását csak intracelluláris jelöléssel, elektronmikroszkóppal és/vagy többszörös jelölés alkalmazásával lehet teljes bizonyossággal megállapítani.

A szinaptikus struktúrák, esetünkben az axonvégződések finomszerkezetének meghatározását az afferens eredetének azonosítása céljából alkalmazott szöveti festési technikák nehezítik. Az elterjedt és általunk is alkalmazott csapadék kiválást eredményező módszer elfedi az ultrastruktúra finom részleteit, pl. kizárhatja a szinaptikus vezikulumok azonosítását és/vagy morfológiájának meghatározását. Ugyanakkor az agykéregben a neuronhálózatok komplexitása miatt (kéreg alatti összeköttetések, lokális hálózatok, távoli intrinzik és áreák közötti összeköttetések, kallózális pályák) lényeges a különböző eredetű pályák azonosítása (ld. Bevetés, A. alfejezet utolsó bekezdés és D.II. alfejezet). A szinapszisok szerkezetének meghatározása egyetlen metszési síkja alapján szintén nehézségekbe ütközik, amennyiben a minta méretét korlátozza pl. az esetünkben alkalmazott BDA-jelölés. Még az általánosan elterjedt módszerrel, a szinaptikus kontaktus egyértelmű azonosíthatósága (pre-, és posztszinaptikus membrán specializáció és a szinaptikus rés), sem zárható ki, hogy lényeges részletek kiátlagolódnak a populáció statisztikai jellemzése során. Erre a problémára a teljes 3D rekonstrukció ad megoldást. Ez azonban jelöléssel azonosított struktúrák esetén, ahol a korszerű, nagy áteresztőképességű, automatizált módszerek nem vagy korlátozottan alkalmazhatók, rettentően időigényes feladat.

A nagyméretű kérgi boutonok összehasonlító vizsgálatában a mintánk kis elemszáma rontja az eredmények jelentőségének megítélését. Az alkalmazott módszer hatékonyságának próbájaként elemzésünket nagy elemszámú humán mintán is elvégeztük. Mindkét mintával hasonló eredményeket kaptunk, ami egyrészt mutatja, hogy a PCA hatékony módszer. Ezt az egyváltozós tesztekkel egybehangzó eredmények is alátámasztatják. Másrészt növeli az eredmények alapján levont következtetéseink megbízhatóságát.

## II. Agykérgi kommunikációs csatornák a szomatoszenzoros kéregben: axonmorfológia

Az axonmorfológiára vonatkozó megfigyeléseink egyik figyelemre méltó eredménye volt, hogy a nagyszámú boutont képező, csupasz és többnyire vékony rost között kisebb számban jellegzetes sima lefutású, vastag axon szegmensek is jelölődtek mindkét szomatoszenzoros kérgi áreában. A rekonstruált axon szakaszok eloszlásából arra lehetett következtetni, hogy míg a vékony és csupasz axonok hosszú távú összeköttetést létesítenek áreán belül és azok között egyaránt, addig a vastag rostok döntően inter-áreális összeköttetéseket alakítanak ki. Az előző fejezetekben tárgyalt áreán belüli és azok közötti összeköttetési mintázatok kialakításáért nagymértékben a csupasz rostok felelősek. A boutonokkal nem tarkított, vastag rostok térben korlátozott, erősen topografikus eloszlása, valamint, hogy mindkét área injekcióját követően jelölődnek arra utal, hogy a homológ ujjbegy reprezentációk közötti inter-áreális, reciprok kommunikáció egy szelektív csatornáját képezik 3b és 1 áreák között. Elektronmikroszkópos megfigyeléseink alapján feltehető, hogy a vastag és boutonokat nem formáló axonok mielinizáltak, hasonlóan a fehérállományt képező axonokhoz (Liewald és mtsi., 2014; Vanni és mtsi., 2020). Eredményeink összhangban vannak a látókérgi megfigyelésekkel (Angelucci és Bressloff, 2006) és arra utalnak, hogy az agykéregben a felszálló pályák és visszacsatolások a lassabb vezetőképességű, vékony és boutonokat formáló, csupasz rostok mellett a szomszédos áreák gyors dinamikájú interakcióját biztosító vastag, mielinizát axonokból állnak. Ez a következtetés összhangban van az idegsejtek aktivitásának korrelációiban általunk mért késleltetetéssel (ld. Diszkusszió B.II.1 fejezet). A gyors kommunikációt lehetővé tevő axonális pályák funkcionális jelentőségét bizonyítja, hogy a látókéregben, V1-ben a receptív mező centrumának és perifériájának aktivitását rövid késleltetéssel képesek modulálni interáreális pályák (Angelucci és Bressloff, 2006). A kis késleltetést biztosító információcsere área 3b és 1 azonos pRF-t reprezentáló kérgi területein folyó információfeldolgozás kölcsönösen gyors frissítését eredményezheti. Mindazonáltal további vizsgálatot igényel a korlátozott laterális eloszlással rendelkező vastag axonokból álló pálya pontos szerepének meghatározása a RF tulajdonságok kialakításában a szomatoszenzoros kéregben.

III. Agykérgi kommunikációs csatornák a szomatoszenzoros kéregben: az axonvégződések szerkezete

## 1. A hatékony és adaptív jelátvitel morfológiai jellemzői: a talamokortikális axonvégződés

Kvantitatív elektronmikroszkópos módszerekkel bizonyítottuk, hogy rézusz majomban, a PFC középső rétegeiben Gray I-es típusú szinapszist létesítő, magasabb rendű MD magból származó afferensek végződései hasonlóan nagyméretűek, számos mitokondriumot tartalmaznak és komplex elrendeződésű szinaptikus membrán specializációval jellemezhetők, mint az elsődleges szenzoros kérgi talamokortikális végződések (Freund és mtsi., 1985, 1989; Staiger és mtsi., 1996). Továbbá, saját és mások eredményei arra utalnak, hogy a talamokortikális axonvégződések ultrastruktúrája faji eltéréseket sem mutat, azaz univerzális jellemzőkkel bír (rézusz majom és macska: Freund és mtsi., 1985, 1989; patkány: Staiger és mtsi., 1996). Eredményeink azt is alátámasztják, hogy más kérgi területekhez hasonlóan a jelölt MD-afferensek szinapszisaihoz hasonló ultrastruktúrája miatt a PV alkalmas markere a talamokortikális végződéseknek a PFC-ben is (Jones és Hendry, 1989; Jones, 1998). Szemben az azonosított talamokortikális axonvégződésekkel a tanulmányunkban kontrollként használt jelöletlen, nagy valószínűséggel döntően kérgi eredetű szinaptikus boutonok átlagos mérete viszonylag kicsi, ami szintén megfelel az irodalmi adatoknak. Patkányban például, a barrel kéregben kortikotalamikus piramissejtek rekurrens kollaterálisainak axonvégződése kisebb, mint a talamokortikális végződések mérete ugyanott (Staiger és mtsi., 1996).

Más szerzők eredményeivel összhangban, akik egyrészt kimutatták, hogy a talamokortikális szinapszisokat többszörös kontaktus jellemzi (Freund és mtsi., 1985, 1989) valamint, hogy a kérgi eredetű axonvégződések szinapszisai egyszerűbb felépítésűek, többnyire egy kontaktust létesítenek (Schikorski és Stevens, 1997, 1999), kimutattuk, hogy a PFC-ben a MD-ből eredő talamokortikális végződések nagyobb arányban képeznek többszörös kontaktust, mint a környező neuropilben található

ismeretlen, feltehetően főként kérgi eredetű axonvégződések. A többszörös kontaktusnak köszönhetően a talamokortikális jelátvitel nagy megbízhatósággal működik (Gil és mtsi., 1999; Amitai, 2001). Ezzel szemben az egyszeres kontaktussal, azaz jelátvivő anyag felszabadulási hellyel rendelkező szinapszisokon keresztül a jelátvitelt kisebb megbízhatóság jellemzi (Gil és mtsi., 1999).

Funkcionális szempontból ugyancsak fontos megfigyelés, hogy a talamokortikális végződésekben nagy a mitokondriumok előfordulási valószínűsége. Korábbi elektronmikroszkópos munkákban szintén következetesen említésre került a talamokortikális axonvégződések mitokondrium tartalma (Freund és mtsi., 1985, 1989; Staiger és mtsi., 1996). Az axonvégződésekben a mitokondriumok különböző feladatokban vesznek részt és lényeges szerepet játszanak a boutonok dinamikai jellemzőinek kialakításában (Brodin és mtsi., 1999; Scotti és mtsi., 1999). Többek között felmerült, hogy számuk és elhelyezkedésük befolyásolja a transzmitter felszabadulás időbeli mintázatát (Brodin és mtsi., 1999). A talamokortikális szinapszisokat erős rövid távú depresszió jellemzi, ami feltehetően preszinaptikus mechanizmusoknak köszönhető (Amitai, 2001; Chung és mtsi., 2002). A mitokondriumok képesek az intracelluláris kalcium gyors akkumulációjára (Scotti és mtsi., 1999). Megfigyeléseinkkel kiegészítve ezek az eredmények felvetik a mitokondriumok szerepét a talamokortikális végződésekre jellemző rövid távú szinaptikus depresszióban a jelátvivő anyag kalcium-függő felszabadulásának gátlásával.

Összességében a talamokortikális szinapszisokat jellemző többszörös kontaktus és a feltehetően mitokondriumtól függő rövid távú depresszió a hatékony és a változó körülményekhez gyorsan adaptálódó jelátvitel morfológiai indikátorai. Viszonylag nagy méretüket részben indokolhatja a specifikus dinamikai tulajdonságok kialakításához szükséges apparátus helyigénye. Ezzel szemben az agykéregben a neuropilben a boutonok többnyire agykérgi eredetűek és, bár átlagosan kisméretűnek mondhatók, az agykéreg komplex neuron hálózatainak heterogén szinaptikus szerveződését több adat is alátámasztja (pl. Sherman és Guillery, 1998; Halassa és Sherman, 2019; Yakoubi és mtsi., 2019a,b).

#### 2. Párhuzamos kommunikációs csatornák az agykérgi hálózatban: kortiko-kortikális axonvégződések morfológiai osztályozása

Mind a korrelációs analízis és a PCA segítségével a jelölt axonvégződések két csoportját különböztettük meg, egy nagy, és egy kisméretű szinaptikus boutonokból állót,

melyek morfológiai tulajdonságai megfeleltethetők az 1. és 2. típusoknak (Petrof és Sherman, 2013). A boutonok felszíne és térfogata közötti erős korreláció objektív módszernek bizonyult a boutonok csoportosításában. A fény- és elektronmikroszkóppal azonosított csoportok eltérését a boutonok bonyolult, szabálytalan formája okozhatta, ami a 2D fénymikroszkópos vetületben nagyobbnak vagy kisebbnek tűnhet, mint a 3D EM rekonstrukcióval meghatározott méret, különösen a FM felbontásának határán mérve. A PCA alátámasztotta a korrelációval kapott klasszifikáció megbízhatóságát azáltal, hogy a boutonokat hasonlóan csoportosította. A szinaptikus boutonok felszíne és térfogata közötti erős korreláció szoros kapcsoltságot jelez, ami arra utal, hogy a membránhoz kötött valamint a citoplazmában lokalizálódó másodlagos jelátviteli utak szorosan összefüggenek.

Az agykérgi axonvégződések osztályozásában a boutonok méretének fontossága melletti további bizonyítékul szolgált az emberi temporális lebeny vizsgálata (Yakoubi és mtsi., 2019a; Yakoubi és mtsi., 2019b). Ellenérvként felhozható, hogy humán mintában a PCA valamint a felület és a térfogat közötti korreláció csak a boutonok réteglokalizációjának ismeretében eredményezte a kis és nagy boutonok egyértelmű elkülönülését. A majom szomatoszenzoros kérgi és a humán adatok között azonban fontos különbség volt, hogy előbbiben a boutonok eredetét pályajelöléssel azonosítottuk, míg a humán temporális kérgi axonvégződéseket ismeretlen eredetű afferensek változatos populációja alkotta. E különbség figyelembe vételével az emberi halántékkéreg boutonjainak szegregációs tendenciája még meggyőzőbb, és arra utal, hogy a boutonok méret alapján történő azonosítása érvényes és univerzális szabályszerűség. Ezek az eredmények együttesen rámutatnak a kvantitatív 3D elektronmikroszkópia fontosságára az agykérgi boutonok osztályozásában, valamint a bouton-méret, mint megkülönböztető tulajdonság hasznosságára, ami önmagában más szerkezeti elemek, például mitokondriumok, szinaptikus vezikulák és PSD, méretétől és számától függő változó.

A felület- és térfogatmérésekkel a szinaptikus boutonok két osztályát sikerült azonosítani. A legnagyobb gyakorisággal előforduló kisméretűt, amely egyetlen, többnyire dendrittüske-szinapszist alkot és többségében mitokondriumot tartalmaz. Ez a típus megfeleltethető a Sherman és munkatársai definíciója szerinti 2. típusú axonvégződésnek (Covic és Sherman, 2011; Petrof és Sherman, 2013). A második csoportot nagyobb boutonok alkották, amelyek szintén tartalmaznak mitokondriumokat, de a kis típussal ellentétben gyakran létesítenek szinapszist lebenyes PSD-n keresztül. Az ilyen típusú boutonok ultrastrukturális jellemzői megfeleltethetők Sherman és

munkatársai (Petrof és Sherman, 2013) által leírt 1. típusnak. Az 1. típusú bouton jellemzése elsősorban a talamokortikális projekciók és a nagy, 5. rétegi kortikotalamikus axonvégződések alapján került meghatározásra. A nem-humán főemlősök agykérgében a talamokortikális végződések többszörös szinapszist alkotnak, és számos mitokondriumot tartalmaznak, hasonlóan a felszálló kérgi afferensek és az amygdalo-hippokampális pályák szinapszisaihoz (Anderson és mtsi., 1998; Anderson és Martin, 2006; Wang és Barbas, 2018; Zikopoulos és Barbas, 2007). A szomatoszenzoros kéregben a szinaptikus boutonok csupán kis hányadára jellemző a többszörös PSD. Ugyanakkor, a talamokortikális és a felszálló kérgi axonvégződések szinapszisai sok esetben komplex, lebenyes PSD-vel jellemezhetők, (rézusz majom: Anderson és mtsi., 1998; Zikopoulos és Barbas, 2007; egér: Rodriguez-Moreno és mtsi., 2018), hasonlóan az általunk leírt szomatoszenzoros kérgi nagy boutonokhoz. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy a szomatoszenzoros kéregben a nagy axonvégződések sok közös vonást mutatnak az 1. típusú kérgi és talamokortikális szinapszisokkal. E hasonlóságok és a korábbi eredmények alapján arra következtethetünk, hogy a szomatoszenzoros kéregben a nagy boutonok szinapszisai nagy hatékonysággal rendelkeznek és erős posztszinaptikus válaszokat váltanak ki (Amiati, 2001; Chung és mtsi., 2002; Ganeshina és mtsi., 2004; Groh és mtsi., 2008; Petrof és Sherman, 2013; Pelzer és mtsi., 2017).

A főkomponens-elemzés eredménye szerint a mitokondriumok mérete szintén megkülönböztető tényező volt az agykérgi axonvégződések osztályozásában. A PCA eredményével összhangban az egyváltozós összehasonlítások is a mitokondriumok felület és térfogat értékeinek axonvégződések közötti jelentős eltéréseit eredményezte, továbbá, korábbi eredményekkel összhangban felfedte, hogy a mitokondriumok mérete a boutonok méretével arányosan skálázódik (Eyre és mtsi., 2007; Germuska és mtsi., 2006; Pierce és Lewin, 1994; Rodriguez-Moreno és mtsi., 2018). Mivel a mitokondriumok egyszerre szolgálnak energiaforrásként és Ca<sup>2+</sup>-raktárként, potenciálisan meghatározzák a szinaptikus jelátvitel dinamikáját (Vos és mtsi., 2010). Bár nem ismert, hogy a nagy végződésekben a mitokondriumok megnövekedett mérete nagy energia- vagy Ca2+szükségletének köszönhető-e, ezek az eredmények újabb bizonyítékot szolgáltatnak arra, hogy az aktivitás hatással lehet a boutonok méretére (Pierce és Lewin, 1994). A kis boutonokban trendszerűen, nem szignifikáns különbségként, megjelenő egységnyi boutonméretre vonatkoztatott nagyobb relatív mitokondriumméret alapján felmerül, hogy a mitokondriumok funkcióira valamivel nagyobb szükség van, mint a nagy boutonokban. Hasonló tendencia mutatkozik a PSD méretében is az egységnyi mitokondriumméretre vonatkoztatva. Azonban a kis végződésekben a nagy boutonokhoz képest kisebbek a mitokondriumok, ami arra utalhat, hogy a mitokondriumok nem kifejezetten a szinaptikus funkciókban, például a Ca<sup>2+</sup>-függő jelátvitelben, vesznek részt. Ebben az összefüggésben a kis boutonokban az egységnyi felületre eső, jelentősen nagyobb PSD nagyobb szinaptikus aktivitásra, ezáltal a nagy boutonokkal összehasonlítva nagyobb energiaigényre utal, különösen, ha működésük facilitáló jellegét is figyelembe vesszük (Petrof és Sherman, 2013).

Vizsgálataink további említést érdemlő eredménye, hogy a PSD mérete és valószínűleg alakja is invariáns tulajdonságok. A PSD invariáns mérete korábban is ismert volt (Germuska és mtsi., 2006; Karbowski, 2014; Rodriguez-Moreno és mtsi., 2018) (ugyanakkor lásd Eyre és mtsi., 2007; Hsu és mtsi., 2017). Következésképpen a PSD relatív mérete (PSD terület/bouton felület aránya) nagyobb a kis boutonok esetében, mint a nagy boutonoknál, ami alátámasztja a feltételezést, hogy kis boutonokban a nagyobb relatív mitokondriális méret a nagyobb energiaigény következménye.

#### 3. A szomatoszenzoros kérgi összeköttetések szinaptikus szerveződésének funkcionális jelentősége

Az, hogy a szomatoszenzoros kéreg kapcsolatait kis és nagy axonvégződések alkotják, összhangban van főemlősök más agykérgi területein végzett korábbi megfigyelésekkel (Anderson és Martin, 2009; Covic és Sherman, 2011; Innocenti és Caminiti, 2017). Azonban rézusz majomban a V1 és V2 reciprok összeköttetésével ellentétben, ahol csak a V2  $\rightarrow$  V1 projekció áll kis és nagy boutonokból is (Anderson és Martin, 2009), a mi eredményeink azt mutatják, hogy a reciprok inter-áreális kapcsolatokat mindkét irányban heterogén méretű boutonok képezik. Emellett tanulmányunkban elsőként mutattunk ki parallel, kis és nagy boutonokat képező pályákat távoli, intrinzik összeköttetésekben egy áreán belül. Továbbá, FM megfigyeléseink szerint a nagy inter-áreális végződések kisebb populációt alkotnak, mint az intra-áreális nagy boutonok. Mókusmajomban a szomatoszenzoros kéregben az intrinzik és inter-áreális pályákra vonatkozó megfigyeléseink a nagy boutonokat létesítő pályák

Az agykérgi hierarchiában área 1 magasabb szinten áll área 3b-nél (Iwamura, 1998; Kaas, 2004; Sur és mtsi., 1980). A nagy boutonok általunk kimutatott intra-áreális és reciprok inter-áreális eloszlása összhangban áll azon bizonyítékok növekvő számával, amik azt mutatják, hogy a szinaptikus szerveződés nem tükrözi egy az egyben az agykérgi

pályák hierarchikus szerveződését (Anderson és Martin, 2009; Covic és Sherman, 2011). A szomatoszenzoros kéreg funkcionálisan lassan és gyorsan adaptálódó, valamint Pacinimodulokra osztható (Friedman és mtsi., 2004). A rövid távú szinaptikus depresszió, amely a meghajtó jellegű funkciókat jellemzi, a szomatoszenzoros kéregben a gyorsan adaptálódó és/vagy Pacini-pályával lenne a leginkább kompatibilis, amelyek a perifériás ingerekre tranziens válaszokat adnak (Amitai, 2001; Chung és mtsi., 2002; Covic és Sherman, 2011; Groh és mtsi., 2008; Pelzer és mtsi., 2017; Petrof és mtsi., 2015). Az agykérgi boutonok merev funkcionális szegregációja a lassan adaptálódó pályát alkotó kis, modulátor hatású szinapszisokra és a gyorsan adaptálódó, ill. a Pacini-pályát képező nagy, meghajtó jellegű, detonátor szinapszisokra azonban valószínűtlen. A látókéregben a rövid távú depresszióval jellemezhető, detonátor típusú talamokortikális afferensek (Chung és mtsi., 2002; Petrof és Sherman, 2013) egyaránt részt vesznek a magnó-, és a parvocelluláris pályák kialakításában. Emellett a pályajelölő anyagokat a szomatoszenzoros kéreg lassan adaptálódó moduljaiba injektáltuk. Hihetőbb elképzelés, hogy a nagy, detonátor jellegű boutonok a szomatoszenzoros agykérgi reprezentációkban a RF centrumát képező "hotspot"-ot, célozzák meg, míg a nagyobb számú kis, moduláló hatású axonvégződések a receptív mező periférikus részébe továbbítanak információt (Favorov és mtsi., 1987; Reed és mtsi., 2010). Ennek azonban ellentmond, hogy ugyanabból a beinjektált kérgi területből eredő kis és nagy boutonok az ultravékony metszeteken egymás közelében lokalizálódtak és megkérdőjelezi a nagy és kis boutonoknak a receptív mezők központ-környék szerveződése szerinti funkcionális specializációját. További vizsgálatok szükségesek ahhoz, hogy meghatározzuk a boutonok e két osztályának szerepét a szomatoszenzoros információ feldolgozásában.

Tágabb perspektívában értelmezve az eredményeink, miszerint 1. típusú szinapszisokat mind a távoli intra-áreális projekciók, mind az agykérgi területeket összekötő afferensek képeznek, függetlenül attól, hogy melyik áreából származnak, jobban összeegyeztethetők a log-dinamikus agyi elmélettel (Buzsáki és Mizuseki, 2014). Ezzel összhangban a nagy, 1. típusú boutonok a BDA-jelölt boutonok kisebb hányadát alkották, míg a kis, 2. típusú axonvégződések jóval nagyobb számban jelölődtek. Figyelembe véve a gyors szomatoszenzoros agykérgi pályák létezését, amelyeket a vastag axonok alkotnak, és amelyekről ismert, hogy nagy boutonokat képeznek (Innocenti és Caminiti, 2017), eredményeink arra utalnak, hogy a nagy boutonok a serkentő neuronok "gyors tüzelésű kisebbségének" szinapszisait képviselik (Buzsáki és Mizuseki, 2014). Így az elmélet szerint a nagy boutonok felelősek a taktilis információ gyors és hűséges

továbbításáért a szomatoszenzoros kéreg teljes hálózatában, ami a bemenet "legjobb leképezését" ("best match") biztosítja (Petrof és Sherman, 2013; Buzsáki és Mizuseki, 2014). Ezután, ahogy azt a log-dinamikus elmélet jósolja, a funkcionális reprezentáció a kis boutonokat képező lassan tüzelő serkentő neuronok hatására nyeri a végső, részlet gazdag formáját. A kis boutonok szerepe feltehetően a nagy boutonok által működésbe hozott hálózati aktivitás érzékenységének (gain) modulálása, nem pedig a szelektivitásának a meghatározása (Petrof és Sherman, 2013; Miller, 2016). Ez a folyamat vezethet a neuronok eltérő funkcionális tulajdonságainak kialakulásához área 3b és 1-ben.

D. A szinaptikus jelátvitel réteg-specifikus, populáció szintű szabályozása a nem-szövetspecifkus alkalikus foszfatázon (TNAP) keresztül

#### I. Módszertani megfontolások

#### 1. A TNAP enzimhisztokémiai lokalizációja

A TNAP-aktivitás kimutatására enzimhisztokémiai módszert alkalmaztunk, mert a kereskedelmi forgalomban kapható antitesteket eredetileg a csont vagy máj eredetű TNAP ellen termeltették és specifitásuk az agyszövetben nem került bizonyításra. Az enzimhisztokémiai módszerrel szemben felhozható, hogy a TNAP lokalizációját tekintve kisebb a pontossága, mint pl. az immunhisztokémiai módszereknek. Az enzimhisztokémiai lokalizáció pontosságát főként a rendelkezésre álló szubsztrátumok enzim-specificitása határozza meg. A TNAP-aktivitás kimutatására általunk használt NBT-BCIP-reakció szelektivitását jól bizonyítja, hogy tbk. immunhisztokémiában ellenanyagok jelölő molekulájaként használt alkalikus foszfatáz kimutatása is ezzel a reakcióval történik. Hasonlóan, a TNAP szubcelluláris lokalizációjára alkalmazott erős elektrondenzitású ólom-citrát reakció megbízhatósága elmarad pl. az egyetlen molekula lokalizációját lehetővé tevő immunarany jelölésétől. Azonban az ólom-citrát reakció elegendő pontosságú az idegsejt TNAP-aktív kompartmentjeinek azonosítására. A TNAP pontosabb immuncitokémiai lokalizációját, különösen főemlősökben az agyszövetben bizonyítottan specifikus ellenanyaggal lehet majd alaposabban tanulmányozni.

#### 2. A másodlagos jelátvivő molekuláris hálózat elemzése

A hálózatelemzéssel kapcsolatban fontos hangsúlyozni, hogy a hálózati mérőszámokat a sejt teljes molekuláris hálózatának egy részgráfjából számoltuk, és további kölcsönhatások valamint molekulák bevonása az általunk azonosítottól eltérő
molekula-csoportok és funkciók megjelenését eredményezheti. Nagy valószínűséggel kijelenthető az is, hogy a nulla be- vagy kimenő fokú csúcsok és a három klaszterezési módszerrel talált kis, töredékes klaszterek a vizsgált adatok hiányosságának jelei. Másrészről, valós jelenségek megértésében a funkcionálisan releváns alhálózatokon végzett vizsgálatok hatékonyabbak lehetnek, mint a sokféle feladatért felelős nagy, komplex hálózatokon végzett kutatások (Ma'ayan és mtsi., 2005; Christensen és mtsi., 2007; Ma'ayan, 2008). Valójában a TNAP számos olyan kölcsönhatását ki kellett hagynunk, amelyek más, a jelátvitelen kívüli sejtfunkciókban vesznek részt. A legkomolyabb problémát a TNAP eddig nem ismert interakcióinak hiánya okozta, leginkább a TNAP-ra hatóké (bejövő élek), amelyek kis számban fordultak elő a munkánk tárgyául szolgáló hálózatban. A hálózati elemek pozícióját jellemző mértékekre vonatkozó megfigyeléseink, mint például a köztiség centralitások, több adat bevonásával változhatnak. Azonban, az általunk használt mérőszámok hosszú lecsengésű eloszlását figyelembe véve, a magas értékek részleges csökkenése, amelyek a hálózat fontosságára utalnak, valószínűleg csak a kulcselemek rangsorának megváltozását okozná. Ezzel szemben az alacsony értékek jelentős emelkedése alapvetően új információt jelentene. A szoftver alapú adatlekérdezés további következetlenségeket eredményezhet, amit a MAPK, ill. hasonlóan az M1R is szemléltet, ami úgy tűnik csak közvetetten a tau-n keresztül kap bemenetet a TNAP-tól (Díaz-Hernández és mtsi., 2010). A TNAP neuronális jelátvitelben betöltött szerepéről teljesebb képet részben új adatokkal frissített, másészt kibővített, más sejtfunkciókat is reprezentáló hálózatokon végzett tanulmányok adhatnak.

Azt is fontos megjegyezni, hogy a vizsgált hálózat erősen specifikus lehet a CA1 hippokampális piramissejtre, ezért jelenlegi ismereteink szerint hipotetikusnak tekinthető. Nem tudható ugyanis, hogy a TNAP jelentős szerepet játszik-e e neurontípus funkcióiban. Továbbá, a hippokampusz piramissejtek jelátviteli hálózatának elemzése nem nyújt információt a GABAerg neuronok működéséről, mivel fontos molekulák, köztük a GAD, amely a TNAP-pal a PLP-n keresztül lép kölcsönhatásba (Erlander és Tobin, 1991; Battaglioli és mtsi., 2003), hiányoznak az vizsgált hálózatból. Meg kell azonban jegyeznünk, hogy a serkentő piramissejtek, melyek a távoli, így az asszociációs kapcsolatokat létesítik, az idegsejtek durván 80%-át teszik ki, szemben a lokális összeköttetéseket létesítő, gátló GABAerg neuronokkal, melyek az idegsejtek fennmaradó kb. 20%-át alkotják az agykéregben. Továbbá, számos megfigyelés utal a TNAP szerepére a serkentő jelátvitelben, így a serkentő-jellegű szinapszisok jelen dolgozatban ismertetett erős TNAP aktivitása és az, hogy a piramissejtek fő neurotranszmitterének a glutamátnak a szintézisét szintén szabályozza a PLP, ezen keresztül pedig a TNAP (Percudani és Peracchi, 2003; Coburn, 2015; Taketani, 2015).

#### II. A TNAP szerepe az agykéreg aktivitásának szabályozásában

Korábbi munkákkal összhangban kimutattuk az alkalikus foszfatáz erősen szelektív regionális és rétegeloszlását nem-humán főemlősök agykérgében (Robins és mtsi., 1956; Friede, 1966). Az agykéreg legkülső pozitív rétegétől eltekintve, ami az egész agyfelszínre kiterjed, a TNAP majmokban erős aktivitást a primer érzőkérgi áreák középső, elsődleges talamokortikális bementet fogadó 4. rétege ad. Ezen kívül csak a prefrontális kéregben látható erősebb rétegaktivitás a felszín alatt. Emberi agykéregben elsőként írtuk le a TNAP-aktivitás eloszlását, amit majomhoz hasonlóan erős lamináris szelektivitást jellemez. Azonban, a majmoktól eltérően emberben a TNAP minden általunk vizsgált áreában kimutatható, igaz, réteg-lokalizációja regionálisan változik. Az elsődleges szenzoros kérgi áreákban a majmokéval megegyező 4. rétegi lokalizáció mellett, az asszociációs kérgi mezőkben a TNAP az 5. réteg felső részében aktív. Az agyfelszíni, legkülső rétegi TNAP aktivitás emberre is jellemző.

Főemlősökben szintén elsőként mutattuk ki azt is, hogy a neuropil jelölődés elsősorban a TNAP szinaptikus résben és mielin mentes, csupasz axon membránon, beleértve a Ranvier-befűződést, lokalizálható aktivitásából adódik. A TNAP szinaptikus lokalizációját más fajokon korábban leírták, igaz eredményeinkkel összehasonlítva kevésbé egyértelműen vagy nem kötötték a szinaptikus réshez (Sugimura és Mizutani, 1979; Zisapel és Haklai, 1980; Mori és Nagano, 1985a). Patkányon végzett kísérletek alapján ugyancsak ismert volt a Ranvier-befűződés erős TNAP aktivitása (Mori és Nagano, 1985b). A TNAP szubcelluláris lokalizációja felveti az ingerületátvitelben játszott meghatározó szerepét azokban a struktúrákban, kérgi rétegekben, ahol kifejeződik. Ráadásul eredményeink szerint a TNAP mind a Gray I-es típusú serkentő, és II-es típusú gátló jellegű szinapszisokban kifejti hatását.

A TNAP aktivitása függ a pH-tól, így valószínűsíthető, hogy a szinaptikus jelátvitelben játszott szerepét a transzmitter felszabadulással járó pH változás (is) szabályozza (Sinning és Hübner, 2013). E szerint szinaptikus aktivitás során a szinaptikus hólyagok erősen savas tartalmának ürülése gátolja a TNAP-ot, így az hatását feltehetően a szinaptikus aktivációt követően fejti ki, amikor a pH alkalikussá válik pl. a Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>- ATPáz és/vagy az extracelluláris szénsav-anhidráz aktivitásnak köszönhetően.

Hippokampuszban nagy frekvenciás ingerlés a pH átmeneti növekedését váltja ki (Makani és Chesler, 2007). Elképzelhető, hogy érzőkérgi áreákban a korábban tárgyalt nagyméretű, gyors dinamikájú és lokális hálózatokat beindító talamokortikális axonvégződések aktivitása a hippokampuszhoz hasonlóan a pH érték emelkedésén keresztül fokozza a TNAP aktivitást. Ez magyarázhatná a TNAP szelektív lokalizációját az elsődleges szenzoros kérgi áreák talamorecipiens középső rétegeiben. Érdekes, hogy humán temporális kéregben az 5. rétegben az axonterminálisok viszonylag nagyméretűek, az átlagot tekintve nagyobbak, mint a 4. rétegben végződők (Yakoubi és mtsi., 2019a,b; ld. Eredmények 59. ábra). Felvetődik a kérdés, hogy az emberi agykéregben az érzőkérgi áreákhoz hasonlóan ez magyarázza a TNAP asszociációs területekre jellemző 5. rétegi lokalizációt is. E feltevést látszik alátámasztani az a frissen megjelent tanulmány, amelyben kimutatták, hogy emberi agykéregben különböző rétegeket összehasonlítva az 5. rétegi piramissejtek a legkönnyebben ingerelhetők (Moradi Chameh és mtsi., 2021). Ugyancsak összhangban van feltevésünkkel, hogy rágcsálókban az adenozin jelentős hiperpolarizáló hatással van 4. rétegi és felső 5. rétegi idegsejtek aktivitására a barrel kéregben és a PFC-ben (Radnikow és Feldmeyer, 2018).

A TNAP működésének függése az idegi aktivitástól alátámasztja az előző bekezdésben tett megállapításokat. Egyrészt azáltal, hogy az egyik szemet érintő funkcionális vizuális deafferentáció szelektíven a talamorecipiens rétegben, és az érintett szem okuláris dominancia oszlopaiban gátolta az enzimaktivitást. Különösen pedig azzal, hogy a TNAP sokkal érzékenyebben reagál az idegi aktivitás gátlására, mint pl. a citokróm oxidáz (ld. Eredmények D.II.1 fejezetben a 2 hetes monokuláris deprivációs kísérlet eredménye). Mindez a szinaptikus és a TNAP-aktivitás igen szoros kapcsolatát bizonyítja.

A TNAP az idegi aktivitás továbbításán és a szinaptikus jelátvitelen túl szerepet játszik az ezekért felelős idegsejt struktúrák kialakulásában a fejlődés során. Erre a TNAP gén inaktiválásával szolgáltattunk bizonyítékot egerekben, a mielinizáció és a szinaptogenezis abnormális lefolyásának kimutatásával. A TNAP axonális fejlődésben és idegsejt képződésben valamint differenciációban játszott szerepe más csoportok munkájából ismert (Zimmermann és Langer, 2015; Diaz-Hernandez és mtsi., 2015). Vizsgálatainkkal kimutattuk, hogy TNAP aktivitás hiányban nem alakulnak ki érett szinapszisok és mielin hüvely valamint, hogy ezzel egyidejűleg a neuroparenchymában intenzív degradációra utaló morfológiai elváltozások azonosíthatók (az értekezésből ez utóbbival kapcsolatos, de leközölt megfigyeléseinket kihagytam, bővebben ld. az

dc\_1938\_21

értekezés alapjául szolgáló Hanics és mtsi., 2012 Cell Tissue Res. 349(2):459-471. közleményben). Itt érdemes kitérni rá, hogy egyre több adat bizonyítja a TNAP neurodegeneratív megbetegedésekben, különösen Alzheimer kórban játszott szerepét (Diaz-Hernandez és mtsi., 2015; Kellett és Hooper, 2015). Alzheimer kórban a kognitív képességek hanyatlásával párhuzamosan megnő a TNAP aktivitás az agyszövetben és a szérumban (Kellett és Hooper, 2015). A TNAP feltehetően az extracelluláris hiperfoszforilált *tau* fehérje defoszforilációjával, az M1 és M3 muszkarinos kolinerg receptorokon keresztül, az intracelluáris Ca<sup>2+</sup> szint perzisztens növekedésével váltja ki a sejthalált (Diaz-Hernandez és mtsi., 2015; Kellett és Hooper, 2015).

#### III. A TNAP szerepe az idegsejtek aktivitásának szabályozásában

Tanulmányunk az első lépés volt a TNAP neuronális jelátvitelben betöltött, közvetlen interakciókon túlmutató, átfogó szerepének megismerése irányában a jelátvitelt szolgáló molekuláris gépezetről rendelkezésünkre álló ismeretek alapján. Az adatok hiányosságából fakadóan a TNAP szabályozó szerepének megértésében különösen a globális hálózati mértékek voltak segítségünkre, melyek, ellentétben a közvetlen interakciókat jellemző lokális mérőszámokkal, egy molekula jelentőségét molekuláris kaszkádok, ill. csoportok interakcióin keresztül azonosítja. A magas centralitás értékek, különösen a csúcs- és élköztiség arra utalnak, hogy a TNAP más, a felső kvartilisbe eső centralitás értékekkel rendelkező molekulákkal az idegsejt működés szabályozásának egyik kulcsmolekulája. Bár a TNAP bejövő és kimenő éleinek CD előjelét tekintve vegyes tulajdonságokat mutat, a dominánsan konvergens kimenetek és divergens bemenetek kombinációja más valós hálózatokban megismerthez hasonlóan a hálózati aktivitás koordinációjában játszott "elosztó" funkcióját jellemzi, ellentétben a forrásjellegű funkciókkal. Hasonlóképpen, a TNAP fontos csomópont nem csak a saját klaszterében, hanem a vizsgált hálózat több más funkcionális csoportjának molekuláival létesített kapcsolatain keresztül. Ezek a megfigyelések összhangban vannak azokkal az egyre növekvő számú kísérleti eredményekkel, amelyek a TNAP kölcsönhatását mutatják különböző neuronális funkciókat szabályozó molekulákkal, mint például prion fehérjék, tau és ioncsatornák (Ermonval és mtsi., 2015; Nowak és mtsi., 2015). A TNAP kölcsönhatása a MAPK-val kiemelkedő jelentőségű. A MAPK rendelkezik a negyedik legmagasabb NB-vel, és a TNAP-pal való kapcsolatának EB értéke a második legnagyobb a hálózatban. Tudomásunk szerint azonban a TNAP és a MAPK között nincs közvetlen kapcsolat, mivel a MAPK a BMP-n és a SMAD-on keresztül szabályozza a TNAP-ot (Osyczka és Leboy, 2005). Mindezeket figyelembe véve a megközelítésünk lényegét képező, a MAPK-t és a TNAP-ot is magában foglaló jelátviteli pályák tanulmányozásának fontosságát eredményeink alátámasztják és rámutatnak a kérdés kiemelkedő fontosságú biológiai vonatkozásaira.

Az általunk vizsgált hálózat alapját három nagyobb funkcionális klaszter képezte: az "intracelluláris proteinkináz kaszkád", a "szinaptikus jelátviteli csoport" valamint a "másodlagos jelátvitelben" részt vevő molekulák csoportja. Mondhatni ez a 3 csoport alkotta az idegsejtek másodlagos jelátvivő rendszerének a magját. A többi, kisebb csoport olyan molekulákat tartalmaz, amelyek más sejtfunkciókat, például a proliferációt, az apoptózist és más alapvető (housekeeping) sejtfunkciókat látnak el.

A TNAP-ot mindhárom klaszterezési technika a "másodlagos jelátviteli kaszkád" csoportba sorolta, ami a harmadik legnagyobb klaszter volt az "intracelluláris protein kináz kaszkád" és a "szinaptikus transzmisszió csoport" után. Ez az eredmény egyértelműen jelzi, hogy a TNAP az idegi jelátviteli kaszkád szerves része. A TNAP összeköttetései, melyek nem korlátozódnak a saját klaszterére, hanem összekapcsolták más, főként a "szinaptikus jelátvitel", és az "intracelluláris kináz klaszterekkel", további bizonyítékot szolgáltatnak a TNAP idegsejtek másodlagos jelátviteli folyamataiban játszott szerepére. A klaszterén belül a TNAP a főbb neuromoduláló rendszerekhez, mint a purinerg, a monoaminerg és a kolinerg tartozó molekulákkal kapcsolódik. A TNAP szerepe a purinerg és monoaminerg transzmisszióban jól ismert (Coburn, 2015). A TNAP az adenozin-foszfátok minden formáját hidrolizálja, ligandumokat biztosítva a purinerg receptoroknak. Számos tanulmány leírta, hogy a TNAP modulálja a purinerg transzmissziót (Diaz-Hernandez és mtsi., 2015; Millán, 2015; Street és Sowa, 2015; Zimmermann és Langer, 2015). A TNAP monoaminerg transzmisszióra gyakorolt hatása feltehetően a PLP-n keresztül érvényesül, mivel az aromás L-aminosav dekarboxiláz (AADC), amely a monoamin szintézis egyik kulcsenzime, a B6-enzimek családjába tartozik (Percudani és Peracchi, 2003; Ermonval és mtsi., 2009; Taketani, 2015). A TNAP kapcsolatos kolinerg transzmisszióban játszott szerepe az Alzheimer-kórral összefüggések miatt különösen figyelemre méltó (Diaz-Hernandez és mtsi., 2015). Érdekes módon a TNAP  $\rightarrow$  M1R lehetséges kölcsönhatás sokkal alacsonyabb EB-vel rendelkezik, mint a hálózat felső kvartilisébe eső  $tau \rightarrow M1R$  interakció. Felmerül, hogy az M1R-hez a tau-n keresztül vezető interakciós kaszkádok jelentősebb szerepet játszhatnak az Alzheimer-kórban, mint a közvetlenül a TNAP-on keresztül vezető útvonalak. Ezzel összhangban a M1R bemeneteinek tau felőli konvergens, ill. TNAP-ból kapott divergens jellege nagyon különböző funkciójú kapcsolatokra utal: egyik esetben a hálózat egy relatíve kis része által befolyásolt TNAP enzim M1R-re gyakorolt hatása kiterjed a hálózat ezen a kapcsolaton áthaladó legrövidebb utak által elért nagyobb részére. Ezzel ellenkezőleg, a hálózat egy viszonylag nagy része által befolyásolt *tau* hatása az M1R-re a molekulák egy viszonylag szűkebb csoportjának interakcióit szabályozza. Agykérgi hálózati analógiával élve a TNAP alárendelt szerepű az M1R-hez képest (csakúgy, mint a *tau*-hoz képest 79D ábra), míg a *tau*-val létesített kapcsolat esetében az M1R játssza az alárendelt szerepet.

Összefoglalva, a köztiség érték és a konvergenciafok alapján arra lehet következtetni, hogy a TNAP  $\rightarrow$  M1R közvetlen interakció, amennyiben létezik, nem meghatározó az Alzheimer-kórt okozó neurodegenerációban. Érdekes módon a CDadatok azt sugallják, hogy az összes olyan interakcióján kívül, ahol a hálózatban a TNAP az információ áramlást célzott utakra terelő elosztóként működik (a divergens bemenetek és konvergens kimenetek alapján), a TNAP a kölcsönhatás láncolatok forrásaként szolgál a MAPK-ból kapott konvergens bemeneten és az AMPAR, M1R és tau-n keresztüli divergens kimeneteken keresztül. Ezek az adatok, kiegészítve azokkal a kísérletes eredményekkel, hogy a tau és M1R mellett az AMPAR (Chang és mtsi., 2006, 2012) és a MAPK (Leugers és mtsi., 2013) szintén szerepet játszik az Alzheimer-kórban, felvetik a TNAP, mint lehetséges célpont szerepét a neurodegeneratív betegségek elleni új gyógyszerek fejlesztésében. A  $tau \rightarrow M1R$  interakciót illetően szintén figyelemre méltó, hogy rajta keresztül a legrövidebb utak bemeneti és célmolekulái között viszonylag nagy az átfedés. A jövőre feladata annak eldöntése, hogy van-e ennek jelentősége a betegség folyamatában, pl. egy visszacsatolásos szabályozási folyamat sérülésén keresztül. A neurodegeneratív betegségekkel kapcsolatban szintén fontos, hogy a TNAP a purinerg transzmisszió útján elősegíti a neuronok proliferációját és differenciálódását is (Diaz-Hernandez és mtsi., 2015; Zimmermann és Langer, 2015).

A TNAP klaszterek közötti interakciói az AMPA- és GABAA-receptorokkal (R) különösen fontosak, hiszen ezek a receptorok alkotják az agy fő serkentő és gátló receptorait (Show és Lanius, 1992). Ismert, hogy a TNAP képes szabályozni a glutamát és a GABA neurotranszmitterek mennyiségét a szintetizáló enzimeken keresztül, amelyek a TNAP által szabályozott PLP-anyagcserétől függenek (Percudani és Peracchi, 2003; Coburn, 2015; Taketani, 2015). Show és Lanius (1992) azonban arról számolt be, hogy a TNAP-kezelés gátolta az izotóppal jelölt antagonisták AMPAR és GABAAR fehérjékhez való kötődését, valószínűsíthetően a receptorok számának, nem pedig affinitásának csökkenése miatt. Felmerül azonban a közvetlen defoszforilációval történő szabályozás lehetősége is (ld. következő bekezdés). További vizsgálatok szükségesek a TNAP pontos szerepének tisztázásához a GABAerg és glutamáterg transzmisszióban. A TNAP szinaptikus jelátvitelben közvetlenül résztvevő molekuláris interakcióin kívül az EGFR-en keresztül (és közvetve a MAPK-n keresztül) szintén hatással van az intracelluláris protein kináz kaszkádokra. Igaz, hogy az EGFR egy sejtfelszíni receptor, így elméletileg hozzáférhető lehet az ektoenzim TNAP számára, azonban nem világos, hogy a TNAP és az EGFR kölcsönhatásba lép-e *in vivo*, különösen az agyban (Kim és mtsi., 1999; Zhu és mtsi., 2011). A TNAP összes említett hatását a moduláló rendszerekre ektoenzimként fejti ki.

Fontos megemlíteni, hogy a TNAP az itt tárgyaltaktól eltérő módon is képes szabályozni a neurotranszmissziót. Számos ioncsatorna és transzmitter receptor rendelkezik а TNAP számára célpontként szóba jöhető extracelluláris foszforilációs/defoszforilációs helyekkel (23. táblázat; a téma áttekintését lásd Redegeld és mtsi., 1999). A TNAP kölcsönhatása az M1R-el nagyobb EB értékű, mint a tau-val, ami a várakozásoknak megfelelően hálózati szinten azt jelenti, hogy a TNAP közvetlen interakciója a receptorral jelentősebb hatást fejt ki a neurotranszmisszióra. Emellett a tauval ellentétben a TNAP és az M1R ugyanahhoz a klaszterhez tartozik, ami intenzívebb kölcsönhatásokra utal a jelátvitel során.

A 23. táblázatban szereplő molekulák (valószínűleg nem teljes) listája által képviselt funkcionális sokfélesége és a jelen elemzések eredményei alapján arra lehet következtetni, hogy a TNAP sokféle sejtműködést szabályoz, beleértve a neurotranszmissziót is. Ugyanakkor a TNAP központi idegrendszerben kimutatott rendkívül specifikus szövettani és szubcelluláris lokalizációja azt sugallja, hogy az enzim az idegi funkciókat nagyon célzottan szabályozza. Fontos kérdés, hogy az agyi és a celluláris lokalizáció játszik-e bármilyen szerepet a TNAP-al kapcsolatba hozható különböző neurális betegségekben, mint például az epilepszia és az Alzheimer-kór. Érdekes, hogy az epilepszia és az Alzheimer-kór a TNAP ellentétes funkcionális állapotaihoz kapcsolódik: a túl alacsony enzimaktivitás vagy annak hiánya epilepsziát eredményezhet, míg Alzheimer-kórban viszonylag magas a TNAP-aktivitás. Ez az érme két oldala, amelyet figyelembe kell venni a TNAP-ra ható gyógyszerek alkalmazásakor. A TNAP alkalmas jelölt az agyi funkciók és betegségek komplexitásának tanulmányozására.

# KÖVETKEZTETÉSEK

### A. Nagyléptékű struktúra: integráció, koordináció, plaszticitás

Az irányítottságban a kérgi hálózat egyedi, megkülönböztető tulajdonságai jelennek meg. A CD segítségével olyan topológián alapuló mérőszámot tudtunk meghatározni, ami az agykérgi hálózat anatómiai és fiziológiai tulajdonságaival szorosan korrelál. Ehhez elegendő volt csupán az összeköttetések meglétének, ill. hiányának ismerete (súlyozott hálózatokra ld. Varga és mtsi. 2021). Ez a szoros struktúra-funkció megfelelés bizonyíték az agykéreg, mint rendszer integratív funkciója mellett és alátámasztja a "hierarchikus ellenáram" elméletét. Ennek közvetett bizonyítékát láthatjuk tbk. kóros működésben, ami a FF és FB pályarendszerek elégetlen együttműködéséből adódhat (Bassett és mtsi., 2008; Bányai és mtsi., 2011; Silverstein és mtsi., 2016; Perry és mtsi., 2019).

Az agykérgi hierarchia a hálózattopológiában is jól azonosítható. A CD segítségével kimutattuk, hogy fokozatos a funkcionális specializáció az elsődleges szenzomotoros és a magas szintű asszociációs kérgi területek között. A finomhangolt munkamegosztás főleg a forrás jellegű (divergens kimenetek és konvergens bemenetek) tulajdonságok esetében jellemző. Az információ elosztó tulajdonság (konvergens kimenetek és divergens bemenetek) mentén az áreák között nagyobb specializációbeli különbségek jellemzők. Ez felveti, hogy az evolúció során a hálózat bonyolultságával az aktivitás koordinációja az elosztó funkción keresztül került nagyobb szelekciós nyomás alá. A CD a biológiailag releváns tulajdonságok feltárásával a globális mértékek használatának fontosságát is kiemeli a kisméretű agykérgi hálózat megismerésében.

A kompartmentalizált kérgi hálózatban a híd áreák és a hierarchiában megmutatkozó fokozatos átmenet, amint azt pl. a topológia (CDn) kapcsán láttuk, az erős specializáció mellett a legalacsonyabb szintű, egymástól funkcionális értelemben távoli területek (mint az elsődleges érzőkérgi áreák) között is lehetőséget biztosít a funkcióátvételre. Primer érzőkéregben a helyettesítéses plaszticitásban fontosak a magasabb hierarchia szintek multimodális területei, de nem szükséges az agykérgi hálózat legmagasabb szintű, szupramodális struktúráinak közvetlen részvétele.

Az agykérgi jelfolyam szabályozásában az átfedés elhanyagolható mértéke miatt nem a poliszinaptikus pályák által létesített reverberáló körök, hanem az elosztott feldolgozás koordinációja játszik meghatározó szerepet. A hálózatban elosztó funkcióval bíró csúcsok (dorzolaterális PFC és elülső cinguláris területek) globális konvergencia régiók, emiatt

azonban szűk keresztmetszetet képeznek az információáramlásban. Ez а hálózattopológiai tulajdonság alátámasztja azt a feltevést, hogy az említett a régiókban soros információfeldolgozás zajlik és összefügghet a munkamemória jól ismert limitált információ tároló kapacitásával. A kognitív kontrollban, hasonlóan más agykérgi funkciókhoz, fontos a prefrontális régió struktúrái közötti elosztó és forrás tulajdonságok skáláján azonosítható munkamegosztás, ami megmutatkozik a prefrontális lebenyi hálózatok működésének hierarchikus szerveződésében. Végeredményben az agykérgi információáramlás szabályozásában a dorzolaterális és elülső cinguláris kérgi struktúrák a "globális munkatérben" szorosan együttműködnek más régiók asszociatív kérgi áreáival.

#### B. Köztes szintű hálózatszerkezet: topográfia, hierarchia, pRF

Populációs szinten az oldalirányú összeköttetések sűrűségeloszlásuk alapján két típusba sorolhatók: 1) a kis területre koncentrálódó, specifikus topográfiával jellemezhető valamint 2) a ritka, nagy kiterjedésű és diffúz kapcsolathálózat. Részletesen a specifikus összeköttetéseket tanulmányoztuk.

A specifikus kapcsolatok eloszlása az idegsejt populációk között a kommunikáció 2 fő irányát jelöli ki. 1) Az áreák között a homotóp területek (homológ reprezentációk) közötti információcsere a párhuzamos feldolgozást támogatja. Ebben a homotóp területeket összekötő gyors (vastag, mielinizált) és reciprok pályák fontos szerepet játszanak (pl. ujjspecifikus információ frissítése aktív tapintás során haptikus feladatokban). 2) Ezzel szemben áreán belül a különböző funkciójú, heterotóp területek (heterogén reprezentációk) közötti interakció az eltérő funkciók integrációját eredményezi (pl. globális taktilis jellegek reprezentációja). A két fő irány kimutatható a nyugalmi állapotú aktivitásmintázatban.

Az összeköttetések laterális eloszlása ugyanakkor hierarchikus mintázatot mutat: az információ átadás 2 fő iránya mellett lényeges különbség van a FF és FB kapcsolatok között. A FF topográfia erősen specifikus, a homológ reprezentációkra koncentrálódik, így lényeges a szerepe a klasszikus RF kialakításában (hot spot). Ezzel szemben a FB eltérő reprezentációjú területekre is kiterjed. Az egyaránt anizotrop eloszlású intrinzik és FB összeköttetések együtt felelősek az ecRF kialakításáért. Ugyancsak lényeges, hogy a magasabb hierarchia szintű área 1-ben kisebb a nagyítási faktor, mint área 3b-ben, így viszonylag nagy bőrfelületről származó taktilis információt integrál és vetít vissza az

dc\_1938\_21

alacsonyabb hierarchia szintű área 3b-be. Ez a köztes szintű hálózati motívum strukturális alapját képezheti egy több hierarchia szinten át folyó iteratív feldolgozásnak, ami absztrakt tulajdonságok kérgi reprezentációinak kialakulását eredményezi.

A funkcionális módszerekkel mérhető pRF ill. populációs válasz strukturális alapját az erős, lokális bemenetet adó vetítő neuronok populációjával átfedő efferens axonfolt csoport adja és ebben meghatározó a RF "hotspot"-ban koncentrálódó FF efferens axonfoltok szerepe. Az áreán belüli és a FB axonfolt csoportok aktivitása ugyanakkor nagyobb kiterjedésű oldalirányú aktivitást eredményeznek, aminek különösen éber állapotban lehet jelentősége. Az összeköttetések klaszterezettségének kérgi hierarchia szerinti változása összefügghet a RF méretével, ill. a funkcionális szegregáció, pl. a szenzoros almodalitások között, mértékével. Tovább gondolva, kapcsolat lehet az összeköttetések hierarchikusan változó klaszterezettsége, a kérgi nagyítási faktor által meghatározott populációs válasz mérete és a magasabb szintű funkcionális reprezentációk kialakulása között.

#### C. Az axonvégződések szerepe az élek dinamikájának szabályozásában

Az agykérgi hierarchiától függetlenül két szinaptikus pályát különböztettünk meg. 1) A megbízható jelátvitelt lehetővé tevő struktúrával rendelkező nagyméretű, detonátorjellegű szinaptikus boutonok biztosíthatják az áreán belüli és azok közötti pontos és gyors információátvitelt. A nagy boutonok kis száma és gyors adaptációs készségre utaló ultrastruktúrája, valamint az, hogy feltehetően vastag, gyorsan vezető axonok végződései, azt sugallják, hogy a gyors szinaptikus interakciók szerepe nem az információ részletes feldolgozása, hanem a lokális hálózati aktivitást "ébresztő" hatás. Ezt a funkciójukat alátámasztja ultrastruktúrájuk hasonlósága a talamokortikális végződésekéhez. 2) A funkcionális reprezentációk finom részleteinek feldolgozásában a nagy számbeli fölénnyel bíró kisméretű szinaptikus boutonok idegi aktivitást moduláló hatása játszhat szerepet.

### D. Az agykérgi jelfolyam rétegspecifikus szabályozása a TNAP-on keresztül

Főemlősökben a TNAP célzottan szabályozza az agykérgi összeköttetések egy meghatározott csoportját. Így emberben a TNAP áreától függően a 4. és 5a rétegekben a szinapszisok aktivitásán keresztül hat a posztszinaptikus idegsejtekből eredő pályák aktivitására az agykérgi hálózatban. Sejt szinten a TNAP neurotranszmitter receptorokkal és a neurotranszmitter szintézisért felelős molekulákkal létesített közvetlen interakciókon

túl a másodlagos jelátviteli hálózatban betöltött koordinatív, elosztó pozícióján keresztül is kifejti funkcióját az agykérgi jelfolyam szabályozásában. A TNAP fontosságára utal az epilepsziával és neurodegeneratív betegségekkel, elsősorban Alzheimer kórral összefüggésbe hozható, egyelőre nem kellően tisztázott szerepe az agykéregben.

### Köszönetnyilvánítás

Mindenek előtt szüleimnek és családomnak tartozom köszönettel. Szüleimnek, Dr. Négyessyné Pohl Etelkának és Dr. Négyessy Lászlónak odaadó támogatásukért. Feleségemnek, Gonda Katalinnak és gyermekeimnek mindazért a lemondásért, amit hivatásom teljesítéséért értem vállaltak.

Tudományos pályám a mai viszonyok között toleránsnak számító, családias légkörű és ugyanakkor inspiratív, kollegiális környezetet biztosító Hámori József professzor csoportjában indult. Az értekezés anyagának egy része ottani munkámhoz kötődik. Köszönöm akkori kollégáim segítségét! Sokat köszönhetek Dr. Takács József kezdeti, még diákéveimben, majd frissen végzett kutatóként nyújtott támogatásának és hogy elültette bennem a kvantitatív neuroanatómia fontosságának szemléletét. Ugyancsak jelentősen hozzájárult szakmai fejlődésemhez a professzor Marina Bentivoglioval végzett közös munka. Köszönettel tartozom a Semmelweis Egyetem Anatómiai Intézete korábbi és jelenlegi vezetésének, Csillag András, Gerber Gábor és Alpár Alán professzoroknak valamint ottani kollégaimnak a kutatásaimat támogató, befogadó légkörért.

Az, hogy ez az értekezés megszülethetett nagyban köszönhető professzor Érdi Péternek, aki csoportjában állást ajánlva biztosította, hogy kutatásaimat töretlenül folytathassam. Mindez nem lett volna lehetséges a Wigner Fizikai Kutatóközpont korábbi és jelenlegi vezetésének, Szőkefalvi-Nagy Zoltán és Lévai Péter professzoroknak a támogatása nélkül. Sokat tanultam jelenlegi munkatársaimtól az Elméleti Idegtudomány és Komplex Rendszerek Kutatócsoportban és konstruktív munkaviszonyt tudtam velük kialakítani. A csoport baráti légköre és készsége a problémák megvitatására motiváló alkotói környezetet jelent számomra.

A főemlősök idegrendszerének kísérletes kutatásában fontos iskola volt számomra a professzor Patricia Goldman-Rakic csoportjában eltöltött idő. Hasonlóan sokat tanultam e téren közös témáinkban együttműködő kollégáimtól, professzor Anna W. Roe-tól, Dr. Robert M Friedmantól, Dr. Caroline Fonta-tól és Dr. Pascal Barone-tól.

Szeretném megköszönni egykori diákomnak, ma kollégámnak Dr. Pálfi Emesének a segítségét az elütések, helytelen megfogalmazások javításában és az egységes nevezéktan használatában. Szintén köszönöm Kmety Andrea folyamatos tettre készségét és segítségét a publikációs listám frissítésében.

Végül, de nem utolsósorban mély hálával emlékezem meg egyetemi tanáraimról, akik széleskörű ugyanakkor alaposságra építő ismeretei és szemléletmódja a mai napig meghatározza gondolkodásomat.

## Irodalomjegyzék

- Alexander GE, Fuster JM. 1973. Effects of cooling prefrontal cortex on cell firing in the nucleus medialis dorsalis. Brain Res. 61:93-105. doi: 10.1016/0006-8993(73)90518-0. PMID: 4204131.
- Amitai Y. 2001. Thalamocortical synaptic connections: efficacy, modulation, inhibition and plasticity. Rev Neurosci. 12(2):159-73. doi: 10.1515/revneuro.2001.12.2.159. PMID: 11392456.
- Andersen, R., Meeker, D., Pesaran, B., Brezen, B., Buneo, C., Scherberger, H. 2004. Sensorimotor transformations in the posterior parietal cortex. In Gazzaniga, M.S. (szerk.), The Cognitive Neurosciences. MIT, Cambridge, MA, pp. 463–474.
- Andersen RA, Snyder LH, Bradley DC, Xing J. 1997. Multimodal representation of space in the posterior parietal cortex and its use in planning movements. Annu Rev Neurosci. 20:303-30. doi: 10.1146/annurev.neuro.20.1.303. PMID: 9056716.
- Anderson JC, Binzegger T, Martin KA, Rockland KS. 1998. The connection from cortical area V1 to V5: a light and electron microscopic study. J Neurosci. 18(24):10525-40. doi: 10.1523/JNEUROSCI.18-24-10525.1998. PMID: 9852590; PMCID: PMC6793364.
- Anderson JC, Martin KA. 2006. Synaptic connection from cortical area V4 to V2 in macaque monkey. J Comp Neurol. 495(6):709-21. doi: 10.1002/cne.20914. PMID: 16506191.
- Anderson JC, Martin KA. 2009. The synaptic connections between cortical areas V1 and V2 in macaque monkey. J Neurosci. 29(36):11283-93. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5757-08.2009. PMID: 19741135; PMCID: PMC6665918.
- Angelucci A, Bijanzadeh M, Nurminen L, Federer F, Merlin S, Bressloff PC. 2017. Circuits and Mechanisms for Surround Modulation in Visual Cortex. Annu Rev Neurosci. 40:425-451. doi: 10.1146/annurev-neuro-072116-031418. PMID: 28471714; PMCID: PMC5697758.
- Angelucci A, Bressloff PC. 2006. Contribution of feedforward, lateral and feedback connections to the classical receptive field center and extra-classical receptive field surround of primate V1 neurons. Prog Brain Res. 154:93-120. doi: 10.1016/S0079-6123(06)54005-1. PMID: 17010705.
- Angelucci A, Levitt JB, Walton EJ, Hupe JM, Bullier J, Lund JS. 2002. Circuits for local and global signal integration in primary visual cortex. J Neurosci. 22(19):8633-46. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-19-08633.2002. PMID: 12351737; PMCID: PMC6757772.
- Arbib MA, Érdi P, Szentágothai J. 1998. Neural Organization: Structure, Function and Dynamics. MIT Press
- Arnatkevičiūtė A, Fulcher BD, Fornito A. 2019. Uncovering the Transcriptional Correlates of Hub Connectivity in Neural Networks. Front Neural Circuits. 13:47. doi: 10.3389/fncir.2019.00047. PMID: 31379515; PMCID: PMC6659348.
- Avena-Koenigsberger A, Misic B, Sporns O. 2017. Communication dynamics in complex brain networks. Nat Rev Neurosci. 19(1):17-33. doi: 10.1038/nrn.2017.149. PMID: 29238085.
- Averbeck BB, Seo M. 2008. The statistical neuroanatomy of frontal networks in the macaque. PLoS Comput Biol. 4(4):e1000050. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000050. PMID: 18389057; PMCID: PMC2268011.
- Baddeley A. 2000. The episodic buffer: a new component of working memory? Trends Cogn Sci. 4(11):417-423. doi: 10.1016/s1364-6613(00)01538-2. PMID: 11058819.
- Badre D, D'Esposito M. 2009. Is the rostro-caudal axis of the frontal lobe hierarchical? Nat Rev Neurosci. 10(9):659-69. doi: 10.1038/nrn2667. PMID: 19672274; PMCID: PMC3258028.
- Badre D, Nee DE. 2018. Frontal Cortex and the Hierarchical Control of Behavior. Trends Cogn Sci. 22(2):170-188. doi: 10.1016/j.tics.2017.11.005. PMID: 29229206; PMCID: PMC5841250.
- Bair W. 2005. Visual receptive field organization. Curr Opin Neurobiol. 15(4):459-64. doi: 10.1016/j.conb.2005.07.006. PMID: 16023850.

- Banich MT. Compton RJ. 2011. Cognitive Neuroscience (3d ed.). Wadsworth Publishing. pp. 336-365.
- Bannister RG, Romanul FC. 1963. The Localization of alkaline phosphatase activity in cerebral blood vessels. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 26(4):333-40. doi: 10.1136/jnnp.26.4.333. PMID: 14043048; PMCID: PMC495593.
- Barabasi AL, Albert R. 1999. Emergence of scaling in random networks. Science. 286(5439):509-12. doi: 10.1126/science.286.5439.509. PMID: 10521342.
- Barbas H. 1995. Anatomic basis of cognitive-emotional interactions in the primate prefrontal cortex. Neurosci Biobehav Rev. 19(3):499-510. doi: 10.1016/0149-7634(94)00053-4. PMID: 7566750.
- Barbas H. 2015. General cortical and special prefrontal connections: principles from structure to function. Annu Rev Neurosci. 38:269-89. doi: 10.1146/annurev-neuro-071714-033936. PMID: 25897871.
- Barbas H, García-Cabezas MÁ. 2016. How the prefrontal executive got its stripes. Curr Opin Neurobiol. 40:125-134. doi: 10.1016/j.conb.2016.07.003. PMID: 27479655; PMCID: PMC5056826.
- Barbas H, Pandya DN. 1989. Architecture and intrinsic connections of the prefrontal cortex in the rhesus monkey. J Comp Neurol. 286(3):353-75. doi: 10.1002/cne.902860306. PMID: 2768563.
- Barbas H, Wang J, Joyce MKP, García-Cabezas MÁ. 2018. Pathway mechanism for excitatory and inhibitory control in working memory. J Neurophysiol. 120(5):2659-2678. doi: 10.1152/jn.00936.2017. PMID: 30256740; PMCID: PMC6295541.
- Bardy C, Huang JY, Wang C, Fitzgibbon T, Dreher B. 2009. 'Top-down' influences of ipsilateral or contralateral postero-temporal visual cortices on the extra-classical receptive fields of neurons in cat's striate cortex. Neuroscience. 158(2):951-68. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.09.057. PMID: 18976693.
- Barone P, Batardiere A, Knoblauch K, Kennedy H. 2000. Laminar distribution of neurons in extrastriate areas projecting to visual areas V1 and V4 correlates with the hierarchical rank and indicates the operation of a distance rule. J Neurosci. 20(9):3263-81. doi: 10.1523/JNEUROSCI.20-09-03263.2000. PMID: 10777791; PMCID: PMC6773101.
- Bassett DS, Bullmore ET. 2009. Human brain networks in health and disease. Curr Opin Neurol. 22(4):340-7. doi: 10.1097/WCO.0b013e32832d93dd. PMID: 19494774; PMCID: PMC2902726.
- Bassett DS, Bullmore E, Verchinski BA, Mattay VS, Weinberger DR, Meyer-Lindenberg A. 2008. Hierarchical organization of human cortical networks in health and schizophrenia. J Neurosci. 28(37):9239-48. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1929-08.2008. PMID: 18784304; PMCID: PMC2878961.
- Bassett DS, Sporns O. 2017. Network neuroscience. Nat Neurosci. 20(3):353-364. doi: 10.1038/nn.4502. PMID: 28230844; PMCID: PMC5485642.
- Battaglioli G, Liu H, Martin DL. 2003. Kinetic differences between the isoforms of glutamate decarboxylase: implications for the regulation of GABA synthesis. J Neurochem. 86(4):879-87. doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.01910.x. PMID: 12887686.
- Bavelier D, Neville HJ. 2002. Cross-modal plasticity: where and how? Nat Rev Neurosci. 3(6):443-52. doi: 10.1038/nrn848. PMID: 12042879.
- Bányai M, Diwadkar VA, Erdi P. 2011. Model-based dynamical analysis of functional disconnection in schizophrenia. Neuroimage. 58(3):870-7. doi: 10.1016/j.neuroimage.2011.06.046. PMID: 21726653; PMCID: PMC3221737.
- Bányai M, Négyessy L, Bazsó F. 2011. Organisation of signal flow in directed networks. Journal of Statistical Mechanics: theory and experiment, P06001, doi: 10.1088/1742-5468/2011/06/P06001

- Behrens TE, Sporns O. 2012. Human connectomics. Curr Opin Neurobiol. 22(1):144-53. doi: 10.1016/j.conb.2011.08.005. PMID: 21908183; PMCID: PMC3294015.
- Bell MA, Scarrow WG. 1984. Staining for microvascular alkaline phosphatase in thick celloidin sections of nervous tissue: morphometric and pathological applications. Microvasc Res. 27(2):189-203. doi: 10.1016/0026-2862(84)90053-0. PMID: 6369077.
- Bensmaia SJ, Denchev PV, Dammann JF 3rd, Craig JC, Hsiao SS. 2008. The representation of stimulus orientation in the early stages of somatosensory processing. J Neurosci. 28(3):776-86. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4162-07.2008. PMID: 18199777; PMCID: PMC6670339.
- Bertolero MA, Yeo BTT, D'Esposito M. 2017. The diverse club. Nat Commun. 8(1):1277. doi: 10.1038/s41467-017-01189-w. PMID: 29097714; PMCID: PMC5668346.
- Betzel RF, Bassett DS. 2018. Specificity and robustness of long-distance connections in weighted, interareal connectomes. Proc Natl Acad Sci U S A. 115(21):E4880-E4889. doi: 10.1073/pnas.1720186115. PMID: 29739890; PMCID: PMC6003515.
- Betzel RF, Bassett DS. 2017. Multi-scale brain networks. Neuroimage. 160:73-83. doi: 10.1016/j.neuroimage.2016.11.006. PMID: 27845257; PMCID: PMC5695236.
- Bishayee S, Bachhawat BK. 1972. Subcellular distribution, age dependent variation and species differences of brain pyridoxal phosphate phosphatase. Neurobiology. 2(1):12-20. PMID: 4348862.
- Bosking WH, Zhang Y, Schofield B, Fitzpatrick D. 1997. Orientation selectivity and the arrangement of horizontal connections in tree shrew striate cortex. J Neurosci. 17(6):2112-27. doi: 10.1523/JNEUROSCI.17-06-02112.1997. PMID: 9045738; PMCID: PMC6793759.
- Boynton GM. 2005. Attention and visual perception. Curr Opin Neurobiol. 15(4):465-9. doi: 10.1016/j.conb.2005.06.009. PMID: 16023853.
- BRAIN 2025 Report. SECTION III. IMPLEMENTATION: GOALS, DELIVERABLES, TIMELINES, AND COSTS; 2a. Scientific Goal: Generate circuit diagrams that vary in resolution from synapses to the whole brain; 2d-ii. Meso-Connectomic Methods; 2e-ii. The Meso-Connectome; <u>https://braininitiative.nih.gov/strategic-planning/brain-2025-report</u>
- Bremmer F, Schlack A, Shah NJ, Zafiris O, Kubischik M, Hoffmann K, Zilles K, Fink GR. 2001. Polymodal motion processing in posterior parietal and premotor cortex: a human fMRI study strongly implies equivalencies between humans and monkeys. Neuron. 29(1):287-96. doi: 10.1016/s0896-6273(01)00198-2. PMID: 11182099.
- Bressler SL. 2008. Neurocognitive networks Scholarpedia. 3(2):1567. doi:10.4249/scholarpedia.1567
- Brodin L, Bakeeva L, Shupliakov O. 1999. Presynaptic mitochondria and the temporal pattern of neurotransmitter release. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 354(1381):365-72. doi: 10.1098/rstb.1999.0388. PMID: 10212485; PMCID: PMC1692500.
- Brown SP, Hestrin S. 2009. Intracortical circuits of pyramidal neurons reflect their long-range axonal targets. Nature. 457(7233):1133-6. doi: 10.1038/nature07658. PMID: 19151698; PMCID: PMC2727746.
- Brun-Heath I, Ermonval M, Chabrol E, Xiao J, Palkovits M, Lyck R, Miller F, Couraud PO, Mornet E, Fonta C. 2011. Differential expression of the bone and the liver tissue nonspecific alkaline phosphatase isoforms in brain tissues. Cell Tissue Res. 343(3):521-36. doi: 10.1007/s00441-010-1111-4. PMID: 21191615.
- Bruno RM, Sakmann B. 2006. Cortex is driven by weak but synchronously active thalamocortical synapses. Science. 312(5780):1622-7. doi: 10.1126/science.1124593. PMID: 16778049.
- Bullier J, Hupé JM, James A, Girard P. 1996. Functional interactions between areas V1 and V2 in the monkey. J Physiol Paris. 90(3-4):217-20. doi: 10.1016/s0928-4257(97)81426-x. PMID: 9116670.
- Bullmore E, Sporns O. 2012. The economy of brain network organization. Nat Rev Neurosci. 13(5):336-49. doi: 10.1038/nrn3214. PMID: 22498897.

- Burton H, Fabri M. 1995. Ipsilateral intracortical connections of physiologically defined cutaneous representations in areas 3b and 1 of macaque monkeys: projections in the vicinity of the central sulcus. J Comp Neurol. 355(4):508-38. doi: 10.1002/cne.903550404. PMID: 7636029.
- Burton H, Sinclair RJ, McLaren DG. 2004. Cortical activity to vibrotactile stimulation: an fMRI study in blind and sighted individuals. Hum Brain Mapp. 23(4):210-28. doi: 10.1002/hbm.20064. PMID: 15449356; PMCID: PMC3697024.
- Burton H, Snyder AZ, Conturo TE, Akbudak E, Ollinger JM, Raichle ME. 2002. Adaptive changes in early and late blind: a fMRI study of Braille reading. J Neurophysiol. 87(1):589-607. doi: 10.1152/jn.00285.2001. PMID: 11784773; PMCID: PMC3684969.
- Buzás P, Kovács K, Ferecskó AS, Budd JM, Eysel UT, Kisvárday ZF. 2006. Model-based analysis of excitatory lateral connections in the visual cortex. J Comp Neurol. 499(6):861-81. doi: 10.1002/cne.21134. PMID: 17072837.
- Buzsáki G, Logothetis N, Singer W. 2013. Scaling brain size, keeping timing: evolutionary preservation of brain rhythms. Neuron. 80(3):751-64. doi: 10.1016/j.neuron.2013.10.002. PMID: 24183025; PMCID: PMC4009705.
- Buzsáki G, Mizuseki K. 2014. The log-dynamic brain: how skewed distributions affect network operations. Nat Rev Neurosci. 15(4):264-78. doi: 10.1038/nrn3687. PMID: 24569488; PMCID: PMC4051294.
- Castro-Alamancos MA. 1997. Short-term plasticity in thalamocortical pathways: cellular mechanisms and functional roles. Rev Neurosci. 8(2):95-116. doi: 10.1515/revneuro.1997.8.2.95. PMID: 9344181.
- Chen LM, Friedman RM, Ramsden BM, LaMotte RH, Roe AW. 2001. Fine-scale organization of SI (area 3b) in the squirrel monkey revealed with intrinsic optical imaging. J Neurophysiol. 86(6):3011-29. doi: 10.1152/jn.2001.86.6.3011. PMID: 11731557.
- Chen LM, Friedman RM, Roe AW. 2003. Optical imaging of a tactile illusion in area 3b of the primary somatosensory cortex. Science. 302(5646):881-5. doi: 10.1126/science.1087846. PMID: 14500850.
- Chen LM, Friedman RM, Roe AW. 2005. Optical imaging of SI topography in anesthetized and awake squirrel monkeys. J Neurosci. 25(33):7648-59. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1990-05.2005. PMID: 16107651; PMCID: PMC6725411.
- Chen LM, Friedman RM, Roe AW. 2009. Area-specific representation of mechanical nociceptive stimuli within SI cortex of squirrel monkeys. Pain. 141(3):258-268. doi: 10.1016/j.pain.2008.11.018. PMID: 19136211; PMCID: PMC2680084.
- Chen LM, Turner GH, Friedman RM, Zhang N, Gore JC, Roe AW, Avison MJ. 2007. Highresolution maps of real and illusory tactile activation in primary somatosensory cortex in individual monkeys with functional magnetic resonance imaging and optical imaging. J Neurosci. 27(34):9181-91. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1588-07.2007. PMID: 17715354; PMCID: PMC6672200.
- Christensen C, Thakar J, Albert R. 2007. Systems-level insights into cellular regulation: inferring, analysing, and modelling intracellular networks. IET Syst Biol. 1(2):61-77. doi: 10.1049/iet-syb:20060071. PMID: 17441550.
- Chung S, Li X, Nelson SB. 2002. Short-term depression at thalamocortical synapses contributes to rapid adaptation of cortical sensory responses in vivo. Neuron. 34(3):437-46. doi: 10.1016/s0896-6273(02)00659-1. PMID: 11988174.
- Clauset A, Newman ME, Moore C. 2004. Finding community structure in very large networks. Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys. 70(6 Pt 2):066111. doi: 10.1103/PhysRevE.70.066111. PMID: 15697438.
- Coburn SP. 2015. Vitamin B-6 Metabolism and Interactions with TNAP. Subcell Biochem. 76:207-38. doi: 10.1007/978-94-017-7197-9\_11. PMID: 26219714. In Fonta C, Negyessy L.

(szerk.) 2015. Neuronal Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase (TNAP) Dordrecht, Hollandia: Springer Netherlands

- Coffey JC, McDermott KW. 1997. The regional distribution of myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) in the developing rat CNS: an in vivo immunohistochemical study. J Neurocytol. 26(3):149-61. doi: 10.1023/a:1018579912831. PMID: 9192283.
- Cohen LG, Celnik P, Pascual-Leone A, Corwell B, Falz L, Dambrosia J, Honda M, Sadato N, Gerloff C, Catalá MD, Hallett M. 1997. Functional relevance of cross-modal plasticity in blind humans. Nature. 389(6647):180-3. doi: 10.1038/38278. PMID: 9296495.
- Collin G, Sporns O, Mandl RC, van den Heuvel MP. 2014. Structural and functional aspects relating to cost and benefit of rich club organization in the human cerebral cortex. Cereb Cortex. 24(9):2258-67. doi: 10.1093/cercor/bht064. PMID: 23551922; PMCID: PMC4128699.
- Constantinidis C, Procyk E. 2004. The primate working memory networks. Cogn Affect Behav Neurosci. 4(4):444-65. doi: 10.3758/cabn.4.4.444. PMID: 15849890; PMCID: PMC3885185.
- Cossell L, Iacaruso MF, Muir DR, Houlton R, Sader EN, Ko H, Hofer SB, Mrsic-Flogel TD. 2015. Functional organization of excitatory synaptic strength in primary visual cortex. Nature. 518(7539):399-403. doi: 10.1038/nature14182. PMID: 25652823; PMCID: PMC4843963.
- Costa, L. da F., Sporns, O. 2005. Hierarchical features of large-scale cortical connectivity. Eur. Phys. J. B 48:567–573. doi:10.1140/epjb/e2006-00017-1
- Costanzo RM, Gardner EP. 1980. A quantitative analysis of responses of direction-sensitive neurons in somatosensory cortex of awake monkeys. J Neurophysiol. 43(5):1319-41. doi: 10.1152/jn.1980.43.5.1319. PMID: 6768849.
- Covic EN, Sherman SM. 2011. Synaptic properties of connections between the primary and secondary auditory cortices in mice. Cereb Cortex. 21(11):2425-41. doi: 10.1093/cercor/bhr029. PMID: 21385835; PMCID: PMC3183423.
- Crick F, Koch C. 1998. Constraints on cortical and thalamic projections: the no-strong-loops hypothesis. Nature. 391(6664):245-50. doi: 10.1038/34584. PMID: 9440687.
- Cruz T, Gleizes M, Balayssac S, Mornet E, Marsal G, Millán JL, Malet-Martino M, Nowak LG, Gilard V, Fonta C. 2017. Identification of altered brain metabolites associated with TNAP activity in a mouse model of hypophosphatasia using untargeted NMR-based metabolomics analysis. J Neurochem. 140(6):919-940. doi: 10.1111/jnc.13950. PMID: 28072448; PMCID: PMC5339068.
- Csoma A, Kőrösi A, Rétvári G, Heszberger Z, Bíró J, Slíz M, Avena-Koenigsberger A, Griffa A, Hagmann P, Gulyás A. 2017. Routes Obey Hierarchy in Complex Networks. Sci Rep. 7(1):7243. doi: 10.1038/s41598-017-07412-4. PMID: 28775278; PMCID: PMC5543142.
- Deco G, Corbetta M. 2011. The dynamical balance of the brain at rest. Neuroscientist. 17(1):107-23. doi: 10.1177/1073858409354384. PMID: 21196530; PMCID: PMC4139497.
- Deco G, Sanz Perl Y, Vuust P, Tagliazucchi E, Kennedy H, Kringelbach ML. 2021. Rare longrange cortical connections enhance human information processing. Curr Biol. S0960-9822(21)01054-X. doi: 10.1016/j.cub.2021.07.064. PMID: 34437842.
- DeFelipe J. 2010. From the connectome to the synaptome: an epic love story. Science. 330(6008):1198-201. doi: 10.1126/science.1193378. PMID: 21109663.
- Dehaene S, Changeux JP. 2011. Experimental and theoretical approaches to conscious processing. Neuron. 70(2):200-27. doi: 10.1016/j.neuron.2011.03.018. PMID: 21521609.
- Delhaye BP, Long KH, Bensmaia SJ. 2018. Neural Basis of Touch and Proprioception in Primate Cortex. Compr Physiol. 8(4):1575-1602. doi: 10.1002/cphy.c170033. PMID: 30215864; PMCID: PMC6330897.
- Devine MJ, Kittler JT. 2018. Mitochondria at the neuronal presynapse in health and disease. Nat Rev Neurosci. 19(2):63-80. doi: 10.1038/nrn.2017.170. PMID: 29348666.

- Díaz-Hernández M, Gómez-Ramos A, Rubio A, Gómez-Villafuertes R, Naranjo JR, Miras-Portugal MT, Avila J. 2010. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase promotes the neurotoxicity effect of extracellular tau. J Biol Chem. 285(42):32539-48. doi: 10.1074/jbc.M110.145003. PMID: 20634292; PMCID: PMC2952256.
- Diaz-Hernandez M, Hernandez F, Miras-Portugal MT, Avila J. 2015. TNAP Plays a Key Role in Neural Differentiation as well as in Neurodegenerative Disorders. Subcell Biochem. 76:375-85. doi: 10.1007/978-94-017-7197-9\_18. PMID: 26219721. In Fonta C, Negyessy L. (szerk.) 2015. Neuronal Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase (TNAP) Dordrecht, Hollandia: Springer Netherlands
- Dijkerman HC, de Haan EH. 2007. Somatosensory processes subserving perception and action. Behav Brain Sci. 30(2):189-201; discussion 201-39. doi: 10.1017/S0140525X07001392. PMID: 17705910.
- Dombrowski SM, Hilgetag CC, Barbas H. 2001. Quantitative architecture distinguishes prefrontal cortical systems in the rhesus monkey. Cereb Cortex. 11(10):975-88. doi: 10.1093/cercor/11.10.975. PMID: 11549620.
- Douglas RJ, Koch C, Mahowald M, Martin KA, Suarez HH. 1995. Recurrent excitation in neocortical circuits. Science. 269(5226):981-5. doi: 10.1126/science.7638624. PMID: 7638624.
- Douglas RJ, Martin KA. 2004. Neuronal circuits of the neocortex. Annu Rev Neurosci. 27:419-51. doi: 10.1146/annurev.neuro.27.070203.144152. PMID: 15217339.
- Driver J, Spence C. 1998. Cross-modal links in spatial attention. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 353(1373):1319-31. doi: 10.1098/rstb.1998.0286. PMID: 9770225; PMCID: PMC1692335.
- Duarte R, Seeholzer A, Zilles K, Morrison A. 2017. Synaptic patterning and the timescales of cortical dynamics. Curr Opin Neurobiol. 43:156-165. doi: 10.1016/j.conb.2017.02.007. PMID: 28407562.
- Duhamel JR, Colby CL, Goldberg ME. 1998. Ventral intraparietal area of the macaque: congruent visual and somatic response properties. J Neurophysiol. 79(1):126-36. doi: 10.1152/jn.1998.79.1.126. PMID: 9425183.
- Enright AJ, Van Dongen S, Ouzounis CA. 2002. An efficient algorithm for large-scale detection of protein families. Nucleic Acids Res. 30(7):1575-84. doi: 10.1093/nar/30.7.1575. PMID: 11917018; PMCID: PMC101833.
- Ercsey-Ravasz M, Markov NT, Lamy C, Van Essen DC, Knoblauch K, Toroczkai Z, Kennedy H. 2013. A predictive network model of cerebral cortical connectivity based on a distance rule. Neuron. 80(1):184-97. doi: 10.1016/j.neuron.2013.07.036. PMID: 24094111; PMCID: PMC3954498.
- Erlander MG, Tobin AJ. 1991. The structural and functional heterogeneity of glutamic acid decarboxylase: a review. Neurochem Res. 16(3):215-26. doi: 10.1007/BF00966084. PMID: 1780024.
- Ermonval M, Baychelier F, Fonta C. 2015. TNAP, an Essential Player in Membrane Lipid Rafts of Neuronal Cells. Subcell Biochem. 76:167-83. doi: 10.1007/978-94-017-7197-9\_9. PMID: 26219712. In Fonta C, Negyessy L. (szerk.) 2015. Neuronal Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase (TNAP) Dordrecht, Hollandia: Springer Netherlands
- Ermonval M, Baudry A, Baychelier F, Pradines E, Pietri M, Oda K, Schneider B, Mouillet-Richard S, Launay JM, Kellermann O. 2009. The cellular prion protein interacts with the tissue non-specific alkaline phosphatase in membrane microdomains of bioaminergic neuronal cells. PLoS One. 4(8):e6497. doi: 10.1371/journal.pone.0006497. PMID: 19652718; PMCID: PMC2715859.
- Ester M, Kriegel H, Sander J, Xu X 1996. A density-based algorithm for discovering clusters in large spatial databases with noise. KDD-96 : Proceedings of the Second International Conference on Knowledge Discovery and Data Mining, 34:226–231. https://dl.acm.org/doi/10.5555/3001460.3001507

- Eyre MD, Freund TF, Gulyas AI. 2007. Quantitative ultrastructural differences between local and medial septal GABAergic axon terminals in the rat hippocampus. Neuroscience. 149(3):537-48. doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.08.006. PMID: 17913376; PMCID: PMC2206735.
- Fang PC, Jain N, Kaas JH. 2002. Few intrinsic connections cross the hand-face border of area 3b of New World monkeys. J Comp Neurol. 454(3):310-9. doi: 10.1002/cne.10433. PMID: 12442321.
- Favorov O, Whitsel BL. 1988. Spatial organization of the peripheral input to area 1 cell columns. I. The detection of 'segregates'. Brain Res. 472(1):25-42. doi: 10.1016/0165-0173(88)90003-3. PMID: 3342334.
- Fedde KN, Whyte MP. 1990. Alkaline phosphatase (tissue-nonspecific isoenzyme) is a phosphoethanolamine and pyridoxal-5'-phosphate ectophosphatase: normal and hypophosphatasia fibroblast study. Am J Hum Genet. 47(5):767-75. PMID: 2220817; PMCID: PMC1683690.
- Feldman DE. 2009. Synaptic mechanisms for plasticity in neocortex. Annu Rev Neurosci. 32:33-55. doi: 10.1146/annurev.neuro.051508.135516. PMID: 19400721; PMCID: PMC3071739.
- Felleman DJ, Van Essen DC. 1991. Distributed hierarchical processing in the primate cerebral cortex. Cereb Cortex. 1(1):1-47. doi: 10.1093/cercor/1.1.1. PMID: 1822724.
- Fiala JC. 2005. Reconstruct: a free editor for serial section microscopy. J Microsc. 218(Pt 1):52-61. doi: 10.1111/j.1365-2818.2005.01466.x. PMID: 15817063.
- Fonta C, Chappert C, Imbert M. 1997. N-methyl-D-aspartate subunit R1 involvement in the postnatal organization of the primary visual cortex of Callithrix jacchus. J Comp Neurol. 386(2):260-76. doi: 10.1002/(sici)1096-9861(19970922)386:2<260::aid-cne7>3.0.co;2-#. PMID: 9295151.
- Fonta C, Chappert C, Imbert M. 2000. Effect of monocular deprivation on NMDAR1 immunostaining in ocular dominance columns of the marmoset Callithrix jacchus. Vis Neurosci. 17(3):345-52. doi: 10.1017/s0952523800173031. PMID: 10910103.
- Fonta C, Imbert M. 2002. Vascularization in the primate visual cortex during development. Cereb Cortex. 12(2):199-211. doi: 10.1093/cercor/12.2.199. PMID: 11739267.
- Fonta C, Negyessy L. (szerk.) 2015. Neuronal Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase (TNAP) Dordrecht, Hollandia: Springer Netherlands 417 p.

Foran DR, Peterson AC. 1992. Myelin acquisition in the central nervous system of the mouse revealed by an MBP-Lac Z transgene. J Neurosci. 12(12):4890-7. doi: 10.1523/JNEUROSCI.12-12-04890.1992. PMID: 1281497; PMCID: PMC6575777.

- Freund TF, Martin KA, Soltesz I, Somogyi P, Whitteridge D. 1989. Arborisation pattern and postsynaptic targets of physiologically identified thalamocortical afferents in striate cortex of the macaque monkey. J Comp Neurol. 289(2):315-36. doi: 10.1002/cne.902890211. PMID: 2808770.
- Freund TF, Martin KA, Whitteridge D. 1985. Innervation of cat visual areas 17 and 18 by physiologically identified X- and Y- type thalamic afferents. I. Arborization patterns and quantitative distribution of postsynaptic elements. J Comp Neurol. 242(2):263-74. doi: 10.1002/cne.902420208. PMID: 4086666.
- Friede RL. 1966. A quantitative mapping of alkaline phosphatase in the brain of the rhesus monkey. J Neurochem. 13(3):197-203. doi: 10.1111/j.1471-4159.1966.tb07513.x. PMID: 4957290.
- Friedman RM, LM, Roe AW. 2004. Modality maps within primate somatosensory cortex. Proc Natl Acad Sci U S A. 101(34):12724-9. doi: 10.1073/pnas.0404884101. PMID: 15308779; PMCID: PMC514661.

- Friedman RM, Chen LM, Roe AW. 2008. Responses of areas 3b and 1 in anesthetized squirrel monkeys to single- and dual-site stimulation of the digits. J Neurophysiol. 100(6):3185-96. doi: 10.1152/jn.90278.2008. PMID: 18922955; PMCID: PMC2604853.
- Friedmann D, Pun A, Adams EL, Lui JH, Kebschull JM, Grutzner SM, Castagnola C, Tessier-Lavigne M, Luo L. 2020. Mapping mesoscale axonal projections in the mouse brain using a 3D convolutional network. Proc Natl Acad Sci U S A. 117(20):11068-11075. doi: 10.1073/pnas.1918465117. PMID: 32358193; PMCID: PMC7245124.
- Friston KJ. 2005. Models of brain function in neuroimaging. Annu Rev Psychol. 56:57-87. doi: 10.1146/annurev.psych.56.091103.070311. PMID: 15709929.
- Froemke RC. 2015. Plasticity of cortical excitatory-inhibitory balance. Annu Rev Neurosci. 38:195-219. doi: 10.1146/annurev-neuro-071714-034002. PMID: 25897875; PMCID: PMC4652600.
- Fuster JM. 1997. The prefrontal cortex. Anatomy, physiology and neuropsychology of the frontal lobe. Lippincott-Raven. Philadelphia, New York
- Fuster JM. 2004. Upper processing stages of the perception-action cycle. Trends Cogn Sci. 8(4):143-5. doi: 10.1016/j.tics.2004.02.004. PMID: 15551481.
- Fuster JM, Alexander GE. 1973. Firing changes in cells of the nucleus medialis dorsalis associated with delayed response behavior. Brain Res. 61:79-91. doi: 10.1016/0006-8993(73)90517-9. PMID: 4204130.
- Gallyas F. 1979. Silver staining of myelin by means of physical development. Neurol Res. 1(2):203-9. doi: 10.1080/01616412.1979.11739553. PMID: 95356.
- Garraghty PE, Florence SL, Kaas JH. 1990. Ablations of areas 3a and 3b of monkey somatosensory cortex abolish cutaneous responsivity in area 1. Brain Res. 528(1):165-9. doi: 10.1016/0006-8993(90)90213-u. PMID: 2245335.
- Gazzaniga, MS, Ivry, RB, Mangun GR. 2009. Cognitive Neuroscience: The biology of the mind (3d ed.). New York: W.W.Norton. pp. 555-599.
- Germuska M, Saha S, Fiala J, Barbas H. 2006. Synaptic distinction of laminar-specific prefrontal-temporal pathways in primates. Cereb Cortex. 16(6):865-75. doi: 10.1093/cercor/bhj030. PMID: 16151179.
- Ghazanfar AA, Schroeder CE. 2006. Is neocortex essentially multisensory? Trends Cogn Sci. 10(6):278-85. doi: 10.1016/j.tics.2006.04.008. PMID: 16713325.
- Giguere M, Goldman-Rakic PS. 1988. Mediodorsal nucleus: areal, laminar, and tangential distribution of afferents and efferents in the frontal lobe of rhesus monkeys. J Comp Neurol. 277(2):195-213. doi: 10.1002/cne.902770204. PMID: 2466057.
- Gil Z, Connors BW, Amitai Y. 1999. Efficacy of thalamocortical and intracortical synaptic connections: quanta, innervation, and reliability. Neuron. 23(2):385-97. doi: 10.1016/s0896-6273(00)80788-6. PMID: 10399943.
- Gilbert CD, Wiesel TN. 1989. Columnar specificity of intrinsic horizontal and corticocortical connections in cat visual cortex. J Neurosci. 9(7):2432-42. doi: 10.1523/JNEUROSCI.09-07-02432.1989. PMID: 2746337; PMCID: PMC6569760.
- Girard P, Bullier J. 1989. Visual activity in area V2 during reversible inactivation of area 17 in the macaque monkey. J Neurophysiol. 62(6):1287-302. doi: 10.1152/jn.1989.62.6.1287. PMID: 2600626.
- Gisiger T, Dehaene S, Changeux JP. 2000. Computational models of association cortex. Curr Opin Neurobiol. 10(2):250-9. doi: 10.1016/s0959-4388(00)00075-1. PMID: 10753797.
- Goldman-Rakic, PS. 1996. The prefrontal landscape: implications of functional architecture for understanding human mentation and the central executive. Philos Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 351(1346):1445-53. doi: 10.1098/rstb.1996.0129. PMID: 8941956.
- Goldman-Rakic PS, Porrino LJ. 1985. The primate mediodorsal (MD) nucleus and its projection to the frontal lobe. J Comp Neurol. 242(4):535-60. doi: 10.1002/cne.902420406. PMID: 2418080.

- Goodale MA, Milner AD. 1992. Separate visual pathways for perception and action. Trends Neurosci. 15(1):20-5. doi: 10.1016/0166-2236(92)90344-8. PMID: 1374953.
- Griffa A, Van den Heuvel MP. 2018. Rich-club neurocircuitry: function, evolution, and vulnerability. Dialogues Clin Neurosci. 20(2):121-132. doi: 10.31887/DCNS.2018.20.2/agriffa. PMID: 30250389; PMCID: PMC6136122.
- Hagen MC, Franzén O, McGlone F, Essick G, Dancer C, Pardo JV. 2002. Tactile motion activates the human middle temporal/V5 (MT/V5) complex. Eur J Neurosci. 16(5):957-64. doi: 10.1046/j.1460-9568.2002.02139.x. PMID: 12372032.
- Halassa MM, Sherman SM. 2019. Thalamocortical Circuit Motifs: A General Framework. Neuron. 103(5):762-770. doi: 10.1016/j.neuron.2019.06.005. PMID: 31487527; PMCID: PMC6886702.
- Hamilton R, Keenan JP, Catala M, Pascual-Leone A. 2000. Alexia for Braille following bilateral occipital stroke in an early blind woman. Neuroreport. 11(2):237-40. doi: 10.1097/00001756-200002070-00003. PMID: 10674462.
- Hamilton RH, Pascual-Leone A. 1998. Cortical plasticity associated with Braille learning. Trends Cogn Sci. 2(5):168-74. doi: 10.1016/s1364-6613(98)01172-3. PMID: 21227151.
- Harriger L, van den Heuvel MP, Sporns O. 2012. Rich club organization of macaque cerebral cortex and its role in network communication. PLoS One. 7(9):e46497. doi: 10.1371/journal.pone.0046497. PMID: 23029538; PMCID: PMC3460908.
- Harris KD, Shepherd GM. 2015. The neocortical circuit: themes and variations. Nat Neurosci. Feb;18(2):170-81. doi: 10.1038/nn.3917. PMID: 25622573; PMCID: PMC4889215.
- Harrison LM, Stephan KE, Rees G, Friston KJ. 2007. Extra-classical receptive field effects measured in striate cortex with fMRI. Neuroimage. 34(3):1199-208. doi: 10.1016/j.neuroimage.2006.10.017. PMID: 17169579; PMCID: PMC2640483.
- Harvey BM, Dumoulin SO. 2011. The relationship between cortical magnification factor and population receptive field size in human visual cortex: constancies in cortical architecture. J Neurosci. 31(38):13604-12. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2572-11.2011. PMID: 21940451; PMCID: PMC6623292.
- Herculano-Houzel S, Collins CE, Wong P, Kaas JH, Lent R. 2008. The basic nonuniformity of the cerebral cortex. Proc Natl Acad Sci U S A. 105(34):12593-8. doi: 10.1073/pnas.0805417105. PMID: 18689685; PMCID: PMC2527956.
- Hevner RF. 2007. Layer-specific markers as probes for neuron type identity in human neocortex and malformations of cortical development. J Neuropathol Exp Neurol. 66(2):101-9. doi: 10.1097/nen.0b013e3180301c06. PMID: 17278994.
- Hilgetag CC, Beul SF, van Albada SJ, Goulas A. 2019. An architectonic type principle integrates macroscopic cortico-cortical connections with intrinsic cortical circuits of the primate brain. Netw Neurosci. 3(4):905-923. doi: 10.1162/netn\_a\_00100. PMID: 31637331; PMCID: PMC6777964.
- Hilgetag CC, Burns GA, O'Neill MA, Scannell JW, Young MP. 2000a. Anatomical connectivity defines the organization of clusters of cortical areas in the macaque monkey and the cat. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 355(1393):91-110. doi: 10.1098/rstb.2000.0551. PMID: 10703046; PMCID: PMC1692723.
- Hilgetag CC, Goulas A. 2016. Is the brain really a small-world network? Brain Struct Funct. 221(4):2361-6. doi: 10.1007/s00429-015-1035-6. PMID: 25894630; PMCID: PMC4853440.
- Hilgetag CC, Goulas A. 2020. 'Hierarchy' in the organization of brain networks. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 375(1796):20190319. doi: 10.1098/rstb.2019.0319. PMID: 32089116; PMCID: PMC7061955.
- Hilgetag CC, Grant S. 2010. Cytoarchitectural differences are a key determinant of laminar projection origins in the visual cortex. Neuroimage. 51(3):1006-17. doi: 10.1016/j.neuroimage.2010.03.006. PMID: 20211270.

- Hilgetag CC, Medalla M, Beul SF, Barbas H. 2016. The primate connectome in context: Principles of connections of the cortical visual system. Neuroimage. 134:685-702. doi: 10.1016/j.neuroimage.2016.04.017. PMID: 27083526; PMCID: PMC5135480.
- Hilgetag CC, O'Neill MA, Young MP. 2000b. Hierarchical organization of macaque and cat cortical sensory systems explored with a novel network processor. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 355(1393):71-89. doi: 10.1098/rstb.2000.0550. PMID: 10703045; PMCID: PMC1692720.
- Hofmann C, Jakob F, Seefried L, Mentrup B, Graser S, Plotkin H, Girschick HJ, Liese J. 2015. Recombinant Enzyme Replacement Therapy in Hypophosphatasia. Subcell Biochem. 76:323-41. doi: 10.1007/978-94-017-7197-9\_15. PMID: 26219718. In Fonta C, Negyessy L. (szerk.) 2015. Neuronal Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase (TNAP) Dordrecht, Hollandia: Springer Netherlands
- Holderith N, Lorincz A, Katona G, Rózsa B, Kulik A, Watanabe M, Nusser Z. 2012. Release probability of hippocampal glutamatergic terminals scales with the size of the active zone. Nat Neurosci. 15(7):988-97. doi: 10.1038/nn.3137. Erratum in: Nat Neurosci. 2016 Jan;19(1):172. PMID: 22683683; PMCID: PMC3386897.
- Honey CJ, Kötter R, Breakspear M, Sporns O. 2007. Network structure of cerebral cortex shapes functional connectivity on multiple time scales. Proc Natl Acad Sci U S A. 104(24):10240-5. doi: 10.1073/pnas.0701519104. PMID: 17548818; PMCID: PMC1891224.
- Honey CJ, Sporns O, Cammoun L, Gigandet X, Thiran JP, Meuli R, Hagmann P. 2009.
  Predicting human resting-state functional connectivity from structural connectivity. Proc Natl Acad Sci U S A. 106(6):2035-40. doi: 10.1073/pnas.0811168106. PMID: 19188601; PMCID: PMC2634800.
- Horton JC, Hocking DR. 1998. Monocular core zones and binocular border strips in primate striate cortex revealed by the contrasting effects of enucleation, eyelid suture, and retinal laser lesions on cytochrome oxidase activity. J Neurosci. 18(14):5433-55. doi: 10.1523/JNEUROSCI.18-14-05433.1998. PMID: 9651225; PMCID: PMC6793502.
- Horvát S, Gămănuţ R, Ercsey-Ravasz M, Magrou L, Gămănuţ B, Van Essen DC, Burkhalter A, Knoblauch K, Toroczkai Z, Kennedy H. 2016. Spatial Embedding and Wiring Cost Constrain the Functional Layout of the Cortical Network of Rodents and Primates. PLoS Biol. 14(7):e1002512. doi: 10.1371/journal.pbio.1002512. PMID: 27441598; PMCID: PMC4956175.
- Hoshi K, Amizuka N, Oda K, Ikehara Y, Ozawa H. 1997. Immunolocalization of tissue nonspecific alkaline phosphatase in mice. Histochem Cell Biol. 107(3):183-91. doi: 10.1007/s004180050103. PMID: 9105889.
- Hsiao S. 2008. Central mechanisms of tactile shape perception. Curr Opin Neurobiol. 18(4):418-24. doi: 10.1016/j.conb.2008.09.001. PMID: 18809491.
- Hsu A, Luebke JI, Medalla M. 2017. Comparative ultrastructural features of excitatory synapses in the visual and frontal cortices of the adult mouse and monkey. J Comp Neurol. 525(9):2175-2191. doi: 10.1002/cne.24196. PMID: 28256708; PMCID: PMC6296778.
- Huffman KJ, Krubitzer L. 2001. Area 3a: topographic organization and cortical connections in marmoset monkeys. Cereb Cortex. 11(9):849-67. doi: 10.1093/cercor/11.9.849. PMID: 11532890.
- Hung CP, Ramsden BM and Roe AW. 2010. Inherent biases in spontaneous cortical dynamics. In Ding M and Glanzman HD (szerk.), The Dynamic Brain: An Exploration of Neuronal Variability and Its Functional Significance. Oxford: Oxford University Press, pp. 83–103.
- Hupé JM, James AC, Payne BR, Lomber SG, Girard P, Bullier J. 1998. Cortical feedback improves discrimination between figure and background by V1, V2 and V3 neurons. Nature. 394(6695):784-7. doi: 10.1038/29537. PMID: 9723617.
- Hütt MT, Kaiser M, Hilgetag CC. 2014. Perspective: network-guided pattern formation of neural dynamics. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 369(1653):20130522. doi: 10.1098/rstb.2013.0522. PMID: 25180302; PMCID: PMC4150299.

- Hyvärinen J, Poranen A. 1978. Receptive field integration and submodality convergence in the hand area of the post-central gyrus of the alert monkey. J Physiol. 283:539-56. doi: 10.1113/jphysiol.1978.sp012518. PMID: 102768; PMCID: PMC1282794.
- Innocenti GM, Caminiti R. 2017. Axon diameter relates to synaptic bouton size: structural properties define computationally different types of cortical connections in primates. Brain Struct Funct. 222(3):1169-1177. doi: 10.1007/s00429-016-1266-1. PMID: 27372337.
- Innocenti GM, Vercelli A, Caminiti R. 2014. The diameter of cortical axons depends both on the area of origin and target. Cereb Cortex. 24(8):2178-88. doi: 10.1093/cercor/bht070. PMID: 23529006.
- Ioannides AA, Liu L, Poghosyan V, Saridis GA, Gjedde A, Ptito M, Kupers R. 2013. MEG reveals a fast pathway from somatosensory cortex to occipital areas via posterior parietal cortex in a blind subject. Front Hum Neurosci. 7:429. doi: 10.3389/fnhum.2013.00429. PMID: 23935576; PMCID: PMC3733019.
- Irimia A, Van Horn JD. 2016. Scale-Dependent Variability and Quantitative Regimes in Graph-Theoretic Representations of Human Cortical Networks. Brain Connect. 6(2):152-63. doi: 10.1089/brain.2015.0360. PMID: 26596775; PMCID: PMC4779965.
- Isseroff A, Rosvold HE, Galkin TW, Goldman-Rakic PS. 1982. Spatial memory impairments following damage to the mediodorsal nucleus of the thalamus in rhesus monkeys. Brain Res. 232(1):97-113. doi: 10.1016/0006-8993(82)90613-8. PMID: 7034865.
- Iwamura Y. 1998. Hierarchical somatosensory processing. Curr Opin Neurobiol. 8(4):522-8. doi: 10.1016/s0959-4388(98)80041-x. PMID: 9751655.
- Iwamura Y. 2000. Bilateral receptive field neurons and callosal connections in the somatosensory cortex. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 355(1394):267-73. doi: 10.1098/rstb.2000.0563. PMID: 10724460; PMCID: PMC1692728.
- Iwamura Y, Tanaka M. 1978. Postcentral neurons in hand region of area 2: their possible role in the form discrimination of tactile objects. Brain Res. 150(3):662-6. doi: 10.1016/0006-8993(78)90834-x. PMID: 98206.
- Iwamura Y, Tanaka M, Sakamoto M, Hikosaka O. 1983a. Functional subdivisions representing different finger regions in area 3 of the first somatosensory cortex of the conscious monkey. Exp Brain Res 51:315–326. <u>https://doi.org/10.1007/BF00237868</u>
- Iwamura Y, Tanaka M, Sakamoto M, Hikosaka O. 1983b. Converging patterns of finger representation and complex response properties of neurons in area 1 of the first somatosensory cortex of the conscious monkey. Exp Brain Res. 51:327–337. <u>https://doi.org/10.1007/BF00237869</u>
- Iwamura Y, Tanaka M, Sakamoto M, Hikosaka O. 1993. Rostrocaudal gradients in the neuronal receptive field complexity in the finger region of the alert monkey's postcentral gyrus. Exp Brain Res. 92(3):360-8. doi: 10.1007/BF00229023. PMID: 8454001.
- Jeffs J, Ichida JM, Federer F, Angelucci A. 2009. Anatomical evidence for classical and extraclassical receptive field completion across the discontinuous horizontal meridian representation of primate area V2. Cereb Cortex. 19(4):963-81. doi: 10.1093/cercor/bhn142. PMID: 18755777; PMCID: PMC2722794.
- Jiang X, Shen S, Cadwell CR, Berens P, Sinz F, Ecker AS, Patel S, Tolias AS. 2015. Principles of connectivity among morphologically defined cell types in adult neocortex. Science. 350(6264):aac9462. doi: 10.1126/science.aac9462. PMID: 26612957; PMCID: PMC4809866.
- Johansson RS, Flanagan JR. 2009. Coding and use of tactile signals from the fingertips in object manipulation tasks. Nat Rev Neurosci. 10(5):345-59. doi: 10.1038/nrn2621. PMID: 19352402.
- Jones EG. 1975. Lamination and differential distribution of thalamic afferents within the sensory-motor cortex of the squirrel monkey. J Comp Neurol. 160(2):167-203. doi: 10.1002/cne.901600203. PMID: 803517.

- Jones EG. 1983. Lack of collateral thalamocortical projections to fields of the first somatic sensory cortex in monkeys. Exp Brain Res. 52(3):375-84. doi: 10.1007/BF00238031. PMID: 6653699.
- Jones EG. 1998. Viewpoint: the core and matrix of thalamic organization. Neuroscience. 85(2):331-45. doi: 10.1016/s0306-4522(97)00581-2. PMID: 9622234.
- Jones EG, Coulter JD, Hendry SH. 1978. Intracortical connectivity of architectonic fields in the somatic sensory, motor and parietal cortex of monkeys. J Comp Neurol. 181(2):291-347. doi: 10.1002/cne.901810206. PMID: 99458.

Jones EG, Hendry SH. 1989. Differential Calcium Binding Protein Immunoreactivity Distinguishes Classes of Relay Neurons in Monkey Thalamic Nuclei. Eur J Neurosci. 1(3):222-246. doi: 10.1111/j.1460-9568.1989.tb00791.x. PMID: 12106154.

Jouve B, Rosenstiehl P, Imbert M. 1998. A mathematical approach to the connectivity between the cortical visual areas of the macaque monkey. Cereb Cortex. 8(1):28-39. doi: 10.1093/cercor/8.1.28. PMID: 9510383.

Juliano SL, Friedman DP, Eslin DE. 1990. Corticocortical connections predict patches of stimulus-evoked metabolic activity in monkey somatosensory cortex. J Comp Neurol. 298(1):23-39. doi: 10.1002/cne.902980103. PMID: 1698827.

Kaas JH. 1983. What, if anything, is SI? Organization of first somatosensory area of cortex. Physiol Rev. 63(1):206-31. doi: 10.1152/physrev.1983.63.1.206. PMID: 6401864.

- Kaas JH. 2000. Organizing principles of sensory representations. Novartis Found Symp. 228:188-98; discussion 198-205. doi: 10.1002/0470846631.ch13. PMID: 10929323.
- Kaas JH. 2004. Evolution of somatosensory and motor cortex in primates. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol. 281(1):1148-56. doi: 10.1002/ar.a.20120. PMID: 15470673.
- Kaas JH. 2012. Evolution of columns, modules, and domains in the neocortex of primates. Proc Natl Acad Sci U S A. 109 Suppl 1(Suppl 1):10655-60. doi: 10.1073/pnas.1201892109. PMID: 22723351; PMCID: PMC3386869.
- Kaas JH, Krubitzer LA, Chino YM, Langston AL, Polley EH, Blair N. 1990. Reorganization of retinotopic cortical maps in adult mammals after lesions of the retina. Science. 248(4952):229-31. doi: 10.1126/science.2326637. PMID: 2326637.
- Kaiser M. 2011. A tutorial in connectome analysis: topological and spatial features of brain networks. Neuroimage. 57(3):892-907. doi: 10.1016/j.neuroimage.2011.05.025. PMID: 21605688.
- Kaiser M, Hilgetag CC. 2004. Edge vulnerability in neural and metabolic networks. Biol Cybern. 90(5):311-7. doi: 10.1007/s00422-004-0479-1. PMID: 15221391.
- Kaiser M, Hilgetag CC. 2006. Nonoptimal component placement, but short processing paths, due to long-distance projections in neural systems. PLoS Comput Biol. 2(7):e95. doi: 10.1371/journal.pcbi.0020095. PMID: 16848638; PMCID: PMC1513269.
- Kaiser M, Martin R, Andras P, Young MP. 2007. Simulation of robustness against lesions of cortical networks. Eur J Neurosci. 25(10):3185-92. doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.05574.x. PMID: 17561832.
- Kale P, Zalesky A, Gollo LL. 2018. Estimating the impact of structural directionality: How reliable are undirected connectomes? Netw Neurosci. 2(2):259-284. doi: 10.1162/netn\_a\_00040. PMID: 30234180; PMCID: PMC6135560.
- Kappers AM. 2011. Human perception of shape from touch. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 366(1581):3106-14. doi: 10.1098/rstb.2011.0171. PMID: 21969692; PMCID: PMC3172608.
- Kastner S, Ungerleider LG. 2000. Mechanisms of visual attention in the human cortex. Annu Rev Neurosci. 23:315-41. doi: 10.1146/annurev.neuro.23.1.315. PMID: 10845067.
- Kántor O, Varga A, Kovács-Öller T, Énzsöly A, Balogh L, Baksa G, Szepessy Z, Fonta C, Roe AW, Nitschke R, Szél Á, Négyessy L, Völgyi B, Lukáts Á. 2014. TNAP activity is localized

at critical sites of retinal neurotransmission across various vertebrate species. Cell Tissue Res. 358(1):85-98. doi: 10.1007/s00441-014-1944-3. PMID: 24988913.

- Kellett KA, Hooper NM. 2015. The Role of Tissue Non-specific Alkaline Phosphatase (TNAP) in Neurodegenerative Diseases: Alzheimer's Disease in the Focus. Subcell Biochem. 76:363-74. doi: 10.1007/978-94-017-7197-9\_17. PMID: 26219720. In Fonta C, Negyessy L. (szerk.) 2015. Neuronal Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase (TNAP) Dordrecht, Hollandia: Springer Netherlands
- Keysers C, Kaas JH, Gazzola V. 2010. Somatosensation in social perception. Nat Rev Neurosci. 11(6):417-28. doi: 10.1038/nrn2833. Erratum in: Nat Rev Neurosci. 2010 Oct;11(10):726. PMID: 20445542.
- Kim SO, Houtman JC, Jiang J, Ruppert JM, Bertics PJ, Frank SJ. 1999. Growth hormoneinduced alteration in ErbB-2 phosphorylation status in 3T3-F442A fibroblasts. J Biol Chem. 274(50):36015-24. doi: 10.1074/jbc.274.50.36015. PMID: 10585492.
- Kisvárday ZF, Crook JM, Buzás P, Eysel UT. 2000. Combined physiological-anatomical approaches to study lateral inhibition. J Neurosci Methods. 103(1):91-106. doi: 10.1016/s0165-0270(00)00299-5. PMID: 11074099.
- Kisvárday ZF, Tóth E, Rausch M, Eysel UT. 1997. Orientation-specific relationship between populations of excitatory and inhibitory lateral connections in the visual cortex of the cat. Cereb Cortex. (7):605-18. doi: 10.1093/cercor/7.7.605. PMID: 9373017.
- Kötter R. 2004. Online retrieval, processing, and visualization of primate connectivity data from the CoCoMac database. Neuroinformatics. 2(2):127-44. doi: 10.1385/NI:2:2:127. PMID: 15319511.
- Kötter R. Hilgetag CC. Stephan KE. 2001. Connectional characteristics of areas in Walker's map of primate prefrontal cortex. Neurocomputing. 38–40:741-746. <u>https://doi.org/10.1016/S0925-2312(01)00397-6</u>.
- Kötter R, Reid AT, Krumnack A, Wanke E, Sporns O. 2007. Shapley ratings in brain networks. Front Neuroinform. 1:2. doi: 10.3389/neuro.11.002.2007. PMID: 18974797; PMCID: PMC2525994.
- Kötter R, Sommer FT. 2000. Global relationship between anatomical connectivity and activity propagation in the cerebral cortex. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 355(1393):127-34. doi: 10.1098/rstb.2000.0553. PMID: 10703048; PMCID: PMC1692719.
- Kötter R, Stephan KE. 2003. Network participation indices: characterizing component roles for information processing in neural networks. Neural Netw. 16(9):1261-75. doi: 10.1016/j.neunet.2003.06.002. PMID: 14622883.
- Krubitzer L, Dooley JC. 2013. Cortical plasticity within and across lifetimes: how can development inform us about phenotypic transformations? Front Hum Neurosci. 7:620. doi: 10.3389/fnhum.2013.00620. PMID: 24130524; PMCID: PMC3793242.
- Krubitzer LA, Kaas JH. 1990a. The organization and connections of somatosensory cortex in marmosets. J Neurosci. 10(3):952-74. doi: 10.1523/JNEUROSCI.10-03-00952.1990. PMID: 2108231; PMCID: PMC6570129.
- Krubitzer LA, Kaas JH. 1990b. Cortical connections of MT in four species of primates: areal, modular, and retinotopic patterns. Vis Neurosci. 5(2):165-204. doi: 10.1017/s0952523800000213. PMID: 2278944.
- Krubitzer LA, Seelke AM. 2012. Cortical evolution in mammals: the bane and beauty of phenotypic variability. Proc Natl Acad Sci U S A. 109 Suppl 1(Suppl 1):10647-54. doi: 10.1073/pnas.1201891109. PMID: 22723368; PMCID: PMC3386882.
- Lacey S, Sathian K. 2014. Visuo-haptic multisensory object recognition, categorization, and representation. Front Psychol. 5:730. doi: 10.3389/fpsyg.2014.00730. PMID: 25101014; PMCID: PMC4102085.

- Lacey S, Sathian K. 2015. Crossmodal and multisensory interactions between vision and touch. Scholarpedia J. 10(3):7957. doi: 10.4249/scholarpedia.7957. PMID: 26783412; PMCID: PMC4715428.
- Lanciego JL, Wouterlood FG. 2020. Neuroanatomical tract-tracing techniques that did go viral. Brain Struct Funct. 225(4):1193-1224. doi: 10.1007/s00429-020-02041-6. PMID: 32062721; PMCID: PMC7271020.
- Lee WC, Reid RC. 2011. Specificity and randomness: structure-function relationships in neural circuits. Curr Opin Neurobiol. 21(5):801-7. doi: 10.1016/j.conb.2011.07.004. PMID: 21855320; PMCID: PMC3223317.
- Levitt JB, Yoshioka T, Lund JS. 1994. Intrinsic cortical connections in macaque visual area V2: evidence for interaction between different functional streams. J Comp Neurol. 342(4):551-70. doi: 10.1002/cne.903420405. PMID: 8040365.
- Lewis DA, Cruz DA, Melchitzky DS, Pierri JN. 2001. Lamina-specific deficits in parvalbuminimmunoreactive varicosities in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia: evidence for fewer projections from the thalamus. Am J Psychiatry. 158(9):1411-22. doi: 10.1176/appi.ajp.158.9.1411. PMID: 11532725.
- Lewis DA, Melchitzky DS, Burgos GG. 2002. Specificity in the functional architecture of primate prefrontal cortex. J Neurocytol. 31(3-5):265-76. doi: 10.1023/a:1024174026286. PMID: 12815246.
- Lewis JW, Van Essen DC. 2000. Corticocortical connections of visual, sensorimotor, and multimodal processing areas in the parietal lobe of the macaque monkey. J Comp Neurol. 428(1):112-37. doi: 10.1002/1096-9861(20001204)428:1<112::aid-cne8>3.0.co;2-9. PMID: 11058227.
- Lewis JW, Van Essen DC. 2000b. Mapping of architectonic subdivisions in the macaque monkey, with emphasis on parieto-occipital cortex. J Comp Neurol. 428(1):79-111. doi: 10.1002/1096-9861(20001204)428:1<79::aid-cne7>3.0.co;2-q. PMID: 11058226.
- Li M, Cui Z, Niu Y, Liu B, Fan W, Yu D, Deng J. 2010. Synaptogenesis in the developing mouse visual cortex. Brain Res Bull. 81(1):107-13. doi: 10.1016/j.brainresbull.2009.08.028. PMID: 19751806.
- Li H, Fukuda M, Tanifuji M, Rockland KS. 2003. Intrinsic collaterals of layer 6 Meynert cells and functional columns in primate V1. Neuroscience. 120(4):1061-9. doi: 10.1016/s0306-4522(03)00429-9. PMID: 12927211.
- Liao CC, Gharbawie OA, Qi H, Kaas JH. 2013. Cortical connections to single digit representations in area 3b of somatosensory cortex in squirrel monkeys and prosimian galagos. J Comp Neurol. 521(16):3768-90. doi: 10.1002/cne.23377. PMID: 23749740; PMCID: PMC4000754.
- Liedtke D, Hofmann C, Jakob F, Klopocki E, Graser S. 2020. Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase-A Gatekeeper of Physiological Conditions in Health and a Modulator of Biological Environments in Disease. Biomolecules. 10(12):1648. doi: 10.3390/biom10121648. PMID: 33302551; PMCID: PMC7763311.
- Liewald D, Miller R, Logothetis N, Wagner HJ, Schüz A. 2014. Distribution of axon diameters in cortical white matter: an electron-microscopic study on three human brains and a macaque. Biol Cybern. 108(5):541-57. doi: 10.1007/s00422-014-0626-2. PMID: 25142940; PMCID: PMC4228120.
- Lipton ML, Liszewski MC, O'Connell MN, Mills A, Smiley JF, Branch CA, Isler JR, Schroeder CE. 2010. Interactions within the hand representation in primary somatosensory cortex of primates. J Neurosci. 30(47):15895-903. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4765-09.2010. Erratum in: J Neurosci. 2015 Dec 2;35(48):16013. PMID: 21106828; PMCID: PMC3073563.
- Liu J, Li M, Pan Y, Lan W, Zhen, R, Wu F-X, Wang J. 2017. Complex Brain Network Analysis and Its Applications to Brain Disorders: A Survey. Complexity, Article ID 8362741, 27 pages. https://doi.org/10.1155/2017/8362741

- Lodato S, Arlotta P. 2015. Generating neuronal diversity in the mammalian cerebral cortex. Annu Rev Cell Dev Biol. 31:699-720. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100814-125353. PMID: 26359774; PMCID: PMC4778709.
- Low MG, Saltiel AR. 1988. Structural and functional roles of glycosyl-phosphatidylinositol in membranes. Science. 239(4837):268-75. doi: 10.1126/science.3276003. PMID: 3276003.
- Luczak A, Barthó P, Harris KD. 2009. Spontaneous events outline the realm of possible sensory responses in neocortical populations. Neuron. 62(3):413-25. doi: 10.1016/j.neuron.2009.03.014. PMID: 19447096; PMCID: PMC2696272.
- Luethke LE, Krubitzer LA, Kaas JH. 1989. Connections of primary auditory cortex in the New World monkey, Saguinus. J Comp Neurol. 285(4):487-513. doi: 10.1002/cne.902850406. PMID: 2474584.
- Lund JS, Angelucci A, Bressloff PC. 2003. Anatomical substrates for functional columns in macaque monkey primary visual cortex. Cereb Cortex. 13(1):15-24. doi: 10.1093/cercor/13.1.15. PMID: 12466211.
- Lund JS, Yoshioka T, Levitt JB. 1993. Comparison of intrinsic connectivity in different areas of macaque monkey cerebral cortex. Cereb Cortex. 3(2):148-62. doi: 10.1093/cercor/3.2.148. PMID: 8490320.
- Luppino G, Calzavara R, Rozzi S, Matelli M. 2001. Projections from the superior temporal sulcus to the agranular frontal cortex in the macaque. Eur J Neurosci. 14(6):1035-40. doi: 10.1046/j.0953-816x.2001.01734.x. PMID: 11595042.
- Lyon DC, Kaas JH. 2001. Connectional and architectonic evidence for dorsal and ventral V3, and dorsomedial area in marmoset monkeys. J Neurosci. 21(1):249-61. doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-01-00249.2001. PMID: 11150342; PMCID: PMC6762432.
- Macaluso E, Driver J. 2001. Spatial attention and crossmodal interactions between vision and touch. Neuropsychologia. 39(12):1304-16. doi: 10.1016/s0028-3932(01)00119-1. PMID: 11566313.
- Macaluso E, Driver J, Frith CD. 2003. Multimodal spatial representations engaged in human parietal cortex during both saccadic and manual spatial orienting. Curr Biol. 13(12):990-9. doi: 10.1016/s0960-9822(03)00377-4. PMID: 12814544.
- Makani S, Chesler M. 2007. Endogenous alkaline transients boost postsynaptic NMDA receptor responses in hippocampal CA1 pyramidal neurons. J Neurosci. 27(28):7438-46. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2304-07.2007. PMID: 17626204; PMCID: PMC6672609.
- Malach R, Amir Y, Harel M, Grinvald A. 1993. Relationship between intrinsic connections and functional architecture revealed by optical imaging and in vivo targeted biocytin injections in primate striate cortex. Proc Natl Acad Sci U S A. 90(22):10469-73. doi: 10.1073/pnas.90.22.10469. PMID: 8248133; PMCID: PMC47798.
- Mancini F, Haggard P, Iannetti GD, Longo MR, Sereno MI. 2012. Fine-grained nociceptive maps in primary somatosensory cortex. J Neurosci. 32(48):17155-62. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3059-12.2012. PMID: 23197708; PMCID: PMC3529201.
- Manger PR, Woods TM, Muñoz A, Jones EG. 1997. Hand/face border as a limiting boundary in the body representation in monkey somatosensory cortex. J Neurosci. 17(16):6338-51. doi: 10.1523/JNEUROSCI.17-16-06338.1997. PMID: 9236243; PMCID: PMC6568330.
- Manocha SL. 1970. Histochemical distribution of alkaline and acid phosphatase and adenosine triphosphatase in the brain of squirrel monkey (Saimiri sciureus). Histochemie. 21(3):221-35. doi: 10.1007/BF00304214. PMID: 4244796.
- Markov NT, Ercsey-Ravasz MM, Ribeiro Gomes AR, Lamy C, Magrou L, Vezoli J, Misery P, Falchier A, Quilodran R, Gariel MA, Sallet J, Gamanut R, Huissoud C, Clavagnier S, Giroud P, Sappey-Marinier D, Barone P, Dehay C, Toroczkai Z, Knoblauch K, Van Essen DC, Kennedy H. 2014a. A weighted and directed interareal connectivity matrix for macaque cerebral cortex. Cereb Cortex. 24(1):17-36. doi: 10.1093/cercor/bhs270. PMID: 23010748; PMCID: PMC3862262.

- Markov NT, Ercsey-Ravasz M, Lamy C, Ribeiro Gomes AR, Magrou L, Misery P, Giroud P, Barone P, Dehay C, Toroczkai Z, Knoblauch K, Van Essen DC, Kennedy H. 2013a. The role of long-range connections on the specificity of the macaque interareal cortical network. Proc Natl Acad Sci U S A. 110(13):5187-92. doi: 10.1073/pnas.1218972110. PMID: 23479610; PMCID: PMC3612613.
- Markov NT, Ercsey-Ravasz M, Van Essen DC, Knoblauch K, Toroczkai Z, Kennedy H. 2013b. Cortical high-density counterstream architectures. Science. 342(6158):1238406. doi: 10.1126/science.1238406. PMID: 24179228; PMCID: PMC3905047.
- Markov NT, Vezoli J, Chameau P, Falchier A, Quilodran R, Huissoud C, Lamy C, Misery P, Giroud P, Ullman S, Barone P, Dehay C, Knoblauch K, Kennedy H. 2014b. Anatomy of hierarchy: feedforward and feedback pathways in macaque visual cortex. J Comp Neurol. 522(1):225-59. doi: 10.1002/cne.23458. PMID: 23983048; PMCID: PMC4255240.
- Markram H, Wang Y, Tsodyks M. 1998. Differential signaling via the same axon of neocortical pyramidal neurons. Proc Natl Acad Sci U S A. 95(9):5323-8. doi: 10.1073/pnas.95.9.5323. PMID: 9560274; PMCID: PMC20259.
- Marois R, Ivanoff J. 2005. Capacity limits of information processing in the brain. Trends Cogn Sci. 9(6):296-305. doi: 10.1016/j.tics.2005.04.010. PMID: 15925809.
- Marreiros AC, Stephan KE, Friston, KJ. 2010. Dynamic causal modeling. Scholarpedia, 5(7):9568. doi:10.4249/scholarpedia.9568
- Matsui T, Tamura K, Koyano KW, Takeuchi D, Adachi Y, Osada T, Miyashita Y. 2011. Direct comparison of spontaneous functional connectivity and effective connectivity measured by intracortical microstimulation: an fMRI study in macaque monkeys. Cereb Cortex. 21(10):2348-56. doi: 10.1093/cercor/bhr019. PMID: 21368090.
- Maurer D, Lewis TL, Mondloch CJ. 2005. Missing sights: consequences for visual cognitive development. Trends Cogn Sci. 9(3):144-51. doi: 10.1016/j.tics.2005.01.006. PMID: 15737823.
- Ma'ayan A. 2008. Network integration and graph analysis in mammalian molecular systems biology. IET Syst Biol. 2(5):206-21. doi: 10.1049/iet-syb:20070075. PMID: 19045817; PMCID: PMC2745214.
- Ma'ayan A, Jenkins SL, Neves S, Hasseldine A, Grace E, Dubin-Thaler B, Eungdamrong NJ, Weng G, Ram PT, Rice JJ, Kershenbaum A, Stolovitzky GA, Blitzer RD, Iyengar R. 2005.
  Formation of regulatory patterns during signal propagation in a Mammalian cellular network. Science. 309(5737):1078-83. doi: 10.1126/science.1108876. PMID: 16099987; PMCID: PMC3032439.
- Mayahara H, Hirano H, Saito T, Ogawa K. 1967. The new lead citrate method for the ultracytochemical demonstration of activity of non-specific alkaline phosphatase (orthophosphoric monoester phosphohydrolase). Histochemie. 11(1):88-96. doi: 10.1007/BF00326615. PMID: 5589645.
- McAllister BB, Dyck RH. 2017. A new role for zinc in the brain. Elife. 6:e31816. doi: 10.7554/eLife.31816. PMID: 28985179; PMCID: PMC5630257.
- Mejias JF, Murray JD, Kennedy H, Wang XJ. 2016. Feedforward and feedback frequencydependent interactions in a large-scale laminar network of the primate cortex. Sci Adv. 2(11):e1601335. doi: 10.1126/sciadv.1601335. PMID: 28138530; PMCID: PMC5262462.
- Melchitzky DS, Sesack SR, Lewis DA. 1999. Parvalbumin-immunoreactive axon terminals in macaque monkey and human prefrontal cortex: laminar, regional, and target specificity of type I and type II synapses. J Comp Neurol. 408(1):11-22. PMID: 10331577.
- Mesulam MM, Geula C. 1994. Chemoarchitectonics of axonal and perikaryal acetylcholinesterase along information processing systems of the human cerebral cortex. Brain Res Bull. 33(2):137-53. doi: 10.1016/0361-9230(94)90244-5. PMID: 8275332.

- Meunier CN, Chameau P, Fossier PM. 2017. Modulation of Synaptic Plasticity in the Cortex Needs to Understand All the Players. Front Synaptic Neurosci. 9:2. doi: 10.3389/fnsyn.2017.00002. PMID: 28203201; PMCID: PMC5285384.
- Meyer K, Damasio A. 2009. Convergence and divergence in a neural architecture for recognition and memory. Trends Neurosci. 32(7):376-82. doi: 10.1016/j.tins.2009.04.002. PMID: 19520438.
- Millán JL. 2015. What Can We Learn About the Neural Functions of TNAP from Studies on Other Organs and Tissues? Subcell Biochem. 76:155-66. doi: 10.1007/978-94-017-7197-9\_8. PMID: 26219711. In Fonta C, Negyessy L. (szerk.) 2015. Neuronal Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase (TNAP) Dordrecht, Hollandia: Springer Netherlands
- Miller KD. 2016. Canonical computations of cerebral cortex. Curr Opin Neurobiol. 37:75-84. doi: 10.1016/j.conb.2016.01.008. PMID: 26868041; PMCID: PMC4944655.
- Milo R, Shen-Orr S, Itzkovitz S, Kashtan N, Chklovskii D, Alon U. 2002. Network motifs: simple building blocks of complex networks. Science. 298(5594):824-7. doi: 10.1126/science.298.5594.824. PMID: 12399590.
- Minciacchi D, Kassa RM, Del Tongo C, Mariotti R, Bentivoglio M. 2009. Voronoi-based spatial analysis reveals selective interneuron changes in the cortex of FALS mice. Exp Neurol. 215(1):77-86. doi: 10.1016/j.expneurol.2008.09.005. PMID: 18926824.
- Molnár Z, Cheung AF. 2006. Towards the classification of subpopulations of layer V pyramidal projection neurons. Neurosci Res. 55(2):105-15. doi: 10.1016/j.neures.2006.02.008. PMID: 16542744.
- Molnár Z, Kaas JH, de Carlos JA, Hevner RF, Lein E, Němec P. 2014. Evolution and development of the mammalian cerebral cortex. Brain Behav Evol. 83(2):126-39. doi: 10.1159/000357753. PMID: 24776993; PMCID: PMC4440552.
- Molyneaux BJ, Arlotta P, Menezes JR, Macklis JD. 2007. Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. Nat Rev Neurosci. 8(6):427-37. doi: 10.1038/nrn2151. PMID: 17514196.
- Moradi Chameh H, Rich S, Wang L, Chen FD, Zhang L, Carlen PL, Tripathy SJ, Valiante TA. 2021. Diversity amongst human cortical pyramidal neurons revealed via their sag currents and frequency preferences. Nat Commun. 12(1):2497. doi: 10.1038/s41467-021-22741-9. PMID: 33941783.
- Mori S, Nagano M. 1985a. Electron-microscopic cytochemistry of alkaline-phosphatase activity in endothelium, pericytes and oligodendrocytes in the rat brain. Histochemistry. 82(3):225-31. doi: 10.1007/BF00501399. PMID: 3997556.
- Mori S, Nagano M. 1985b. Electron microscopic cytochemistry of alkaline phosphatase in neurons of rats. Arch Histol Jpn. 48(4):389-97. doi: 10.1679/aohc.48.389. PMID: 4084005.
- Mornet E. 2015. Molecular Genetics of Hypophosphatasia and Phenotype-Genotype Correlations. Subcell Biochem. 76:25-43. doi: 10.1007/978-94-017-7197-9\_2. PMID: 26219705. In Fonta C, Negyessy L. (szerk.) 2015. Neuronal Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase (TNAP) Dordrecht, Hollandia: Springer Netherlands
- Morone KA, Neimat JS, Roe AW, Friedman RM. 2017. Review of functional and clinical relevance of intrinsic signal optical imaging in human brain mapping. Neurophotonics. 4(3):031220. doi: 10.1117/1.NPh.4.3.031220. PMID: 28630881; PMCID: PMC5466092.
- Mountcastle VB. 1997. The columnar organization of the neocortex. Brain. 120 (Pt 4):701-22. doi: 10.1093/brain/120.4.701. PMID: 9153131.
- Mountcastle VB, Powell TP. 1959. Central nervous mechanisms subserving position sense and kinesthesis. Bull Johns Hopkins Hosp. 105:173-200. PMID: 14424737.
- Murray JD, Bernacchia A, Freedman DJ, Romo R, Wallis JD, Cai X, Padoa-Schioppa C, Pasternak T, Seo H, Lee D, Wang XJ. 2014. A hierarchy of intrinsic timescales across primate cortex. Nat Neurosci. 17(12):1661-3. doi: 10.1038/nn.3862. PMID: 25383900; PMCID: PMC4241138.

- Narisawa S. 2015. Genetically Modified Mice for Studying TNAP Function. Subcell Biochem. 76:45-57. doi: 10.1007/978-94-017-7197-9\_3. PMID: 26219706. In Fonta C, Negyessy L. (szerk.) 2015. Neuronal Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase (TNAP) Dordrecht, Hollandia: Springer Netherlands
- Narisawa S, Fröhlander N, Millán JL. 1997. Inactivation of two mouse alkaline phosphatase genes and establishment of a model of infantile hypophosphatasia. Dev Dyn. 208(3):432-46. doi: 10.1002/(SICI)1097-0177(199703)208:3<432::AID-AJA13>3.0.CO;2-1. PMID: 9056646.
- Narisawa S, Wennberg C, Millán JL. 2001. Abnormal vitamin B6 metabolism in alkaline phosphatase knock-out mice causes multiple abnormalities, but not the impaired bone mineralization. J Pathol. 193(1):125-33. doi: 10.1002/1096-9896(2000)9999:9999<::AID-PATH722>3.0.CO;2-Y. PMID: 11169525.
- Negwer M, Liu YJ, Schubert D, Lyon DC. 2017. V1 connections reveal a series of elongated higher visual areas in the California ground squirrel, Otospermophilus beecheyi. J Comp Neurol. 525(8):1909-1921. doi: 10.1002/cne.24173. PMID: 28078786.
- Nepusz T, Petróczi A, Négyessy L, Bazsó F. 2008. Fuzzy communities and the concept of bridgeness in complex networks. Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys. 77(1 Pt 2):016107. doi: 10.1103/PhysRevE.77.016107. PMID: 18351915.
- Newman MEJ. 2003. The Structure and Function of Complex Networks. SIAM Review, 45(2):167–256. <u>https://doi.org/10.1137/S003614450342480</u>
- Négyessy L. 2003. Munkamemória a prefrontális kéregben. In: Pléh, Csaba; Kovács, Gyula; Gulyás, Balázs (szerk.) Kognitív idegtudomány. Budapest, Magyarország: Osiris Kiadó, pp. 436-458. (átdolgozva, 2010:

https://www.researchgate.net/publication/345363555\_Munkamemoria\_a\_prefrontalis\_kereg\_ben)

- Négyessy L, Gál V, Farkas T, Toldi J. 2000. Cross-modal plasticity of the corticothalamic circuits in rats enucleated on the first postnatal day. Eur J Neurosci. 12(5):1654-68. doi: 10.1046/j.1460-9568.2000.00057.x. PMID: 10792443.
- Nikonenko I, Jourdain P, Alberi S, Toni N, Muller D. 2002. Activity-induced changes of spine morphology. Hippocampus. 12(5):585-91. doi: 10.1002/hipo.10095. PMID: 12440574.
- Nowak LG, Rosay B, Czégé D, Fonta C. 2015. Tetramisole and Levamisole Suppress Neuronal Activity Independently from Their Inhibitory Action on Tissue Non-specific Alkaline Phosphatase in Mouse Cortex. Subcell Biochem. 76:239-81. doi: 10.1007/978-94-017-7197-9\_12. PMID: 26219715. In Fonta C, Negyessy L. (szerk.) 2015. Neuronal Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase (TNAP) Dordrecht, Hollandia: Springer Netherlands
- Oh SW, Harris JA, Ng L, Winslow B, Cain N, Mihalas S, Wang Q, Lau C, Kuan L, Henry AM, Mortrud MT, Ouellette B, Nguyen TN, Sorensen SA, Slaughterbeck CR, Wakeman W, Li Y, Feng D, Ho A, Nicholas E, Hirokawa KE, Bohn P, Joines KM, Peng H, Hawrylycz MJ, Phillips JW, Hohmann JG, Wohnoutka P, Gerfen CR, Koch C, Bernard A, Dang C, Jones AR, Zeng H. 2014. A mesoscale connectome of the mouse brain. Nature. 508(7495):207-14. doi: 10.1038/nature13186. PMID: 24695228; PMCID: PMC5102064.
- Osyczka AM, Leboy PS. 2005. Bone morphogenetic protein regulation of early osteoblast genes in human marrow stromal cells is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling. Endocrinology. 146(8):3428-37. doi: 10.1210/en.2005-0303. PMID: 15905316; PMCID: PMC1237031.
- Padberg J, Disbrow E, Krubitzer L. 2005. The organization and connections of anterior and posterior parietal cortex in titi monkeys: do New World monkeys have an area 2? Cereb Cortex. 15(12):1938-63. doi: 10.1093/cercor/bhi071. PMID: 15758196.
- Palla G, Derényi I, Farkas I, Vicsek T. 2005. Uncovering the overlapping community structure of complex networks in nature and society. Nature. 435(7043):814-8. doi: 10.1038/nature03607. PMID: 15944704.

- Pandya DN. Yeterian EH. 1998. Comparisons of prefrontal architecture and connections. In: The prefrontal cortex. Executive and cognitive functions. Ed.: Roberts, A.C., Robbins, T.W. and Weiskrantz, L. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo.
- Passingham R. 2009. How good is the macaque monkey model of the human brain? Curr Opin Neurobiol. 19(1):6-11. doi: 10.1016/j.conb.2009.01.002. PMID: 19261463; PMCID: PMC2706975.
- Paul RL, Merzenich M, Goodman H. 1972. Representation of slowly and rapidly adapting cutaneous mechanoreceptors of the hand in Brodmann's areas 3 and 1 of Macaca mulatta. Brain Res. 36(2):229-49. doi: 10.1016/0006-8993(72)90732-9. PMID: 4621596.
- Pálfi E. 2018. A tapintás korai feldolgozásában szerepet játszó neuronális hálózatok és gátló sejtek a főemlősök primer szomatoszenzoros kérgében. PhD Disszertáció, Semmelweis Egyetem, Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola, http://dx.doi.org/10.14753/SE.2019.2204
- Pearson RC, Powell TP. 1978. The cortico-cortical connections to area 5 of the parietal lobe from the primary somatic sensory cortex of the monkey. Proc R Soc Lond B Biol Sci. 200(1138):103-8. doi: 10.1098/rspb.1978.0008. PMID: 24219.
- Pei YC, Hsiao SS, Craig JC, Bensmaia SJ. 2010. Shape invariant coding of motion direction in somatosensory cortex. PLoS Biol. 8(2):e1000305. doi: 10.1371/journal.pbio.1000305. PMID: 20126380; PMCID: PMC2814823.
- Pei YC, Hsiao SS, Craig JC, Bensmaia SJ. 2011. Neural mechanisms of tactile motion integration in somatosensory cortex. Neuron. 69(3):536-47. doi: 10.1016/j.neuron.2010.12.033. PMID: 21315263; PMCID: PMC3052381.
- Pei YC, Denchev PV, Hsiao SS, Craig JC, Bensmaia SJ. 2009. Convergence of submodalityspecific input onto neurons in primary somatosensory cortex. J Neurophysiol. 102(3):1843-53. doi: 10.1152/jn.00235.2009. PMID: 19535484; PMCID: PMC2746774.
- Percudani R, Peracchi A. 2003. A genomic overview of pyridoxal-phosphate-dependent enzymes. EMBO Rep. 4(9):850-4. doi: 10.1038/sj.embor.embor914. PMID: 12949584; PMCID: PMC1326353.
- Perry A, Roberts G, Mitchell PB, Breakspear M. 2019. Connectomics of bipolar disorder: a critical review, and evidence for dynamic instabilities within interoceptive networks. Mol Psychiatry. 24(9):1296-1318. doi: 10.1038/s41380-018-0267-2. PMID: 30279458; PMCID: PMC6756092.
- Peters A, Palay SL, Webster H 1991. The fine structure of the nervous system: neurons and their supporting cells. Oxford University Press, New York
- Petrof I, Sherman SM. 2013. Functional significance of synaptic terminal size in glutamatergic sensory pathways in thalamus and cortex. J Physiol. 591(13):3125-31. doi: 10.1113/jphysiol.2012.247619. PMID: 23359668; PMCID: PMC3717215.
- Petrof I, Viaene AN, Sherman SM. 2015. Properties of the primary somatosensory cortex projection to the primary motor cortex in the mouse. J Neurophysiol. 113(7):2400-7. doi: 10.1152/jn.00949.2014. PMID: 25632081; PMCID: PMC4416606.
- Pierce JP, Lewin GR. 1994. An ultrastructural size principle. Neuroscience. 58(3):441-6. doi: 10.1016/0306-4522(94)90071-x. PMID: 8170532.
- Pons TP, Kaas JH. 1986. Corticocortical connections of area 2 of somatosensory cortex in macaque monkeys: a correlative anatomical and electrophysiological study. J Comp Neurol. 248(3):313-35. doi: 10.1002/cne.902480303. PMID: 3722460.
- Pons TP, Garraghty PE, Cusick CG, Kaas JH. 1985. The somatotopic organization of area 2 in macaque monkeys. J Comp Neurol. 241(4):445-66. doi: 10.1002/cne.902410405. PMID: 4078042.
- Qi HX, Chen LM, Kaas JH. 2011. Reorganization of somatosensory cortical areas 3b and 1 after unilateral section of dorsal columns of the spinal cord in squirrel monkeys. J Neurosci.

31(38):13662-75. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2366-11.2011. PMID: 21940457; PMCID: PMC3183096.

- Qi G, Yang D, Ding C, Feldmeyer D. 2020. Unveiling the Synaptic Function and Structure Using Paired Recordings From Synaptically Coupled Neurons. Front Synaptic Neurosci. 12:5. doi: 10.3389/fnsyn.2020.00005. PMID: 32116641; PMCID: PMC7026682.
- Radnikow G, Feldmeyer D. 2018. Layer- and Cell Type-Specific Modulation of Excitatory Neuronal Activity in the Neocortex. Front Neuroanat. 12:1. doi: 10.3389/fnana.2018.00001. PMID: 29440997; PMCID: PMC5797542.
- Rakic P. 2009. Evolution of the neocortex: a perspective from developmental biology. Nat Rev Neurosci. 10(10):724-35. doi: 10.1038/nrn2719. PMID: 19763105; PMCID: PMC2913577.
- Ramnani N, Owen AM. 2004. Anterior prefrontal cortex: insights into function from anatomy and neuroimaging. Nat Rev Neurosci. 5(3):184-94. doi: 10.1038/nrn1343. PMID: 14976518.
- Rasband WS 1997-2011. ImageJ. U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, http://imagej.nih.gov/ij/
- Rasch MJ, Chen M, Wu S, Lu HD, Roe AW. 2013. Quantitative inference of population response properties across eccentricity from motion-induced maps in macaque V1. J Neurophysiol. 109(5):1233-49. doi: 10.1152/jn.00673.2012. Epub 2012 Nov 28. PMID: 23197457; PMCID: PMC3602840.
- Ratzlaff EH, Grinvald A. 1991. A tandem-lens epifluorescence macroscope: hundred-fold brightness advantage for wide-field imaging. J Neurosci Methods. 36(2-3):127-37. doi: 10.1016/0165-0270(91)90038-2. PMID: 1905769.
- Redegeld FA, Caldwell CC, Sitkovsky MV. 1999. Ecto-protein kinases: ecto-domain phosphorylation as a novel target for pharmacological manipulation? Trends Pharmacol Sci. 20(11):453-9. doi: 10.1016/s0165-6147(99)01399-1. PMID: 10542445.
- Reed JL, Pouget P, Qi HX, Zhou Z, Bernard MR, Burish MJ, Haitas J, Bonds AB, Kaas JH. 2008. Widespread spatial integration in primary somatosensory cortex. Proc Natl Acad Sci U S A. 105(29):10233-7. doi: 10.1073/pnas.0803800105. PMID: 18632579; PMCID: PMC2481381.
- Reed JL, Pouget P, Qi HX, Zhou Z, Bernard MR, Burish MJ, Kaas JH. 2012. Effects of spatiotemporal stimulus properties on spike timing correlations in owl monkey primary somatosensory cortex. J Neurophysiol. 108(12):3353-69. doi: 10.1152/jn.00414.2011. PMID: 23019003; PMCID: PMC3544888.
- Reed JL, Qi HX, Pouget P, Burish MJ, Bonds AB, Kaas JH. 2010a. Modular processing in the hand representation of primate primary somatosensory cortex coexists with widespread activation. J Neurophysiol. 104(6):3136-45. doi: 10.1152/jn.00566.2010. PMID: 20926605; PMCID: PMC3007647.
- Reed JL, Qi HX, Zhou Z, Bernard MR, Burish MJ, Bonds AB, Kaas JH. 2010b. Response properties of neurons in primary somatosensory cortex of owl monkeys reflect widespread spatiotemporal integration. J Neurophysiol. 103(4):2139-57. doi: 10.1152/jn.00709.2009. PMID: 20164400; PMCID: PMC2853283.
- Redegeld FA, Caldwell CC, Sitkovsky MV. 1999. Ecto-protein kinases: ecto-domain phosphorylation as a novel target for pharmacological manipulation? Trends Pharmacol Sci. 20(11):453-9. doi: 10.1016/s0165-6147(99)01399-1. PMID: 10542445.
- Reimann MW, Gevaert M, Shi Y, Lu H, Markram H, Muller E. 2019. A null model of the mouse whole-neocortex micro-connectome. Nat Commun. 10(1):3903. doi: 10.1038/s41467-019-11630-x. PMID: 31467291; PMCID: PMC6715727.
- Reynaud A, Masson GS, Chavane F. 2012. Dynamics of local input normalization result from balanced short- and long-range intracortical interactions in area V1. J Neurosci. 32(36):12558-69. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1618-12.2012. PMID: 22956845; PMCID: PMC6621242.

- Riccio RV, Matthews MA. 1985. The effect of intraocular injection of tetrodotoxin on fast axonal transport of [3H]proline- and [3H]fucose-labeled materials in the developing rat optic nerve. Neuroscience. 16(4):1027-39. doi: 10.1016/0306-4522(85)90113-7. PMID: 2419784.
- Rizzolatti G, Luppino G. 2001. The cortical motor system. Neuron. 31(6):889-901. doi: 10.1016/s0896-6273(01)00423-8. PMID: 11580891.
- Robins E, Smith DE, Eydt KM, McCaman RE. 1956. The quantitative histochemistry of the cerebral cortex. II. Architectonic distribution of nine enzymes in the motor and visual cortices. J Neurochem. 1(1):68-76. doi: 10.1111/j.1471-4159.1956.tb12055.x. PMID: 13346375.
- Rockland KS. 2015. About connections. Front Neuroanat. 9:61. doi: 10.3389/fnana.2015.00061. PMID: 26042001; PMCID: PMC4438223.
- Rockland KS. 2019. What do we know about laminar connectivity? Neuroimage. 197:772-784. doi: 10.1016/j.neuroimage.2017.07.032. PMID: 28729159.
- Rockland KS, Knutson T. 2000. Feedback connections from area MT of the squirrel monkey to areas V1 and V2. J Comp Neurol. 425(3):345-68. PMID: 10972937.
- Rockland KS, Knutson T. 2001. Axon collaterals of Meynert cells diverge over large portions of area V1 in the macaque monkey. J Comp Neurol. 441(2):134-47. doi: 10.1002/cne.1402. PMID: 11745640.
- Rodriguez-Moreno J, Rollenhagen A, Arlandis J, Santuy A, Merchan-Pérez A, DeFelipe J, Lübke JHR, Clasca F. 2018. Quantitative 3D Ultrastructure of Thalamocortical Synapses from the "Lemniscal" Ventral Posteromedial Nucleus in Mouse Barrel Cortex. Cereb Cortex. 28(9):3159-3175. doi: 10.1093/cercor/bhx187. PMID: 28968773; PMCID: PMC6946031.
- Roe AW. 2019. Columnar connectome: toward a mathematics of brain function. Netw Neurosci. 3(3):779-791. doi: 10.1162/netn\_a\_00088. PMID: 31410379; PMCID: PMC6663318.
- Roe AW, Chelazzi L, Connor CE, Conway BR, Fujita I, Gallant JL, Lu H, Vanduffel W. 2012. Toward a unified theory of visual area V4. Neuron. 74(1):12-29. doi: 10.1016/j.neuron.2012.03.011. PMID: 22500626; PMCID: PMC4912377.
- Romo R, Rossi-Pool R. 2020. Turning Touch into Perception. Neuron. 105(1):16-33. doi: 10.1016/j.neuron.2019.11.033. PMID: 31917952.
- Rossi-Pool R, Zainos A, Alvarez M, Parra S, Zizumbo J, Romo R. 2021. Invariant timescale hierarchy across the cortical somatosensory network. Proc Natl Acad Sci U S A. 118(3):e2021843118. doi: 10.1073/pnas.2021843118. PMID: 33431695; PMCID: PMC7826380.
- Royo J, Forkel SJ, Pouget P, Thiebaut de Schotten M. 2021. The squirrel monkey model in clinical neuroscience. Neurosci Biobehav Rev. 128:152-164. doi: 10.1016/j.neubiorev.2021.06.006. PMID: 34118293.
- Rubinov M, Sporns O. 2010. Complex network measures of brain connectivity: uses and interpretations. Neuroimage. 52(3):1059-69. doi: 10.1016/j.neuroimage.2009.10.003. PMID: 19819337.
- Sadato N, Okada T, Honda M, Yonekura Y. 2002. Critical period for cross-modal plasticity in blind humans: a functional MRI study. Neuroimage. 16(2):389-400. doi: 10.1006/nimg.2002.1111. PMID: 12030824.
- Sadato N, Pascual-Leone A, Grafman J, Deiber MP, Ibañez V, Hallett M. 1998. Neural networks for Braille reading by the blind. Brain. 121 (Pt 7):1213-29. doi: 10.1093/brain/121.7.1213. PMID: 9679774.
- Saleeba C, Dempsey B, Le S, Goodchild A, McMullan S. 2019. A Student's Guide to Neural Circuit Tracing. Front Neurosci. 13:897. doi: 10.3389/fnins.2019.00897. PMID: 31507369; PMCID: PMC6718611.
- Salles JP. 2015. Clinical Forms and Animal Models of Hypophosphatasia. Subcell Biochem. 76:3-24. doi: 10.1007/978-94-017-7197-9\_1. PMID: 26219704. In Fonta C, Negyessy L.

(szerk.) 2015. Neuronal Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase (TNAP) Dordrecht, Hollandia: Springer Netherlands

- Sathian K. 2016. Analysis of haptic information in the cerebral cortex. J Neurophysiol. 116(4):1795-1806. doi: 10.1152/jn.00546.2015. PMID: 27440247; PMCID: PMC5144710.
- Sätzler K, Söhl LF, Bollmann JH, Borst JG, Frotscher M, Sakmann B, Lübke JH. 2002. Threedimensional reconstruction of a calyx of Held and its postsynaptic principal neuron in the medial nucleus of the trapezoid body. J Neurosci. 22(24):10567-79. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-24-10567.2002. PMID: 12486149; PMCID: PMC6758464.
- Scannell JW, Blakemore C, Young MP. 1995. Analysis of connectivity in the cat cerebral cortex. J Neurosci. 15(2):1463-83. doi: 10.1523/JNEUROSCI.15-02-01463.1995. PMID: 7869111; PMCID: PMC6577853.
- Schikorski T, Stevens CF. 1997. Quantitative ultrastructural analysis of hippocampal excitatory synapses. J Neurosci. 17(15):5858-67. doi: 10.1523/JNEUROSCI.17-15-05858.1997. PMID: 9221783; PMCID: PMC6573206.
- Schikorski T, Stevens CF. 1999. Quantitative fine-structural analysis of olfactory cortical synapses. Proc Natl Acad Sci U S A. 96(7):4107-12. doi: 10.1073/pnas.96.7.4107. PMID: 10097171; PMCID: PMC22428.
- Schwartz ML, Dekker JJ, Goldman-Rakic PS. 1991. Dual mode of corticothalamic synaptic termination in the mediodorsal nucleus of the rhesus monkey. J Comp Neurol. 309(3):289-304. doi: 10.1002/cne.903090302. PMID: 1918440.
- Scotti AL, Chatton JY, Reuter H. 1999. Roles of Na(+)-Ca2+ exchange and of mitochondria in the regulation of presynaptic Ca2+ and spontaneous glutamate release. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 354(1381):357-64. doi: 10.1098/rstb.1999.0387. PMID: 10212484; PMCID: PMC1692498.
- Sepulcre J. 2014. Functional streams and cortical integration in the human brain. Neuroscientist. 20(5):499-508. doi: 10.1177/1073858414531657. PMID: 24737695.
- Shanks MF, Pearson RC, Powell TP. 1985. The ipsilateral cortico-cortical connexions between the cytoarchitectonic subdivisions of the primary somatic sensory cortex in the monkey. Brain Res. 356(1):67-88. doi: 10.1016/0165-0173(85)90019-0. PMID: 3995355.
- Shanks MF, Powell TP. 1981. An electron microscopic study of the termination of thalamocortical fibres in areas 3b, 1 and 2 of the somatic sensory cortex in the monkey. Brain Res. 218(1-2):35-47. doi: 10.1016/0006-8993(81)90987-2. PMID: 6791763.
- Shaw CA, Lanius RA. 1992. Reversible kinase and phosphatase regulation of brain amino acid receptors in postnatal development. Brain Res Dev Brain Res. 70(2):153-61. doi: 10.1016/0165-3806(92)90193-z. PMID: 1335848.
- Shepherd, G. M. (szerk.). 2004. The synaptic organization of the brain (5th ed.). Oxford University Press. <u>https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780195159561.001.1</u>
- Sherman SM, Guillery RW. 1998. On the actions that one nerve cell can have on another: distinguishing "drivers" from "modulators". Proc Natl Acad Sci U S A. 95(12):7121-6. doi: 10.1073/pnas.95.12.7121. PMID: 9618549; PMCID: PMC22761.
- Shushruth S, Ichida JM, Levitt JB, Angelucci A. 2009. Comparison of spatial summation properties of neurons in macaque V1 and V2. J Neurophysiol. 102(4):2069-83. doi: 10.1152/jn.00512.2009. PMID: 19657084; PMCID: PMC2775374.
- Sigman M, Dehaene S. 2008. Brain mechanisms of serial and parallel processing during dualtask performance. J Neurosci. 28(30):7585-98. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0948-08.2008. PMID: 18650336; PMCID: PMC6670853.
- Silverstein BH, Bressler SL, Diwadkar VA. 2016. Inferring the Dysconnection Syndrome in Schizophrenia: Interpretational Considerations on Methods for the Network Analyses of fMRI Data. Front Psychiatry. 7:132. doi: 10.3389/fpsyt.2016.00132. PMID: 27536253; PMCID: PMC4971389.

- Sincich LC, Blasdel GG. 2001. Oriented axon projections in primary visual cortex of the monkey. J Neurosci. 21(12):4416-26. doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-12-04416.2001. PMID: 11404428; PMCID: PMC6762731.
- Sinclair RJ, Burton H. 1991. Neuronal activity in the primary somatosensory cortex in monkeys (Macaca mulatta) during active touch of textured surface gratings: responses to groove width, applied force, and velocity of motion. J Neurophysiol. 66(1):153-69. doi: 10.1152/jn.1991.66.1.153. PMID: 1919664.
- Sinning A, Hübner CA. 2013. Minireview: pH and synaptic transmission. FEBS Lett. 587(13):1923-8. doi: 10.1016/j.febslet.2013.04.045. PMID: 23669358.
- Siwek DF, Pandya DN. 1991. Prefrontal projections to the mediodorsal nucleus of the thalamus in the rhesus monkey. J Comp Neurol. 312(4):509-24. doi: 10.1002/cne.903120403. PMID: 1761739.
- Sommer MA, Wurtz RH. 2002. A pathway in primate brain for internal monitoring of movements. Science. 296(5572):1480-2. doi: 10.1126/science.1069590. PMID: 12029137.
- Sommer MA, Wurtz RH. 2004a. What the brain stem tells the frontal cortex. I. Oculomotor signals sent from superior colliculus to frontal eye field via mediodorsal thalamus. J Neurophysiol. 91(3):1381-402. doi: 10.1152/jn.00738.2003. PMID: 14573558.
- Sommer MA, Wurtz RH. 2004b. What the brain stem tells the frontal cortex. II. Role of the SC-MD-FEF pathway in corollary discharge. J Neurophysiol. 91(3):1403-23. doi: 10.1152/jn.00740.2003. PMID: 14573557.
- Somogyi P, Tamás G, Lujan R, Buhl EH. 1998. Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex. Brain Res Brain Res Rev. 26(2-3):113-35. doi: 10.1016/s0165-0173(97)00061-1. PMID: 9651498.
- Song S, Sjöström PJ, Reigl M, Nelson S, Chklovskii DB. 2005. Highly nonrandom features of synaptic connectivity in local cortical circuits. PLoS Biol. 3(3):e68. doi: 10.1371/journal.pbio.0030068. PMID: 15737062; PMCID: PMC1054880.
- Spatz WB, Illing RB, Weisenhorn DM. 1994. Distribution of cytochrome oxidase and parvalbumin in the primary visual cortex of the adult and neonate monkey, Callithrix jacchus. J Comp Neurol. 339(4):519-34. doi: 10.1002/cne.903390405. PMID: 8144744.
- Spence C. 2002. Multisensory attention and tactile information-processing. Behav Brain Res. 135(1-2):57-64. doi: 10.1016/s0166-4328(02)00155-9. PMID: 12356434.
- Spitmaan M, Seo H, Lee D, Soltani A. 2020. Multiple timescales of neural dynamics and integration of task-relevant signals across cortex. Proc Natl Acad Sci U S A. 117(36):22522-22531. doi: 10.1073/pnas.2005993117. PMID: 32839338; PMCID: PMC7486728.
- Sporns, O. 2002. Graph theory methods for the analysis of neural connectivity patterns. In: Kötter, R. (ed.) *Neuroscience Databases. A Practical Guide*. Klüwer, Boston, MA. pp. 171– 186.
- Sporns O. 2007. Brain connectivity. Scholarpedia, 2(10):4695. doi:10.4249/scholarpedia.4695
- Sporns O. 2010. Connectome. Scholarpedia, 5(2):5584. doi:10.4249/scholarpedia.5584
- Sporns O. 2013. Network attributes for segregation and integration in the human brain. Curr Opin Neurobiol. 23(2):162-71. doi: 10.1016/j.conb.2012.11.015. PMID: 23294553.
- Sporns O. 2018. Graph theory methods: applications in brain networks. Dialogues Clin Neurosci. 20(2):111-121. doi: 10.31887/DCNS.2018.20.2/osporns. PMID: 30250388; PMCID: PMC6136126.
- Sporns O, Chialvo DR, Kaiser M, Hilgetag CC. 2004. Organization, development and function of complex brain networks. Trends Cogn Sci. 8(9):418-25. doi: 10.1016/j.tics.2004.07.008. PMID: 15350243.
- Sporns O, Honey CJ, Kötter R. 2007. Identification and classification of hubs in brain networks. PLoS One. 2(10):e1049. doi: 10.1371/journal.pone.0001049. PMID: 17940613; PMCID: PMC2013941.

- Sporns O, Zwi JD. 2004. The small world of the cerebral cortex. Neuroinformatics. 2(2):145-62. doi: 10.1385/NI:2:2:145. PMID: 15319512.
- Sripati AP, Yoshioka T, Denchev P, Hsiao SS, Johnson KO. 2006. Spatiotemporal receptive fields of peripheral afferents and cortical area 3b and 1 neurons in the primate somatosensory system. J Neurosci. 26(7):2101-14. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3720-05.2006. PMID: 16481443; PMCID: PMC1839048.
- Staiger JF, Zilles K, Freund TF. 1996. Distribution of GABAergic elements postsynaptic to ventroposteromedial thalamic projections in layer IV of rat barrel cortex. Eur J Neurosci. 8(11):2273-85. doi: 10.1111/j.1460-9568.1996.tb01191.x. PMID: 8950092.
- Stephan KE, Kamper L, Bozkurt A, Burns GA, Young MP, Kötter R. 2001. Advanced database methodology for the Collation of Connectivity data on the Macaque brain (CoCoMac). Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 356(1412):1159-86. doi: 10.1098/rstb.2001.0908. PMID: 11545697; PMCID: PMC1088509.
- Street SE, Sowa NA. 2015. TNAP and Pain Control. Subcell Biochem. 76:283-305. doi: 10.1007/978-94-017-7197-9\_13. PMID: 26219716. In Fonta C, Negyessy L. (szerk.) 2015. Neuronal Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase (TNAP) Dordrecht, Hollandia: Springer Netherlands
- Stryker MP, Harris WA. 1986. Binocular impulse blockade prevents the formation of ocular dominance columns in cat visual cortex. J Neurosci. 6(8):2117-33. doi: 10.1523/JNEUROSCI.06-08-02117.1986. PMID: 3746403; PMCID: PMC6568765.
- Stuart, J.R., Norvig, P. 2002. Artificial Intelligence: A Modern Approach. 2nd Edn. Vol. 21. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, pp. 765–771.
- Sugimura K, Mizutani A. 1979. Histochemical and cytochemical studies of alkaline phosphatase activity in the synapses of rat brain. Histochemistry. 61(2):123-9. doi: 10.1007/BF00496524. PMID: 457450.
- Sur M, Garraghty PE, Bruce CJ. 1985. Somatosensory cortex in macaque monkeys: laminar differences in receptive field size in areas 3b and 1. Brain Res. 342(2):391-5. doi: 10.1016/0006-8993(85)91144-8. PMID: 4041845.
- Sur M, Merzenich MM, Kaas JH. 1980. Magnification, receptive-field area, and "hypercolumn" size in areas 3b and 1 of somatosensory cortex in owl monkeys. J Neurophysiol. 44(2):295-311. doi: 10.1152/jn.1980.44.2.295. PMID: 7411189.
- Sur M, Nelson RJ, Kaas JH. 1982. Representations of the body surface in cortical areas 3b and 1 of squirrel monkeys: comparisons with other primates. J Comp Neurol. 211(2):177-92. doi: 10.1002/cne.902110207. PMID: 7174889.
- Sur M, Wall JT, Kaas JH. 1981. Modular segregation of functional cell classes within the postcentral somatosensory cortex of monkeys. Science. 212(4498):1059-61. doi: 10.1126/science.7233199. PMID: 7233199.
- Sutton, R.S. Learning to predict by the methods of temporal differences. Mach Learn 3, 9–44 (1988). <u>https://doi.org/10.1007/BF00115009</u>
- Suzuki WA, Amaral DG. 1994. Perirhinal and parahippocampal cortices of the macaque monkey: cortical afferents. J Comp Neurol. 350(4):497-533. doi: 10.1002/cne.903500402. PMID: 7890828.
- Szentágothai J. 1975. The 'module-concept' in cerebral cortex architecture. Brain Res. 95(2-3):475-96. doi: 10.1016/0006-8993(75)90122-5. PMID: 808252.
- Tabot G. 2013. Somatosensory Cortex: Organization. In: Jaeger D., Jung R. (szerk) Encyclopedia of Computational Neuroscience. Springer, New York, NY. <u>https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7320-6\_385-1</u>
- Taketani T. 2015. Neurological Symptoms of Hypophosphatasia. Subcell Biochem. 76:309-22. doi: 10.1007/978-94-017-7197-9\_14. PMID: 26219717. In Fonta C, Negyessy L. (szerk.) 2015. Neuronal Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase (TNAP) Dordrecht, Hollandia: Springer Netherlands
- Taylor PN, Wang Y, Kaiser M. 2017. Within brain area tractography suggests local modularity using high resolution connectomics. Sci Rep. 7:39859. doi: 10.1038/srep39859. PMID: 28054634; PMCID: PMC5213837.
- Thakur PH, Fitzgerald PJ, Hsiao SS. 2012. Second-order receptive fields reveal multidigit interactions in area 3b of the macaque monkey. J Neurophysiol. 108(1):243-62. doi: 10.1152/jn.01022.2010. PMID: 22457468; PMCID: PMC3434610.
- Théoret H, Merabet L, Pascual-Leone A. 2004. Behavioral and neuroplastic changes in the blind: evidence for functionally relevant cross-modal interactions. J Physiol Paris. 98(1-3):221-33. doi: 10.1016/j.jphysparis.2004.03.009. PMID: 15477034.
- Toldi J. 2008. Representational plasticity in the mammalian brain cortex. (Review article). Acta Physiol Hung. 95(3):229-45. doi: 10.1556/APhysiol.95.2008.3.1. PMID: 18788464.
- Toldi J, Fehér O, Wolff JR. 1996. Neuronal plasticity induced by neonatal monocular (and binocular) enucleation. Prog Neurobiol. 48(3):191-218. doi: 10.1016/0301-0082(95)00038-0. PMID: 8735877.
- Tombu MN, Asplund CL, Dux PE, Godwin D, Martin JW, Marois R. 2011. A Unified attentional bottleneck in the human brain. Proc Natl Acad Sci U S A. 108(33):13426-31. doi: 10.1073/pnas.1103583108. PMID: 21825137; PMCID: PMC3158154.
- Tommerdahl M, Delemos KA, Vierck CJ Jr, Favorov OV, Whitsel BL. 1996. Anterior parietal cortical response to tactile and skin-heating stimuli applied to the same skin site. J Neurophysiol. 75(6):2662-70. doi: 10.1152/jn.1996.75.6.2662. PMID: 8793772.
- Tommerdahl M, Favorov O, Whitsel BL, Nakhle B, Gonchar YA. 1993. Minicolumnar activation patterns in cat and monkey SI cortex. Cereb Cortex. 3(5):399-411. doi: 10.1093/cercor/3.5.399. PMID: 8260808.
- Tononi G, Edelman GM, Sporns O. 1998. Complexity and coherency: integrating information in the brain. Trends Cogn Sci. 2(12):474-84. doi: 10.1016/s1364-6613(98)01259-5. PMID: 21227298.
- Tóth K. 2011. Zinc in neurotransmission. Annu Rev Nutr. 31:139-53. doi: 10.1146/annurevnutr-072610-145218. PMID: 21548772.
- Tremblay F, Ageranioti-Bélanger SA, Chapman CE. 1996. Cortical mechanisms underlying tactile discrimination in the monkey. I. Role of primary somatosensory cortex in passive texture discrimination. J Neurophysiol. 76(5):3382-403. doi: 10.1152/jn.1996.76.5.3382. PMID: 8930280.
- Ts'o DY, Gilbert CD. 1988. The organization of chromatic and spatial interactions in the primate striate cortex. J Neurosci. 8(5):1712-27. doi: 10.1523/JNEUROSCI.08-05-01712.1988. PMID: 3367218; PMCID: PMC6569215.
- Ts'o DY, Roe AW, Gilbert CD. 2001. A hierarchy of the functional organization for color, form and disparity in primate visual area V2. Vision Res. 41(10-11):1333-49. doi: 10.1016/s0042-6989(01)00076-1. PMID: 11322978.
- Tsodyks M, Pawelzik K, Markram H. 1998. Neural networks with dynamic synapses. Neural Comput. 10(4):821-35. doi: 10.1162/089976698300017502. PMID: 9573407.
- Van Dongen S (2008) Graph clustering via a discrete uncoupling process. SIAM J Matrix Anal Appl 30:121–141. <u>https://doi.org/10.1137/040608635</u>
- Vanni S, Hokkanen H, Werner F, Angelucci A. 2020. Anatomy and Physiology of Macaque Visual Cortical Areas V1, V2, and V5/MT: Bases for Biologically Realistic Models. Cereb Cortex. 30(6):3483-3517. doi: 10.1093/cercor/bhz322. PMID: 31897474; PMCID: PMC7233004.
- Varga B, Soós B, Jákli B, Bálint E, Somogyvári Z, Négyessy L. 2021. Network Path Convergence Shapes Low-Level Processing in the Visual Cortex. Front Syst Neurosci. 15:645709. doi: 10.3389/fnsys.2021.645709. PMID: 34108867; PMCID: PMC8181740.

- Vezoli J, Falchier A, Jouve B, Knoblauch K, Young M, Kennedy H. 2004. Quantitative analysis of connectivity in the visual cortex: extracting function from structure. Neuroscientist. 10(5):476-82. doi: 10.1177/1073858404268478. PMID: 15359013.
- Vezoli J, Magrou L, Goebel R, Wang XJ, Knoblauch K, Vinck M, Kennedy H. 2021. Cortical hierarchy, dual counterstream architecture and the importance of top-down generative networks. Neuroimage. 225:117479. doi: 10.1016/j.neuroimage.2020.117479. PMID: 33099005; PMCID: PMC8244994.
- Vincent JL, Patel GH, Fox MD, Snyder AZ, Baker JT, Van Essen DC, Zempel JM, Snyder LH, Corbetta M, Raichle ME. 2007. Intrinsic functional architecture in the anaesthetized monkey brain. Nature. 447(7140):83-6. doi: 10.1038/nature05758. PMID: 17476267.
- Vogt BA, Pandya DN. 1978. Cortico-cortical connections of somatic sensory cortex (areas 3, 1 and 2) in the rhesus monkey. J Comp Neurol. 177(2):179-91. doi: 10.1002/cne.901770202. PMID: 413844.
- Vos M, Lauwers E, Verstreken P. 2010. Synaptic mitochondria in synaptic transmission and organization of vesicle pools in health and disease. Front Synaptic Neurosci. 2:139. doi: 10.3389/fnsyn.2010.00139. PMID: 21423525; PMCID: PMC3059669.
- Wandell BA, Winawer J. 2015. Computational neuroimaging and population receptive fields. Trends Cogn Sci. 19(6):349-57. doi: 10.1016/j.tics.2015.03.009. PMID: 25850730; PMCID: PMC4484758.
- Wang XJ. 2020. Macroscopic gradients of synaptic excitation and inhibition in the neocortex. Nat Rev Neurosci. 21(3):169-178. doi: 10.1038/s41583-020-0262-x. PMID: 32029928; PMCID: PMC7334830.
- Wang J, Barbas H. 2018. Specificity of Primate Amygdalar Pathways to Hippocampus. J Neurosci. 38(47):10019-10041. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1267-18.2018. PMID: 30249799; PMCID: PMC6246880.
- Wang G, Tanaka K, Tanifuji M. 1996. Optical imaging of functional organization in the monkey inferotemporal cortex. Science. 272(5268):1665-8. doi: 10.1126/science.272.5268.1665. PMID: 8658144.
- Watts DJ, Strogatz SH. 1998. Collective dynamics of 'small-world' networks. Nature. 393(6684):440-2. doi: 10.1038/30918. PMID: 9623998.
- Waymire KG, Mahuren JD, Jaje JM, Guilarte TR, Coburn SP, MacGregor GR. 1995. Mice lacking tissue non-specific alkaline phosphatase die from seizures due to defective metabolism of vitamin B-6. Nat Genet. 11(1):45-51. doi: 10.1038/ng0995-45. PMID: 7550313.
- White EL. 2007. Reflections on the specificity of synaptic connections. Brain Res Rev. 55(2):422-9. doi: 10.1016/j.brainresrev.2006.12.004. PMID: 17258321.
- Wittenberg GF, Werhahn KJ, Wassermann EM, Herscovitch P, Cohen LG. 2004. Functional connectivity between somatosensory and visual cortex in early blind humans. Eur J Neurosci. 20(7):1923-7. doi: 10.1111/j.1460-9568.2004.03630.x. PMID: 15380014.
- Wong RW, Guillaud L. 2004. The role of epidermal growth factor and its receptors in mammalian CNS. Cytokine Growth Factor Rev. 15(2-3):147-56. doi: 10.1016/j.cytogfr.2004.01.004. PMID: 15110798.
- Wong-Riley MT. 1989. Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity. Trends Neurosci. 12(3):94-101. doi: 10.1016/0166-2236(89)90165-3. PMID: 2469224.
- Wood JN, Grafman J. 2003. Human prefrontal cortex: processing and representational perspectives. Nat Rev Neurosci. 4(2):139-47. doi: 10.1038/nrn1033. PMID: 12563285.
- Wurtz RH, Sommer MA. 2004. Identifying corollary discharges for movement in the primate brain. Prog Brain Res. 144:47-60. doi: 10.1016/S0079-6123(03)14403-2. PMID: 14650839.

- Xu NL. 2020. Deciphering Pyramidal Neuron Diversity: Delineating Perceptual Functions of Projection-Defined Neuronal Types. Neuron. 105(2):209-211. doi: 10.1016/j.neuron.2019.12.018. PMID: 31972143.
- Yakoubi R, Rollenhagen A, von Lehe M, Miller D, Walkenfort B, Hasenberg M, Sätzler K, Lübke JH. 2019a. Ultrastructural heterogeneity of layer 4 excitatory synaptic boutons in the adult human temporal lobe neocortex. Elife. 8:e48373. doi: 10.7554/eLife.48373. PMID: 31746736; PMCID: PMC6919978.
- Yakoubi R, Rollenhagen A, von Lehe M, Shao Y, Sätzler K, Lübke JHR. 2019b. Quantitative Three-Dimensional Reconstructions of Excitatory Synaptic Boutons in Layer 5 of the Adult Human Temporal Lobe Neocortex: A Fine-Scale Electron Microscopic Analysis. Cereb Cortex. 29(7):2797-2814. doi: 10.1093/cercor/bhy146. PMID: 29931200.
- Yan C, He Y. 2011. Driving and driven architectures of directed small-world human brain functional networks. PLoS One. 6(8):e23460. doi: 10.1371/journal.pone.0023460. PMID: 21858129; PMCID: PMC3155571.
- Yau JM, DeAngelis GC, Angelaki DE. 2015. Dissecting neural circuits for multisensory integration and crossmodal processing. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 370(1677):20140203. doi: 10.1098/rstb.2014.0203. PMID: 26240418; PMCID: PMC4528815.
- Yau JM, Kim SS, Thakur PH, Bensmaia SJ. 2016. Feeling form: the neural basis of haptic shape perception. J Neurophysiol. 115(2):631-42. doi: 10.1152/jn.00598.2015. PMID: 26581869; PMCID: PMC4752307.
- Young MP. 1992. Objective analysis of the topological organization of the primate cortical visual system. Nature. 358(6382):152-5. doi: 10.1038/358152a0. PMID: 1614547.
- Young MP. (szerk., tematikus szám) 2000. 'Brain structure function relationships: advances from neuroinformatics'. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 355(1393). https://royalsocietypublishing.org/toc/rstb1990/2000/355/1393
- Zador AM, Dobrunz LE. 1997. Dynamic synapses in the cortex. Neuron. 19(1):1-4. doi: 10.1016/s0896-6273(00)80341-4. PMID: 9247258.
- Zeki S, Shipp S. 1988. The functional logic of cortical connections. Nature. 335(6188):311-7. doi: 10.1038/335311a0. PMID: 3047584.
- Zeng H, Sanes JR. 2017. Neuronal cell-type classification: challenges, opportunities and the path forward. Nat Rev Neurosci. 18(9):530-546. doi: 10.1038/nrn.2017.85. PMID: 28775344.
- Zikopoulos B, Barbas H. 2007. Parallel driving and modulatory pathways link the prefrontal cortex and thalamus. PLoS One. 2(9):e848. doi: 10.1371/journal.pone.0000848. PMID: 17786219; PMCID: PMC1952177.
- Zimmermann H, Langer D. 2015. Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase in the Developing Brain and in Adult Neurogenesis. Subcell Biochem. 76:61-84. doi: 10.1007/978-94-017-7197-9\_4. PMID: 26219707. In Fonta C, Negyessy L. (szerk.) 2015. Neuronal Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase (TNAP) Dordrecht, Hollandia: Springer Netherlands
- Zisapel N, Haklai R. 1980. Localization of an alkaline phosphatase and other synaptic vesicle proteins. Neuroscience. 5(12):2297-303. doi: 10.1016/0306-4522(80)90145-1. PMID: 7465056.
- Zhu J, Shimizu E, Zhang X, Partridge NC, Qin L. 2012. EGFR signaling suppresses osteoblast differentiation and inhibits expression of master osteoblastic transcription factors Runx2 and Osterix. J Cell Biochem. 2011 Jul;112(7):1749-60. doi: 10.1002/jcb.23094. PMID: 21381079; PMCID: PMC3111753.
- Zylberberg A, Fernández Slezak D, Roelfsema PR, Dehaene S, Sigman M. 2010. The brain's router: a cortical network model of serial processing in the primate brain. PLoS Comput Biol. 6(4):e1000765. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000765. PMID: 20442869; PMCID: PMC2861701.