

Serkentés és gátlás a talamuszban

Doktori értekezés

Rovó Zita

Semmelweis Egyetem
Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Acsády László Ph.D, tudományos tanácsadó, az MTA Doktora

Hivatalos bírálók: Dr. Puskár Zita, egyetemi docens, Ph.D

Dr. Kisvárday Zoltán, egyetemi docens, Ph.D

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Halász Béla, egyetemi tanár, Ph.D

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Karmos György, egyetemi tanár, Ph.D

Dr. Dobolyi Árpád, egyetemi docens, Ph.D

Budapest
2014

TARTALOMJEGYZÉK

1. Rövidítések listája	4
2. Bevezetés	6
2.1. A talamusz szerveződése	6
2.2. A driver teória	9
2.3. A driver és modulátoros bemenetek összehasonlítása a talamuszban	10
2.4. A kortikális és a szubkortikális glutamáterg terminálisok elkülönítése . .	13
2.5. GABA _A erg gátlás a talamuszban	14
2.6. A GABA _A receptorok	19
2.6.1. A GABA _A erg gátlás formái	21
3. Célkitűzések	24
4. Anyagok és módszerek	25
4.1. Majom kísérletek módszerei	25
4.2. Az egér kísérletek módszerei	33
5. Eredmények	43
5.1. A driver bemenetek eloszlása a főemlősök talamuszában	43
5.1.1. vGLUT1 és vGLUT2, mint a kortikális és szubkortikális serkentő terminálisok markere	43
5.1.2. Óriás vGLUT2 tartalmú végződés a talamuszban	45
5.1.3. Óriás vGLUT1 tartalmú végződés a talamuszban	47
5.1.4. A kortikális és szubkortikális driverek konvergenciája	50
5.1.5. Drivermentes területek	53
5.1.6. Az RL-típusú végződés változatossága	53
5.1.7. Intralaminaris magok	56
5.1.8. A talamusz drivertérképe	59
5.1.9. A majom kísérletek eredményeinek összegzése	61

5.2.	Talamokortikális ritmusok szinaptikus GABA _A receptor-független szabályozása	63
5.2.1.	<i>In vivo</i> elvezetések GABA _A receptor $\gamma 2$ lokális hiányában	63
5.2.2.	A GABA _A receptor $\gamma 2$ alegység eltűnésének anatómiai és <i>in vitro</i> elektrofiziológiai bizonyítékai	69
5.2.3.	<i>In vitro</i> elektrofiziológiai mérések akut talamikus egér agyszelektéken a $\gamma 2$ alegység eltűnését bizonyítják	71
5.2.4.	A GABA _A tónusos áram mértéke kisebbnek bizonyult $\gamma 2^{-/-}$ relésejtekben, mint a kontroll sejtekben <i>in vitro</i>	74
5.2.5.	Burst IPSC a $\gamma 2^{-/-}$ relésejtekben is mérhető <i>in vitro</i>	75
5.2.6.	A GABA _A $\gamma 2$ floxolt egér kísérleteinek összegzése	81
6.	Megbeszélés	82
6.1.	A főemlős talamusz drivereinek nyomában	82
6.1.1.	Valódi szubkortikális irányítás	84
6.1.2.	Valódi kortikális irányítás	84
6.1.3.	Konvergáló driver bemenetek	85
6.1.4.	Driver bemenetek hiányában	85
6.1.5.	Lehet-e GABAerg bemenet „driver” a talamuszban?	86
6.1.6.	A driver terminálisok méretbeli inhomogenitása	87
6.2.	Mihez (nem) kell egy szinaptikus GABA _A receptoralegység?	89
6.2.1.	Az alkalmazott módszer előnyei	89
6.2.2.	Eltérő tüzelési mód különböző gátlási móddal párosul	90
6.2.3.	Az epilepszia hiánya a vírusfertőzött állatokban	91
6.2.4.	A vírusfertőzött relésejtek is burstölnek altatás során - ugyan kicsit másképp	92
6.2.5.	Fennmarad az orsó, de lelassul	94
6.2.6.	A relésejtek ingerelhetősége (feltehetőleg) nő	95
6.2.7.	A burst IPSC-k eredetének nyomában	96
6.2.8.	Limitációk	97
7.	Következtetések	98

8. Összefoglalás	99
9. Summary	100
10. Irodalomjegyzék	101
11. Saját publikációk	119
12. Köszönetnyilvánítás	120

1. RÖVIDÍTÉSEK LISTÁJA

AAV	adeno-asszociált vírus
AAV-GFP	GFP-t expresszáló adeno-asszociált vírus
AAV-Cre	Cre rekombinázt expresszáló adeno-asszociáltvírus
APT	anterior pretectum
AV	anteroventral nucleus
BDA	biotinilált dextransz amin
BNPI	brain-specific Na ⁺ -dependent inorganic phosphate transporter I
bsc	brachium a superior colliculushoz
CaV3.2	T-típusú Ca ₂ ⁺ csatorna 3.2
CB	calbindin
CL	centrolateral nucleus, intralamináris magok
CM-Pf	centromedian nucleus, parafascicular nucleus
d	dendrit
DAB	3,3'-diaminobenzidin
DABNi	nikkel-intenzifikált 3,3'-diaminobenzidin
D,L-APV	(2R)-amino-5-foszfo-pentánsav
DNPI	„differentiation-associated” BMPI
DNQX	6,7-dinitroquinoxalin-2,3-dion
dLGN	dorsal lateral geniculate nucleus
EEG	electroencephalogram
EPSC	excitatory postsynaptic current
EPSP	excitatory postsynaptic potential
f	fasciculus retroflexus
F1, F2	„flatten vesicles” terminális típus
GABA	γ-amino vajsav
HCN	hiperpolarizáció aktiválta nem-szelektív kation csatorna
Hb	habenula
IPSC	inhibitory postsynaptic current
LD	laterodorsal nucleus
LFP	local field potential
LGN	lateral geniculate nucleus
M1	elsődleges motoros kéreg
MD, MD(mc)	mediodorsal nucleus, magnocellularis régió
MGN	medial geniculate nucleus
mt	mammillotalamikus köteg
NREM	non-rapid eye movement alvás
nRT	nucleus reticularis thalami
PnO	nucleus pontis oralis
Po	posterior nucleus
Pul, APul, IPul, LPul, Mpul	anterior, inferior, lateral, medial pulvinar
REM	rapid eye movement alvás
RL	„rounded vesicles large size” terminális típus
RS	„rounded vesicles small size” terminális típus
S1	primer szenzoros kéreg

STORM	stochastic optical reconstruction microscopy
VAM (nigr)	mediális ventral anterior nucleus nigrorecipiens terület
VAL (pal)	laterális ventral anterior nucleus, pallidorecipiens terület
VL (cb)	ventrolateral nucleus, cerebellorecipiens terület
VB	ventrobasal nucleus
vGAT	vezikuláris GABA transzporter
vGLUT1	vezikuláris glutamát transzporter 1
vGLUT2	vezikuláris glutamát transzporter 2
VPI	ventral posteroinferior nucleus
VPL	ventral posterolateral nucleus
VPM	ventral posteromedial nucleus
ZI	zona incerta

*What we observe is not nature itself,
but nature exposed to our method of questioning.*

— Werner Heisenberg, 1958

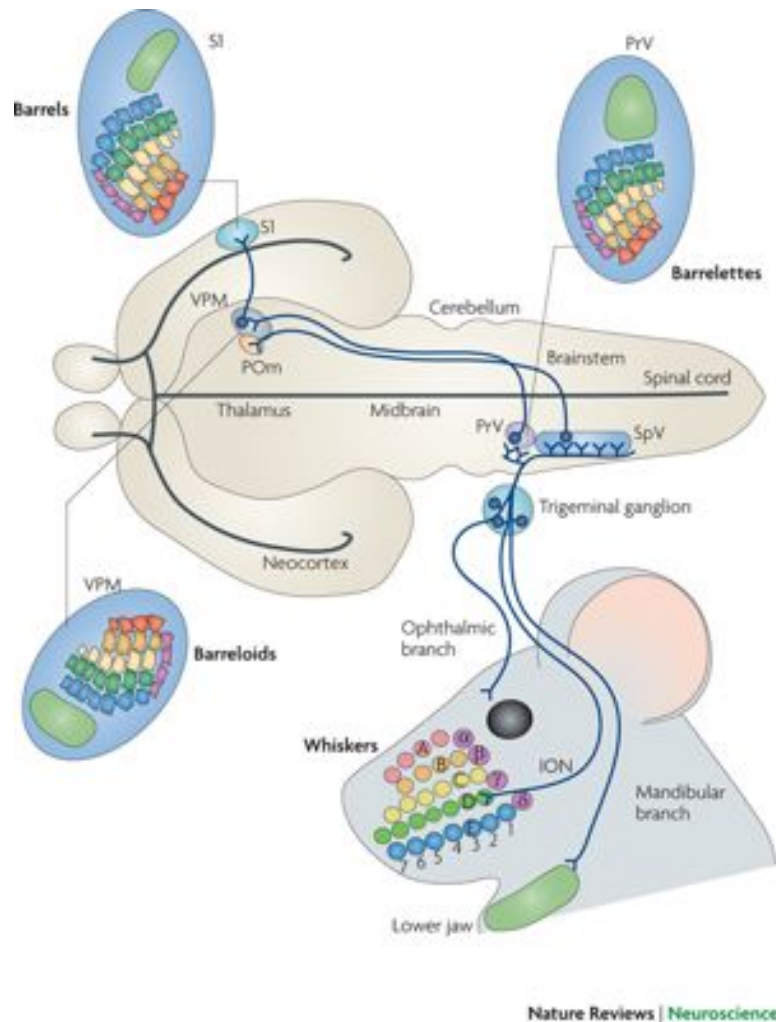
2. BEVEZETÉS

A talamokortikális információáramlás esszenciális szereppel bír a kortikális funkciók megőrzésében: éppen ezért a talamusz működésének tanulmányozása elengedhetetlen az agykérgi mechanizmusok megértéséhez. PhD munkám során a talamusz alapvető szerveződési elvét, illetve működési mechanizmusát vettem górcső alá két modell állaton: a „driver teória” alapjául szolgáló serkentő óriásterminálisok eloszlását a makákók talamuszában térképeztem fel, míg a szinaptikus gátlás szerepét a talamokortikális ritmusokban egy transzgén egértörzsön vizsgáltam.

2.1. A talamusz szerveződése

A talamusz a legfőbb reléállomás az agyban, kapuként funkcionál a külvilág és az agy belső környezete között. Szinte minden információ, amit a külvilágról tudunk, a talamuszon keresztül jut a tudatunkra. Pontosabban, egyedül a szaglási modalitás nem jut el közvetlenül a talamuszba, minden más külvilági inger először itt kapcsol át. A talamusz viszonylag kis méretű struktúra az agy közepén. Területe számos sejtcsoportra vagy „magra” felosztható, attól függően, hogy milyen eredetű jel továbbítását végzik a relé-sejtjei (vizuális, auditoros, szomatoszenzoros, kisagyi, stb.) a megfelelő kérgi régiók felé. A talamusz működése szorosan összefügg a kéreg legnagyobb hánydát kitevő neokortex működésével. A talamuszon belül a szenzoros modalitásért felelős pályák rendezetten haladnak a célterületük felé. Például a rágcsáló talamusz ventral posteromedial magjába (VPM) érkező primer afferensek minden egyes bajuszról külön-külön információt hordoznak, ezáltal a bajszok által letapogatott környezet leképződik a talamikus barreloidok szintjén (1. ábra).

A látótalamuszban is szabályosan rendeződnek a retinális ganglionsejtekkel kapcsolatban álló relésejtek. Ebben az esetben a retina felől érkező primer afferensek a talamusz dorsal lateral geniculate magjába (dLGN) érkeznak, ahol vizuális környezetről alkotnak térképet. Minden egyes VPM és dLGN relésejt axonjával az agykéreg primer szenzoros



1. ábra. A trigeminális ganglion ophthalmikus-, maxilláris- és mandibuláris ágai szállítják az arc szomatoszenzoros ingereit az agytörzsi trigeminális mag felé. A vetülés topografikus, így pontosan megőrződik az ingerek lokalizációja. A bajusz-specifikus mintázat felfedezhető mind az agytörzsben (barrelettes), mind a thalamuszban (barreloids), mind az agykéregben (barrels). A trigemintalamikus axonok az ellenoldali ventral posteromedial (VPM) magba vetítenek, ahonnan a szomatoszenzoros információ az primer szomatoszenzoros barrel kéregbe (S1) jut (Erzurumlu és mtsai., 2010)

területeire vetít, továbbítva a bajuszszőrök és a retina állapotáról hordozott információt.

Habár a relésejtek specifikus szenzoros információk pontos továbbításáért felelősek, valamilyen szinten minden relésejtre jellemző a jelfeldolgozás. Erre a legkézenfekvőbb bizonyíték az, hogy a sejtekre érkező primer szenzoros bemenetek mindössze 5–10%-át szolgáltatják a relésejteken található szinapszisoknak. A szinapszisok fennmaradó 90–95%-a más területekről, az agykéregből, az agytörzsből, helyi interneuronokból, illetve a nucleus reticularis thalami-ból (nRT) érkezik (Sherman, 2001a). A szinapszisok ereje és elhelyezkedése azonban a talamuszban olyan, hogy a sejtek receptív mezejének tulajdonságait mégis a kevés primer szenzoros afferens határozza meg, mintsem a többi bemenet. A talamuszba érkező bemenetek jelentős hányada olyan agyterületről érkezik, ami az ébresztésért, figyelemért felelős. Ezért minden valószínűség szerint a talamusz a ráérkező primer szenzoros információkat a figyelmi jelek függvényében, az élőlény aktuális viselkedési állapotának megfelelően modulálva továbbítja az agykéreg felé. Ez alapján kijelenthetjük, hogy a talamuszon átfolyó jeláradat szűrésének a képessége elengedhetetlen a talamusz működése szempontjából, és a szűrés paraméterek plasztikus változtathatósága fiziológias jelentőséggel bír (Castro-Alamancos, Calcagnotto, 2001).

Stratégiailag fontos szerepet töltenek be az nRT sejtjei a dorzális talamusz működésében, ugyanis mind a rajtuk keresztül haladó kortikotalamikus, mind a talamokortikális idegsejtek axonkollaterálisai révén serkentő beidegzésben részesülnek. Ezzel szemben, – és a dorzális talamusztól előően – az nRT nem vetít a kéregbe, csupán a talamikus relésejteknek nyújt gátló bemenetet.

Funkcióját tekintve a dorzális talamusz¹ primer szenzoros, motoros és asszociatív területekre osztható. Az, hogy ezek a magok milyen arányban képviseltetik magukat a talamuszban, az nagyban függ az állatfaj által használt szenzoros információktól, illetve az állatfaj fejlettségétől.

A talamuszban nem teljesen egyértelműek a különböző modalitásért felelős részek határai. A felosztást bonyolítja, hogy egyes magasabb rendű funkcióval rendelkező (ún. asszociációs) sejtek a primer relésejtek között húzódnak meg. Ezt a tagoltságot figyelembe véve alkotta meg Edward Jones a „mátrix és core” elméletét (Jones, 1998). Munkájához a calbindin immunfestést vette alapul, kijelentve, hogy az erősen calbindin po-

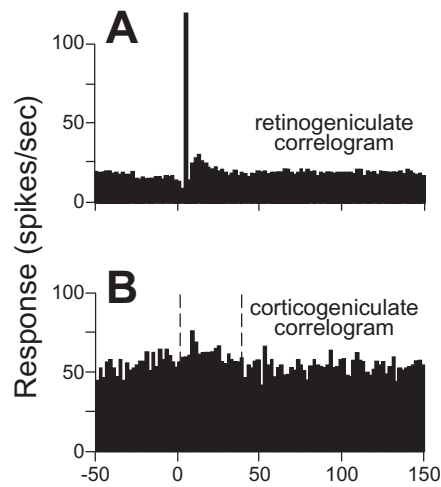
¹továbbiakban talamuszként utalok a dorzális talamuszra, míg a ventrális talamuszból eredő nRT-ra nRT-ként

zítív sejtek magasabbrendű funkcióval rendelkeznek, és mintegy magként beágyazódnak a primer (parvalbumin-pozitív) relésejtek mátrixába. Megfigyelte, hogy a parvalbumin-tartalmú és a calbindin-tartalmú sejtek axon-arborizációjában is jelentős különbségek vannak, míg az előbbire inkább a gócos kortikális vetülés jellemző, az utóbbi típusú sejtek axonjai a cortex nagyobb területét hálózják be (Jones, 1998). Elmélete szerint az asszociációs magokban, mint amilyen az intralamináris magcsoport, a calbindin-pozitív relésejtek száma magas, míg a szenzoros információk hű továbbításáért felelős magokban, mint az LGN, alacsony.

2.2. A driver teória

Sherman és Guillery nevéhez köthető a driver teória megalkotása, melyet elsősorban a talamusz működését megfigyelve dolgoztak ki (Sherman, Guillery, 1998, 2006). Elméletük szerint az idegsejtek aktivitását nem lehet egyértelműen kiszámolni a szinapszizáknak száma alapján. A driver teória megkülönböztet a sejt tüzelését irányító, illetve azt csak módosítani tudó ingereket. A bemenet természete kulcsfontosságú a posztszinaptikus sejt receptív mezejének kialakításában. A posztszinaptikus relésejt a preszinaptikus sejttel megegyező receptív mezővel rendelkezik akkor, ha a preszinaptikus sejt afferensei „irányítják” a relésejtet, azaz driverek. Minden más afferenst, mely nem képes a posztszinaptikus sejt tüzelését egyértelműen meghatározni, modulátoros bemenetnek tekintjük.

A talamusz jellemző tulajdonsága, hogy a relésejtek a bemenő driver ingert szolgáltató idegsejtekkel időben pontosan összehangolva, fix latenciával tüzelnek. Két sejt akciós potenciáljainak időbeni kapcsoltságát grafikusan keresztkorrelációval lehet bemutatni. A retinális driver bemenetek és az LGN sejtek tüzeléséből kirajzolódó keresztkorrelációra alacsony alap aktivitás, néhány ms latencia és keskeny éles csúcs jellemző (2. ábra A). Mindezt megmagyarázza, hogy a driverek által kiváltott EPSP-k rövidek, így csak gyorsabb preszinaptikus aktivitás esetén mosódnak össze, illetve hogy az EPSP-k latenciájának kicsi a varianciája. Ezzel szemben a modulátoros bemenetekre sokkal szélesebb EPSP-k jellemzőek, mely esetben az időbeni összegződés már lassabb tüzelés esetén is számottevő (2. ábra B). Ez alapján a keresztkorreláció nyújtja az egyik legjobb kritériumot a driverek és modulátorok megkülönböztetésére, melyet alkalmazni lehet(ne) receptív mezővel nem rendelkező talamikus régiókban is. Azonban technikailag igen nagy



2. ábra. Keresztkorrelációk a driverek és modulátorok közötti különbségek szemléltetésére. Macskából végzett elvezetések. A keresztkorrelációk a posztszinaptikus sejt tüzelését szemléltetik a preszinaptikus sejt tüzeléséhez képest. A) Retino-genikuláris keresztkorreláció spontán tüzelés esetén. A keresztkorrelációra kis latenciájú éles csúcs jellemző. B) Hatodik rétegi piramissejt és LGN sejt keresztkorrelációja spontán tüzelés során. A szaggatott vonalak között egy elhúzódó, graduális alacsony csúcs vehető ki. Skála: idő/ms (Sherman , Guillery, 2006)

kihívást jelent ilyen sejt párokat találni, éppen ezért az irodalom sem bővelkedik a primer szenzoros területeken kívül végzett kísérletekben.

Nem minden relé sejt rendelkezik azonban jól körülírható receptív mezővel, azaz számos esetben nem egyértelmű, hogy a relé sejt milyen perifériás receptorokkal áll kapcsolatban. Ahol ez nem ismert, ott érdemes más kritériumokat találni a driver bemenetek elkülönítésére. Az alábbiakban összefoglalom, milyen további anatómiai és fiziológiai kritériumokat állított fel Sherman és Guillery, ami alapján el lehet különíteni a driver bemeneteket a modulátoros bemenetektől, elsősorban a talamuszban.

2.3. A driver és modulátoros bemenetek összehasonlítása a talamuszban

Anatómiailag a driver bemenetek nagy axonátmérővel, sűrű axonarborizációval és nagy átmérőjű célelemmel rendelkeznek. A talamuszba történő biztos információátvitelhez ugyanis az afferens rostokon óriásterminálisok alakultak ki, melyek több szinapszist tartalmazva elsősorban a proximális dendritszakaszokon, a dendritek szőlőfürtszerű kiterjedéseiben, illetve ritkábban, a szómán szinaptizálnak. Elektronmikroszkópos sajátság-

gaik alapján ezt a terminális típust RL néven nevezzük (R round, illetve L large). További anatómiai kritérium, hogy a driverek nem küldenek kollaterálisokat az nRT-ba.

A driverekkel ellentétben a modulátoros bemenetek kicsik, egy szinapszist tartalmaznak, kis axonátmérővel és inkább kis átmérőjű, disztális célelemmel rendelkeznek (Sherman, Guillery, 1998). Modulátoros bemenetek a talamuszban a reciprok innervációnak megfelelő hatodik rétegi piramissejtekből érkező kortikotalamikus pályák, melyek topografikusan futnak, az agytörzs felől érkező szerotonerg, kolinerg, noradrenerg, dopaminerg rostok, illetve Sherman és Guillery modulátoros végződés közé sorolja az nRT gátló végződéseit is (Westlund és mtsai., 1991; García-Cabezas és mtsai., 2009; Sherman, Guillery, 1998, 2006). A modulátoros serkentő terminális típus képviseli az RS kategóriát (R, round, azaz kerek vezikulák, S, small kis méretű idegvégződés).

A modulátoros bemenetek jellemzően egymással nagy átfedésekben idegzik be a célsejtjeiket. A moduláló ingerek számos különböző forrásból származnak, melyek együttesen hatva alakítják ki finoman hangolható hatásukat. Ezzel szemben a driver bemenetek sokkal inkább párhuzamos pályákon haladnak, célsejtjeiket sűrűn, kompakt módon beidegezve (Dhande és mtsai., 2011), egymással nem konvergálva (Sincich és mtsai., 2007). Ezt jól illusztrálja a látópályában az a tény, hogy hozzávetőlegesen megegyező számú retinális ganglion sejt van (1,5 - 1,8 millió), mint ahány LGN sejt (1,4 - 1,8 millió) (Spear és mtsai., 1996; Blasco és mtsai., 1999).

Habár az anatómiai tulajdonságok alapján jól azonosíthatóak a driver bemenetek, további fiziológiai tulajdonságokat is érdemes figyelembe venni a kategorizálásukhoz. Négy fő fiziológiai kritérium alapján lehet a drivereket jellemezni. Először is, a (szenzoros) talamuszban csak glutamáterg bemenet lehet driver, mivel felnőtt idegrendszerben közvetlenül csak a serkentő neurotranszmitterek alkalmasak akciós potenciál kiváltására a posztszinaptikus sejtéből. Másodsorban, a transzmittereknek elsősorban ionotróp receptorokon keresztül kell hatniuk, hogy a membránpotenciál-változások elegendően precízek és gyorsak legyenek. Ezzel szemben, a modulátoros bemenetekre jellemző metabotróp receptorokon keresztül ható konduktanciák néhány századmásodpercig is eltartanak, ami nem összeegyeztethető az időben nagyon pontos információ-közvetítéssel, ellenben a szinaptikus plaszticitáshoz hozzájárulnak (Lüscher, Huber, 2010). A talamuszban mind a driver, mind a modulátoros bemenetek posztszinaptikus denzitása tartalmaz ionotróp és

metabotróp receptorokat is, de a modulátoros bemenetek által képzett szinapszisokban az NMDA receptorok száma duplája, mint a driver terminálisok szinapszisaiban (Tarusawa és mtsai., 2009). A driver terminálisok esetén az arányaiban több ionotróp receptor jelenléte kedvez a nagy frekvenciával érkező tüzelés egy-egy arányú közvetítésének, ugyanis a bemenetek időbeni összegződése csak magasabb frekvenciáknál történik meg a csatornák gyors kinetikája miatt (Sherman, Guillery, 2006), habár a driverek AMPA receptorai hamar deszenzitálódnak a magas koncentrációjú transzmitter jelenlétében (Budisantoso és mtsai., 2012). Harmadszor, a driverek közvetítette szinaptikus ingereknek elegendően nagyok kell lenniük ahhoz, hogy a posztzinaptikus sejtől megbízható módon tüzelést váltsanak ki. A talamuszban a driverek anatómiai sajátosságai lehetővé teszik, hogy a driver terminálisok aktivitása révén keletkező posztzinaptikus potenciálok sokkal nagyobbak legyenek, mint a modulátoros bemenetek által keltett potenciálok (Budisantoso és mtsai., 2012). Ezen felül a driverekre jellemző a multi-vezikuláris ürülés, sőt, a transzmitter diffúzióját a terminálist körbevevő glia burok is hátráltatja (Budisantoso és mtsai., 2012). Negyedszer, a driver bemenetekre jellemző, hogy depresszálnak, azaz sorozatos ingerlés során a második és az azt követő posztzinaptikus áramok az első áram töredékei. Mindez jól levezethető a driverek fentebb felsorolt anatómiai és fiziológiai tulajdonságaiból (Turner, Salt, 1998), ugyanis a depresszáló inger arra utal, hogy már első szinaptikus esemény során nagy a vezikulaürülés valószínűsége. És valóban, a látótalamuszban a driver terminálisoknak nagy a vezikulák „ürülési valószínűsége” (release probability, Pr), mely a patkányok retinális bemenetei esetén 0,7 körüli érték (Budisantoso és mtsai., 2012), míg a modulátoros bemenetek esetén ez sokkal kisebb érték (Turner, Salt, 1998).

Tehát végső soron pont a driverek struktúrája nem kedvez a nagy frekvenciával érkező bejövő ingerek megbízható továbbításának, mint ahogy arra Budisantoso és munkatársai felhívják a figyelmet (Budisantoso és mtsai., 2012). Ennek ellenére az ingerek hű továbbítása megtörténik *in vivo* (Sincich és mtsai., 2007), ami feltehetőleg a jelátvitel finom hangolásának köszönhető.

Amennyiben a működést meghatározó driver bemenetek a perifériáról vagy kéreg alatti struktúrákból érkeznek, a talamikus régiót elsőrendűnek tekintjük. A talamusz fennmaradó részeiben a relésejtek irányítását kérgi eredetű bemenetek vették át. A primer kérgi területek ötödik rétegi piramissejtjei ugyanis a perifériáról érkező driver afferensek-

kel megegyező tulajdonságú nagy átmérőjű axonvégzódésekkel képeznek szinapszisokat egyes relésejtek proximális dendritjein, így mintegy reléállomást képeznek két kortikális terület között. Ilyen talamikus régió a számos modalitással kapcsolatba hozható pulvinar. Mivel a talamusztól magasabb rendű struktúra szolgáltatja a driver bemenetet, így ezeket a talamusz területeket magasabbrendű régióknak nevezzük. Ez alapján az elsőrendű relék szubkortikális üzeneteket továbbítanak a kéreg felé, míg a magasabbrendű relék transztalamikus információtovábbítást tesznek lehetővé két agykérgi terület között.

S. Murray Sherman és R. W. Guillery saját és az irodalomban fellelhető pályakövető vizsgálatok eredménye alapján felvázolt egy lehetséges talamusztérképet, melyen az elsőrendű és magasabbrendű relék hozzávetőlegesen fele-fele arányban képviseltetik magukat. Úgy döntöttünk, az általuk felvázolt koncepciót érdemes alaposabban megvizsgálni és utánajárni a driver bemenetek tényleges eloszlásának. Kérdéses, hogy ténylegesen felosztható-e a talamusz egyértelműen az óriásterminálisok eredete alapján elsőrendű és magasabbrendű területekre? Mekkora részét teszi ki a talamusznak a kortikális és mekkora részét a szubkortikális irányítás alatt álló terület? Létezik-e konvergens terület, illetve olyan régió ahova nem érkezik driver bemenet? Amennyiben létezik driver mentes zóna, ott mi helyettesítheti a drivereket? Összefoglalva, homogén-e a talamikus szinaptikus organizáció vagy pedig jelentős magspecifikus különbségek vannak?

2.4. A kortikális és a szubkortikális glutamáterg terminálisok elkülönítése

Ahhoz, hogy egy agyi régióban a glutamáterg bemeneteket szubkortikális, illetve kortikális eredetük alapján immunhisztokémiai módszerrel elkülönítsük, szükséges, hogy találjunk két olyan fehérjét, ami egyértelműen csak a kortikális, illetve csak a szubkortikális végzódésekben találhatóak meg.

A glutamát az emlős központi idegrendszer legfőbb serkentő neurotranszmittere. Preszinaptikusan excitózissal ürülő szinaptikus vezikulákban tárolódik. A szinaptikus vezikulákba vezikuláris transzporter segítségével kerül. Két fő vezikuláris glutamát transzporter típust különíthetünk el a központi idegrendszerben (vGLUT1 és vGLUT2)². A korábban felfedezett, eredetileg inorganikus foszfát felvételben betöltött szerepe alap-

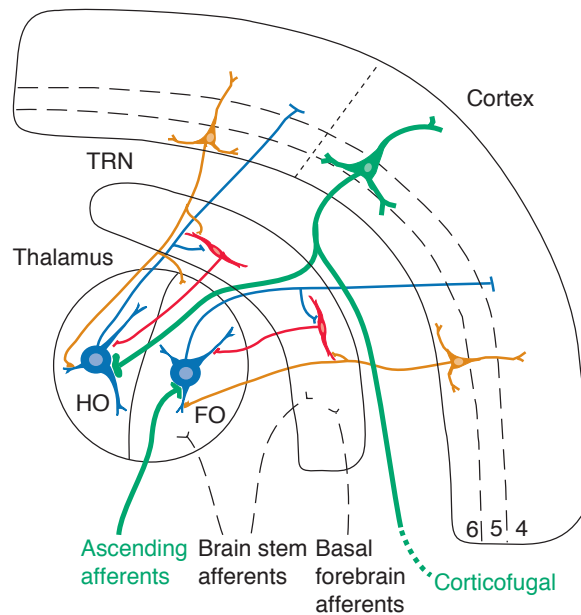
²A vGLUT3 csak specifikus agyi területeken képviselteti magát, érdekes módon a striatális kolinerg és a raphe szerotonerg idegvégzódéseivel is kolokalizáltan (Gras , Herzog, 2002)

ján azonosított fehérjéről (BNPI – brain-specific Na⁺-dependent inorganic phosphate transporter I) hamar kiderült, hogy fiziológias körülmények között a szinaptikus vezikulák glutamát felvételét serkenti (Ni és mtsai., 1994; Bellocchio és mtsai., 1998). Így a molekulát átnevezték a ma is használatos vGLUT1-re. Az eredmények azonban azt mutatták, hogy csak a glutamáterg neuronok szubpopulációjában fejeződik ki az említett transzporter (Bellocchio és mtsai., 1998). Később azonosítottak a BNPI/vGLUT1 fehérjével homológ, azonos funkcionális tulajdonságokkal rendelkező transzportert, mely először a DNPI („differentiation-associated” BNPI), majd a vGLUT2 nevet kapta (Aihara és mtsai., 2000; Herzog és mtsai., 2001). Northern blot és *in situ* hibridizációs technikák segítségével kimutatták, hogy a vGLUT2 mRNS-e azokban az agyi régiókban (és csak azokban) fejeződik ki, ahol vGLUT1 mRNS nem expresszálódik (Herzog és mtsai., 2001). Nevezetesen az agykéreg, a kisagykéreg, a hippocampus, a szaglógumó, a mediális habenula, a pontine nucleus neuronjai vGLUT1-et, míg a diencephalikus és rhombencephalikus struktúrák (talamusz, hypothalamus, inferior és superior colliculus, mély kisagyi magok, substantia nigra, agytörzsi neuronok) és a gerincvelő idegsejtjei vGLUT2-t expresszálnak. Habár funkcionális különbséget a két típusú transzporter között még nem találtak, feltételezhető a fehérje C-terminálisának különbözőségéből fakadó eltérő szubsztrátspecifitás.

PhD munkám első felében az immuncitokémiai vizsgálatokhoz a vGLUT1 és a vGLUT2 vezikuláris transzportert használtam, mint markert a különböző eredetű terminálisok azonosítására (lásd Eredmények első fejezete).

2.5. GABAerg gátlás a talamuszban

A talamuszba alapvetően három forrásból érkezik gátló bemenet. Először is, az elsődleges gátlást az nRT jelenti a talamuszban. Az nRT gátló sejtjei az egyedfejlődés során a ventrális talamuszból alakulnak ki, majd dorzális irányba vándorolva hagymahéj szerűen körbeölelik a dorzális talamusz anterior és laterális részeit (Jones, 1975). Az nRT-nak kulcsfontosságú szerep jut a talamokortikális, illetve a kortikotalamikus jelfeldolgozásban, ugyanis elhelyezkedéséből adódóan (az capsula interna és a lamina medullaris lateralis között található) mind a talamokortikális és kortikotalamikus rostok kollaterálisáiból maga is részesül (3. ábra).



3. ábra. A talamokortikális kör legfőbb sejtjei és összeköttetés-rendszere. Az ábra az elsőrendű (FO) és magasabbrendű (HO) relésejtek (kékekkel jelölve) szinaptikus kapcsolatait mutatja az nRT (piros sejtek) és a kérgi hatodik rétegi (narancssárga sejtek), illetve ötödik rétegi (zöld sejt) piramissejtek között. Mind a hatodik rétegi piramissejtek, mind a talamokortikális relésejtek adnak kollaterálisokat az nRT-ba, viszont az ötödik rétegi piramissejtek nem. A relésejtek egymással nem állnak közvetlen szinaptikus kapcsolatban. Az ábra R. W. Guillery 1998-as review-jából származik. (Guillery és mtsai., 1998)

A dorzális talamuszhoz hasonlóan az nRT-t is fel lehet osztani különböző modalitásokért felelős részekre. Sőt, a különböző régiók az azonos modalitásért felelős talamikus és kérgi területekkel összeköttetésben állnak (Guillery és mtsai., 1998). Azonban az elsőrendű és magasabbrendű talamuszból származó bemenetek átfedésben lehetnek egymással, ami a jelintegráció lehetőségét veti fel.

Az nRT-ba érkező kortikoretikuláris rostok száma messze felülmúlja a talamoretikuláris rostok számát (kb. tízszer több a kérgi bemenet). Azonban csak a hatodik rétegi piramissejtek axonjai ágaznak el az nRT-ban, az ötödik rétegi piramissejtek rostjai elágazás nélkül haladnak tovább a magasabbrendű talamusz felé (Guillery és mtsai., 1998). Hozzávetőlegesen a szinapszisok 70%-át kortikális, hatodik rétegi végződések alkotják, 20 – 25%-át talamikus eredetű végződések, és 15 – 20%-át GABAerg gátló végződések (Liu , Jones, 1999).

A kis méretű, egyszeres szinapszist alkotó kortikoretikuláris végződések egyenletesen borítják be az nRT sejtjeinek a felszínét, míg a nagy méretű, összetett aktív zó-

nával rendelkező talamikus végződésnek elsősorban a proximális dendritekkel létesítenek kapcsolatot. Ennek megfelelően az egyedi kortikális rostok ingerléséből származó EPSC-k amplitúdója konzekvensen kicsi, latenciája nagy, míg a talamikus rostok ingerléséből származó EPSC-k mérete nagyobb és változatosabb, latenciája viszont kicsi (Jones, 2002).

Az nRT-ban a GABAerg végzések eredete vitatott (Pinault és mtsai., 1997). Az nRT-n belüli összeköttetés elsősorban dendro-dendritikus szinapszisok (Deschênes és mtsai., 1985; Pinault és mtsai., 1997), illetve gap junction hálózaton keresztül valósul meg (Landisman , Connors, 2005). Érdekes módon az nRT sejtek rekurrens kollaterálisai rövidiek, és nem minden sejtre jellemzőek (Cox és mtsai., 1996). A rekurrens kollaterálisok által kialakított kémiai szinapszisokat csak fiatal állatban sikerült kimutatni (Deleuze , Huguenard, 2006); elektrofiziológiai bizonyíték kémiai szinapszisokra felnőtt állatban nincsen (Landisman és mtsai., 2002). Az nRT-n belüli gátló szinapszisok szabályozzák a ritmikus oszcillációba bekapcsolódó nRT sejtek számát (Sohal , Huguenard, 2003). Az eredmények arra utalnak, hogy az intra-nRT gátlás hiányában az nRT kimenete felerősödik (Huguenard , Prince, 1994b; Sanchez-Vives , McCormick, 1997) és hiperszinkronizált oszcillációt okoz (Huntsman és mtsai., 1999), ami megjelenésében hasonlós az absence epilepszia során tapasztalt paroximális oszcillációkhoz (Krosigk és mtsai., 1993; Huguenard , Prince, 1994a).

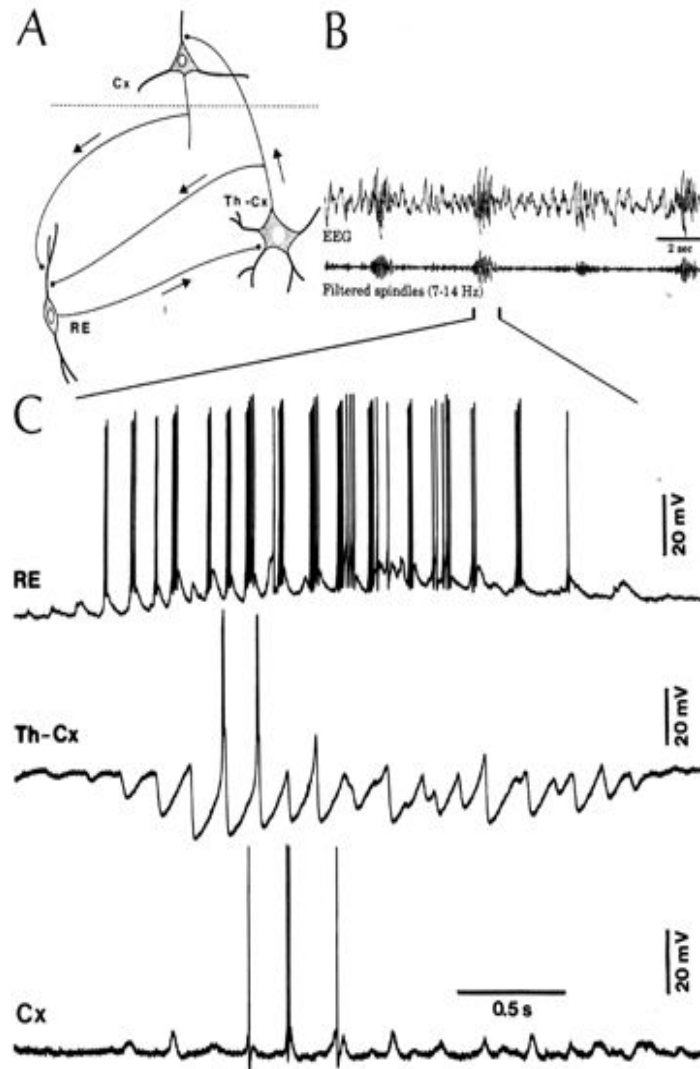
Érdekes módon, egyre több eredmény utal arra, hogy az nRT sejteire a GABA depolarizálóan hat (Barthó és mtsai., 2004; Sun és mtsai., 2012), mivel a Cl^- ekvilibrium potenciálja a nyugalmi membránpotenciálnál magasabb érték (-45 mV) (Sun és mtsai., 2012). Azonban az nRT sejtek kisüléséhez csak azok burst tüzelési módjában járul hozzá, a T-típusú Ca_2^+ csatornák aktiválódásának hiányában a GABA-közvetítette depolarizáció küszöb alatti csupán.

Az nRT egyetlen kimenete a dorzális talamusz. Habár nagy léptékben elmondható, hogy az azonos modalitásért felelős talamikus és nRT szektorok reciprok összeköttetésben állnak egymással, mindez az egyes sejtek szintjén nem feltétlenül igaz, az nRT sejtek axonfája csak részleges átfedést mutat az őket beidegző relésejtek dendritfájával (Pinault, 2004). Azaz, ennek megfelelően a talamokortikális és nRT sejtek zárt és nyitott hálózati köröket is létrehozhatnak, megvalósítva ezzel a talamuszban a visszacsatoló és előrecsatoló

gátlást is. A gátló nRT és a serkentő talamikus relésejtek reciprok összeköttetése teremti meg a strukturális alapot a 7 – 15 Hz frekvenciájú spindle, vagy orsó oszcillációnak (Krosgig és mtsai., 1993) (4. ábra). A relésejt burstjei között eltelt időt, vagyis a spindle frekvenciáját az nRT-ból érkező burst IPSC hossza szabja meg (Bal és mtsai., 1995). Az nRT sejtek axonarborizációjának lefutása jól követi a beidegzett relésejt dendritfáját (Pinault, Deschênes, 1998). Az nRT idegsejtjeinek aktiválódása esetén számos egyedi terminálisból szinkronizált módon történik a transzmitterürülés (Wanaverbecq és mtsai., 2008). Az nRT sejtek közvetítette IPSC depresszáló a 10 – 100 Hz-es frekvencia-tartományban (Wanaverbecq és mtsai., 2008).

A második gátlás típusát a lokális interneuronok jelentik a talamuszban, melyek bemenetspecifikus gátlást szolgáltatnak közvetlenül ott, ahol a primer serkentő afferensek a relésejtekkel szinaptizálnak. Az interneuronok a serkentő óriásvégződések közvetlen szomszédságában létesítenek kapcsolatot a relésejtek dendritjeivel triádokat vagy – több szinaptikus elem jelenléte esetén – glomerulust formálva (Colonnier, Guillery, 1964). A triádokban a helyi interneuronok nemcsak posztzinaptikusak, hanem vezikulatartalmú dendritjükkel a relésejtek dendritjén is szinaptizálnak. Elektronmikroszkópos szinten az axonszerű végződés az F2 (F, flatten, azaz lapos vezikulákat tartalmazó) besorolási típust kapta, megkülönböztetve az nRT eredetű, csak preszinaptikus sajátosságokkal rendelkező F1 típustól. A háromféle szinapszis egymáshoz közel alakul ki, és legtöbbször mielinburok szigetelivel az extracelluláris tértől. Az interneuronok nyújtotta gátlás elsősorban a talamokortikális sejtek receptív mezejét erősíti a környező gátlás fokozásával (Acuna-Goycolea és mtsai., 2008). Az interneuronok eloszlása a talamuszban nem egyenletes, mennyiségük a fajok között jelentősen változhat, pontos feladatuk és jelentőségük vitatott. Érdekes módon rágcsálókban szinte csak az LGN területén találkozhatunk interneuronokkal (Harris, Hendrickson, 1987), így erről a gátlástípusról főleg macska, gőrény és majom kísérletekből meríthetünk információt.

Az nRT és a lokális interneuronok mellett egyes talamusz régiókba specifikus gátló bemenet érkezik, melyet extratalamikus gátlásnak nevezünk. A medial geniculate nucleus (MGN) az inferior colliculus révén részesül felszálló monoszinaptikus GABAerg bemenetben (Peruzzi és mtsai., 1997), az LGN a pretectumból kap hasonló bemenetet; míg a motoros ventral anterior mag (VA) és center median-parafascicular komplexumba (CM-



4. ábra. A spindle oszcilláció vagy orsó EEG és sejt szintű megjelenése. A, A spindle oszcillációban szerepet játszó talamokortikális kör sematikus diagramja. B, Lassú hullámú alvás során mérhető EEG aktivitás jellegzetes 7 – 15 Hz-es orsókkal. C, Intracelluláris elvezetések nRT (RE), talamokortikális relésejt (Th-Cx) és kortikális idegsejtből (Cx) spindle oszcilláció során. Az nRT nagy frekvenciával burstól az orsózás során, aminek hatására a talamokortikális sejteken mély IPSP-k jelennek meg, melyeket gyakran visszacsapó burst követ. A relésejtek nagy frekvenciájú burstjai tüzelésre készítik a beidegzett kérgi sejteket is, melyek így ugyancsak spindle frekvenciában tüzelnek. (Steriade, Llinás, 1988)

Pf) a globus pallidus, a substantia nigra pars reticulata és a zona incerta gátló sejtjei küldenek gátló óriásbemeneteket (Balercia és mtsai., 1996; Ilinsky és mtsai., 1997). Egyes magasabbrendű régiókba is érkezik specifikus, multiszinaptikus gátló óriásbemenet. Ilyen a csoportunk által korábban vizsgált zona incertából és az anterior preectumból érkező gátlás a rágszáló posterior nucleus (Po) területére (Bartho és mtsai., 2002; Bokor és mtsai., 2005), vagy éppen a jelenleg is karakterizálás alatt álló gátló glicinerg bemenet a nucleus pontis oralis (PnO) területéről. Az extratalamikus gátlásnak feltehetőleg a mozgással nem szinkronizált primer afferens bemenetek kiszűrésében lehet szerepe.

A reciprok retikulotalamikus összeköttetés szerepének és összetett szinaptikus elrendeződésének működési mechanizmusa mindmáig forrón kutatott terület, de számos megválaszolatlan kérdés vár még tisztázásra. Például, pontosan nem ismert, hogy a talamuszt érintő oszcillációk fenntartásában milyen szerepe van a talamuszba érkező szinaptikus gátlásnak. Az általunk használt egér modell segítségével azonban elválasztható a GABA_A receptor $\gamma 2$ alegységétől függő szinaptikus gátlás az ettől az alegységtől független extraszinaptikus GABA_A gátlástól. PhD munkám második felében az nRT-ból érkező, szinaptikus GABA_A receptor független, mégis fázisos eseményhez köthető gátlási típust vettem górcső alá, és munkatársaimmal szorosan együttműködve a $\gamma 2$ alegység független gátlás szerepét tanulmányoztam a talamuszt érintő oszcillációkban (részletek az Eredmények második fejezetében).

2.6. A GABA_A receptorok

A szinaptikus gátlásért a felnőtt idegrendszerben elsősorban a GABA közvetítette jelátviteli útvonal felelős. A GABA gyors gátló hatását elsősorban GABA_A receptorok aktiválása révén éri el az agyban (Sieghart, Sperk, 2002; Rudolph, Möhler, 2004), és GABA_C receptorok aktiválásával a retinában (Bormann, Feigenspan, 1995), míg a lassú, hosszan kifejtett gátló hatását metabotróp G-fehérje kapcsolt GABA_B receptorok közvetítik (Couve és mtsai., 2000; Bettler, Tiao, 2006).

A GABA_A receptorok a glicin, a szerotonin (5-HT) és a nikotinos acetilkolin (nACh) receptorokkal rokon, Cl⁻-t és bikarbonátot áteresztő ligandum-függő ioncsatornák (Schofield és mtsai., 1987; Grenningloh és mtsai., 1987; Maricq és mtsai., 1991; Julius, 1991; Chebib, Johnston, 2000). Ugyan a GABA_A receptorok bikarbonát ionra is áteresztőek,

de ezeket az ionokat sokkal kisebb hatásfokkal engedik át, így a csatornán átfolyó áram jelentős része a Cl^- mozgásából származik (Bormann, Feigenspan, 1995).

A GABA_A receptorok leggyakrabban heteropentamerként alkotnak funkcionális ioncsatornát az idegrendszerben. Eddig 19-féle alegységét sikerült azonosítani az emlősök központi idegrendszerében ($\alpha 1-6$, $\beta 1-3$, $\gamma 1-3$, δ , ϵ , θ , π és $\rho 1-3$), melyet további „splice”-variánsok tesznek még heterogénebbé (pl. a $\gamma 2$ alegység esetén (Simon és mtsai., 2004)). Az elméletileg elképzelhető igen nagy számú variációból a 19 alegység csupán egy pár tucat kombinációban fordul elő az agy különféle területein. Sztöchiometriai vizsgálatokkal igazolták, hogy a szinaptikus GABA_A receptorokban jelen van egy γ alegység, mely két α és két β alegységgel együtt alkot funkcionális csatornát (Chang és mtsai., 1996; Tretter és mtsai., 1997; Farrar és mtsai., 1999; Whiting és mtsai., 1999). Az agyban legnagyobb számban $\alpha 1$, $\beta 2$, $\gamma 2$ alegységekből álló GABA_A receptorral találkozhatunk (Sieghart és mtsai., 1999). Anatómiai lokalizációs módszerek rávilágítottak arra, hogy a GABA_A gátlás azért annyira változatos az idegrendszerben, mert számos idegsejt a GABA_A receptoralegységek egész tárházát fejezi ki a membránján (Laurie és mtsai., 1992; Fritschy, Mohler, 1995).

A csatornák alegység-összetétele az egyedfejlődés során is sokat változhat, ami kihat a receptorok kinetikájára (Hollrigel, Soltesz, 1997; Dunning és mtsai., 1999). Embriónális korban legkorábban a kortikális lemezen $\gamma 1$ -et tartalmazó csatornákat mutattak ki, míg α alegységből 2/3/4 volt a legnagyobb mennyiségben (Araki és mtsai., 1992; Laurie és mtsai., 1992). A γ (kifejlett korban a $\gamma 2$, illetve $\gamma 3$) alegységről bizonyosodott be, hogy intracelluláris doménje révén a gephyrinnek nevezett horgonyzó fehérjéhez kapcsolódik, ami ezáltal biztosítja a receptor szinaptikus klaszterizációját (Fischer és mtsai., 2000; Jacob és mtsai., 2008). Maga a receptor klaszterizációja is jelentősen befolyásolja a csatornák kinetikáját (Chen és mtsai., 2000). Számos immunfluoreszcens és elektronmikroszkópos immunogold módszerrel bizonyítást nyert, hogy bizonyos GABA_A receptoralegységek nagy számban feldúsulnak a posztzinaptikus denzitásban (Craig és mtsai., 1994; Somogyi és mtsai., 1996). Ezek a következők: $\alpha 1-3$, $\alpha 6$, $\beta 2-3$, $\gamma 2$. Természetesen ez nem azt jelenti, hogy ezek a receptorok kizárólag a szinapszisokban lennének jelen. Sőt, kvantitatív kísérletekkel igazolták, hogy ezen receptoralegységek száma nagyobb a nem-szinaptikus membránban, a posztzinaptikus denzitásban mindössze erős feldúsulást

tapaszthatunk (Nusser és mtsai., 1995b,a).

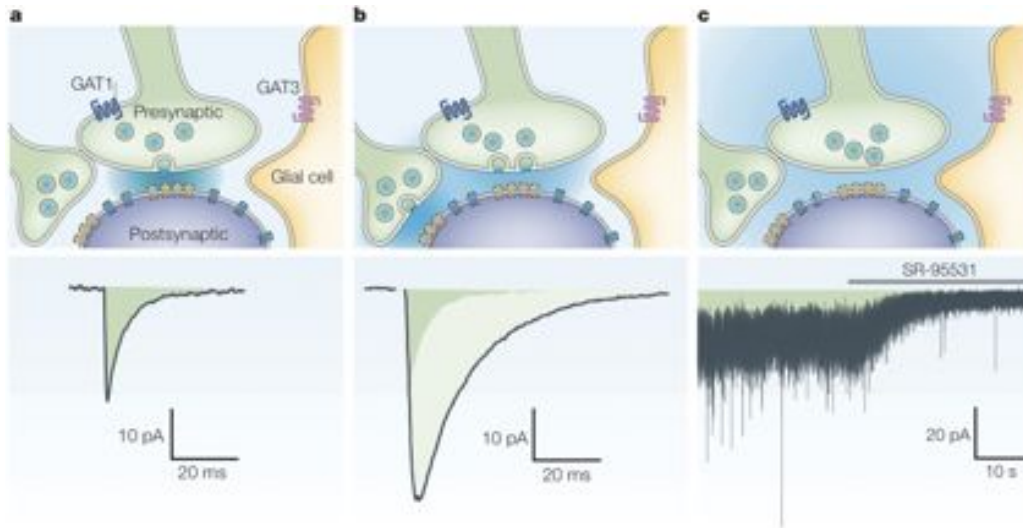
Amennyiben a γ alegységet δ helyettesíti, a receptor nem kötődik gephyrinhez, így kizáródik a szinapszisokból a peri- és extraszinaptikus plazmamembránba (Nusser és mtsai., 1998)³. A δ alegység tartalmú GABA_A receptorok jellemzően $\alpha 4$ (pl. talamusz és gyrus dentatus esetében) vagy $\alpha 6$ (cerebelláris szemcsesejtek esetében) állnak össze funkcionális receptorrá. Ezen receptorok kinetikája sokban eltér a szinaptikus γ alegység tartalmú receptoroktól.

2.6.1. A GABA_Aerg gátlás formái

Fázisos gátlás azt a folyamatot írja le, amikor közvetlenül a preszinaptikus vezikuláürüléshez köthető a posztzinaptikus válasz. Legelemibb példa erre az IPSC (5. ábra a), de ide tartozik a transzmitter molekulák diffúziója során a periszinaptikus régióban elhelyezkedő receptorok aktiválódásakor kialakuló áram. Ez utóbbi folyamatot spillover-nek nevezi az irodalom (5. ábra b). Az idegrendszerben a fázisos GABAerg gátlást elsősorban γ , különösen $\gamma 2$ alegységtartalmú receptorok biztosítják (Farrant , Nusser, 2005; Mody , Pearce, 2004).

A fázisos gátlással ellentétben a tónusos gátlás közvetlenül nem köthető gátló preszinaptikus aktivitáshoz. Kialakításában az extracelluláris térben állandó alacsony koncentrációban jelenlevő GABA játszik szerepet (Farrant , Nusser, 2005). A szinaptikus GABA_A receptoroktól eltérő alegység-összetételüknek köszönhetően az extraszinaptikus receptorok sokkal kisebb GABA koncentrációra is félmaximális aktivációt mutatnak (EC₅₀ ~0,3 – 0,7 μ M), ezért bizonyos hatásfokkal az extracelluláris térben levő GABA aktiválja a csatornákat, kialakítva ezzel a tónusos gátlást (Farrant , Nusser, 2005; Mody , Pearce, 2004). A tónusos áram jelenléte legkönnyebben GABA_A receptor blokkolókkal (pl. gabazine, picrotoxin) mutatható ki *in vitro* szeletpreparátumokon (5. ábra c). A tónusos gátlás az idegsejtek ingerlékenységére van nagy hatással. Az általános ingerlékenységen kívül lokális, egy-egy dendritszakasz jelintegrációját érintő hatása is van az extraszinaptikus GABA_A receptorok aktivációjának, mégpedig a megnövekedő membránkonduktancia hatására kialakuló söntölő gátlás révén.

³Érdekességként megjegyezném, hogy a $\gamma 2$ alegységet az $\alpha 5$ alegységgel együtt tartalmazó receptorok szintén kizorolnak a szinapszisból (Brüning és mtsai., 2002; Crestani és mtsai., 2002). Itt feltehetőleg az $\alpha 5$ alegység felülírja a $\gamma 2$ -gephyrin szoros kontaktusát.



5. ábra. A GABA_A receptorok aktivációs módjai. A, Egy szinaptikus vezikula ürülése során felszabaduló GABA molekulák csak azokat a GABA_A receptorokat aktiválják, amelyek közvetlenül a „release site” alatt találhatóak (sárga receptorok). A kék árnyékolás az ürült GABA diffúzióját mutatja. Az alatta látható elvezetés miniatűr IPSC-k átlagos alakját mutatja, Na⁺ csatorna blokkoló (tetrodotoxin - TTX) jelenlétében mérve. Az áram görbe alatt árnyékolt terület jelzi a töltés átvitelt. GAT, GABA transzporter. B, Az akciós potenciál függő multi-vezikuláris ürülés, vagy a több terminálisból szinkronizált módon történő ürülés elősegíti a GABA „spillovert”, és mind szinaptikus, mind peri- és extraszinaptikus receptorokat aktiválja (késsel jelölve). Az áram görbéje nagyobb és sokkal lassabb lefutást mutat. A mIPSC-k területe sötét zöld színnel van feltüntetve az összehasonlítás kedvéért. C, GABA transzporter aktivitástól függetlenül fennmaradó alacsony koncentrációjú állandó GABA tónusosan aktiválja a nagy affinitású extraszinaptikus GABA_A receptorokat. Az elvezetés a „zajos” tónusos áramot mutatja, ami a nagy affinitású GABA_A receptorok véletlenszerű nyitásából származik, illetve az ezen felül mérhető fázisos áramokat (ami a felső rajzon feltüntetett esetben nem jelzett terminálisok aktivitásából származik). Magas koncentrációjú (10 μM) GABA_A antagonist (gabazine) gátolja mind a fázisos IPSC-eket, mind a tónusos aktivitást. Így előidézve a „tartó áram” és az áram variációjának csökkenését. A gabazine jelenlétében megmaradt ritka fázisos események EPSC-k. Az elvezetésen jelölt árnyékolt terület a gabazine alkalmazása előtt azt a töltés mennyiséget mutatja, ami a tónusosan aktív GABA_A GABA_A receptorokon keresztül jutott a sejtbe. Az áram elvezetések felnőtt egér kisagyi szemcsesejtjeiből származnak whole-cell patch-clamp módban mérve akut szeleteken. Az elvezetéseket szimmetrikus Cl⁻ koncentrációval -70 mV tartófeszültségen, szobahőmérsékleten végezték. (Farrant , Nusser, 2005)

Felmerül azonban a kérdés, hogy a tónusos és fázisos gátlás mellett elképzelhető-e további gátlási forma, esetleg átmenet a két gátlási típus között. Számos tanulmány azt igazolja, hogy igen. A fázisos gátlás lassú formáját több agyi régióban már leírták. A „lassú gátlás” leggyakrabban morfológiailag specializált szinapszisokban figyelhető meg (Crowley és mtsai., 2009; Hámori, Szentágothai, 1966; Mańko és mtsai., 2012; Rossi, Hamann, 1998), de kialakulhat nagyon lassú lecsengési kinetikával rendelkező ioncsatornák közvetítésével (Schofield, Huguenard, 2007; Szabadics és mtsai., 2007; Zhang és mtsai., 1997), vagy hosszan tartó aszinkron vezikulaiürülés esetén (Best, Regehr, 2009; Hefft, Jonas, 2005; Lu, Trussell, 2000), esetleg extraszinaptikus receptorok aktiválódása révén (Oláh és mtsai., 2009; Prenosil és mtsai., 2006; Wei és mtsai., 2003; Zarnowska és mtsai., 2009), mint amilyen a korábban említett spillover jelensége.

Az extraszinaptikus GABA_A receptorok aktiválódását fázisos gátlás során nemrégiben igazolták az nRT - talamokortikális szinapszisok esetén is (Herd és mtsai., 2013). Ez a fajta „lassú gátlás” $\alpha 4$ alegységet tartalmazó GABA_A receptorok jelenlétét követelte meg, és az egyedi IPSC-k időtartamát növelte meg preszinaptikus burst kisülés esetén.

A dolgozatban szereplő második tanulmányban az egér talamuszát vizsgálva arra kerestük a választ, hogy a fázisos gátlás során aktiválódó extraszinaptikus GABA_A receptoroknak mekkora szerepük van a talamokortikális oszcillációk hangolásában.

3. CÉLKITŰZÉSEK

1. A főemlős talamusz serkentő óriásbemeneteinek fénymikroszkópos feltérképezése.
2. A kortikális és szubkortikális eredetű driver bemenetek konvergenciájának, szegregációjának tanulmányozása.
3. A talamusz különböző régióiból származó RL-típusú terminálisok elektronmikroszkópos vizsgálata.
4. A szinaptikus GABA_A receptor γ 2-es alegységének vírusmediált kiütése a γ 2 floxolt egerek talamuszából.
5. A GABA_A receptor γ 2 alegység eliminálódásának fénymikroszkópos módszerekkel történő igazolása.
6. A GABA_A receptor γ 2 alegység eliminálódásának *in vitro* elektrofiziológiai módszerrel történő igazolása akut egér agyszeleteken.
7. A szinaptikus vs. extraszinaptikus gátlás hozzájárulásának meghatározása a talamokortikális oszcillációkban.
8. A posztszinaptikus gátló receptor-populációk preszinaptikus tüzelési mód specifikus aktiválódásának tanulmányozása.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Majom kísérletek módszerei

Műtét és perfúzió

A kísérletekhez összesen hét felnőtt nőstény majmot (*Macaca mulatta*) használtunk fel az MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézetének etikai bizottsága által kiállított előírásának (22.1/77/001/2010) megfelelően. Három majom esetében történt jelölőanyag beadás [Biotinilált Dextrán Amin, BDA; 10000 molekula tömeg (Invitrogen), 10% 0,1 M foszfát-pufferben oldva (PB), pH 7,4]: két majom jobb agyféltekén az M1 motorkéregbe, ill. a SMA motorkéregbe, míg a harmadik esetben a capsula interna ventrális részébe történt a beadás annak érdekében, hogy a kérgi ötödik rétegi axonokat jelöljük meg hatodik rétegi axonjelölés nélkül. Az állatokat ketamine hidroklorid (10 mg/kg) és xylazine (1 mg/kg) keverékéből álló oldattal altattuk, és tartottuk fenn az alvást a műtét során. Az állatok megfelelő testhőmérsékletét melegítő pad biztosította 37 – 38 °C-on. A szívritmust és testhőmérsékletet folyamatosan figyelve állítottuk be az alvás mélységét további altató adagolásával. A kraniotómia elvégzése után a BDA beadása üveg mikropipettával történt (hegy átmérő 50 – 70 μm) pozitív áramimpulzusok révén (2 másodperces ciklusidő, 5 μA , 20 perc). A műtét után a majmokat antibiotikummal (coboctan, 2,5%, 0,3 ml/nap) és fájdalomcsillapítóval kezeltük. Az állatokat két, illetve három hét túlélési idő után letális dózisu nátrium pentobarbitállal intravénásan feláldoztuk, majd a majmokat szíven keresztül fixáló oldattal perfundáltuk. Először fiziológiás sóoldatot (5 perc, 500 ml) használtunk, amit 400 ml 2% paraformaldehidet és 0,5% glutáraldehidet tartalmazó acetát puffer fixáló (pH 6,0; 5 perc) követett, végül 2500 ml 2% paraformaldehid és 0,5% glutáraldehid tartalmú borát pufferrel fejeztük be a fixálást. (Berod és mtsai., 1981). A műtétet és a beadások lokalizálását Acsády László és Ulbert István végezte.

Előkezelések

A perfúzió után az agyakat a koponyából eltávolítottuk, a talamuszt mediansagittálisan kettévágtuk, majd koronálisan 50 μm vastag szeletekre metsztük vibratome-mal. A metszeteket 0,1 M PB-ben mostuk, majd egy éjszakán át krioprotektív oldatban inkubáltuk (30% szaharóz 0,1 M PB-ben), és folyékony nitrogén fölött fagyasztottuk. Nátrium-

borohidrides inkubálást alkalmaztunk a glutáraldehid által kialakított keresztkötések fel-lazításához. Ezek az előkezelések az oldott reagensek jobb penetrációját segítik a további reakciók során. Alapos PB-ben történő mosás után a metszeteket készen álltak az immun-festésre.

További reakciók

A továbbiakban leírt immuncitokémiai reakciók során minden alkalommal a primer im-munreakciót megelőzően szérum albuminos blokkolással (bowine serum albumin [BSA] oldva; 30 perc) igyekeztünk elfedni a szövet aspecifikus kötőhelyeit.

Hogy az immunfestések során használt antitestek specificitását bizonyítsuk, mind a vGLUT2 (vezikuláris glutamát transzporter 2), mind a vGLUT1 elleni antitestből két, külön epitóp ellen termeltetett antitestet is kipróbáltunk. Az azonos vGLUT anti-gén ellen termelt különböző antitestek megegyező immunjelölést eredményeztek. Ezek az antitestek az alábbiak voltak: tengerimalac-anti-vGLUT1 (1:5000 – 1:10000; Millipore Bioscience Research Reagents), nyúl-anti-vGLUT1 (1:10,000; Synaptic Systems), egér-anti-vGLUT2 (1:3000 – 1:4000; Millipore Bioscience Research Reagents) és nyúl-anti-vGLUT2 (1:3000 – 1:4000; Synaptic Systems). A továbbiakban az egyszerűség kedvéért csak az egy-egy vGLUT antitest reakcióit ismertetem.

Immuncitokémia - beadási (kontralaterális) oldal

A BDA-val jelölt oldal rostjainak megjelenítése közvetlenül avidin-biotinilált tormaper-oxidáz komplexszel (ABC, 1:300 0,05 M TBS-ben, 2 óra), majd nikkel-intenzifikált 3,3'-diaminobenzidinnel (DABNi) történt, ami fekete csapadékot eredményez (A DABNi az alábbi összetevők alapján készült: 16 ml 0,1 M PB, pH 7.4; 1 ml 0,5% DAB oldat, 6,6 mg NH₄Cl és 0,8 ml 0,05 M NiNH₄SO₄). Azon rostok, melyeket nem töltött ki a festék, teljesen immunjelölés-mentesek voltak, mely az antitest specificitására utal.

Kettős immuncitokémiai reakciót alkalmaztunk a vGLUT2, illetve a jelölt rostok együttes előfordulásának kimutatására. A pályakövető anyagot DABNi segítségével hív-tuk elő. Ezt követően a szeleteket nyúl-anti-vGLUT2 antiszérummal (éjszakán át), majd biotinilált anti-nyúl ImmPRESS antitesttel (1:2 TBS-ben, 2 óra, Vector Laboratories) ke-zeltük, végül DAB kromogénnel hívtuk elő, ami barna csapadékot eredményez (A 0,5%-

os DAB oldatot tízszeresére hígítottuk TB-ben).

A DAB, ill. DAB-Ni kromogénnel elhívott metszeteket a következőképpen készítettük elő a fénymikroszkópos és elektronmikroszkópos vizsgálatokra: sorrendben pufferes mosás (2×10 perc); 1%-os OsO_4 (7%-os glükózzal, amennyiben csak fénymikroszkóposan elemeztük a metszeteket) PB-ben oldva (40 perc); pufferes mosás ($2 \times$); desztillált vizes mosás ($2 \times$); 10%-os uranilacetát (40 perc); desztillált vizes mosás; metszetek tárgylemezre húzása és lefedése, majd ferdén kisméretű Petri csészébe helyezése (ez utóbbi művelet azt a célt szolgálja, hogy a metszetek a posztfixálás/dehidráálás során a lehető legegyszerűbbek maradjanak); 70%-os, 95%-os végül 100%-os etanolos átfolyatás; metszetek áthelyezése egy erre a célra hajtogatott alufóliacsónakba abszolút alkoholba; propilénoxid ($2 \times$); végül Durcupan műgyanta (ACM; Fluka, éjszakára, szobahőmérsékleten). A metszeteket másnap tárgylemezre fektettük, lefedtük, majd 56°C -os termosztátba tettük egy éjszakára, hogy elősegítsük a polimerizációt. Így a fekete (DABNi) és a barna (DAB) csapadék közti színkülönbség megmaradt. A továbbiakban minden esetben így posztfixáltuk/dehidráltuk a metszeteket.

Immunitokémia - ipszilaterális oldal

A vGLUT2-t a fent említett módon hívtuk elő, azzal a különbséggel, hogy DABNi-t használtunk a DAB helyett. A vGLUT1-t tengerimalac-anti-vGLUT1 ellenanyaggal (1:6000 TBS-ben éjszakára), majd biotinilált kecske-anti-tengerimalac szekunder antitest (BGAGp 1:300, 2 óra, Vector Laboratories) felhasználásával jelöltük meg, amit ABC-DABNi reakcióval hívtunk elő. Ezt követte a fentieknek megfelelő posztfixálás, dehidráálás és Durcupános beágyazás.

Kettős festést alkalmaztunk az együttesen előforduló vGLUT1 és vGLUT2 terminálisok térképezésére. Ekkor a vGLUT1-nél BGAGp-t (1:300 TBS-ben, 2 óra, Vector Laboratories), a vGLUT2-nél biotinilált anti-nyúl ImmPRESS antitestet (1:2 TBS-ben, 2 óra, Vector Laboratories) használtunk szekunder antitestként és DABNi-lel, illetve DAB reakcióval hívtuk elő, hogy fénymikroszkópos vizsgálatokkal elkülöníthessük a kétféle idegvégződést. Az ezt követő posztfixálás során 7%-os cukor oldatban hígított OsO_4 oldatot használtunk, hogy a barna és fekete csapadék színbeli különbségét megőrizzük, míg a többi lépés megegyezett a korábban leírtakkal.

Az intralamináris magcsoport pontosabb azonosításához calbindin jelölést alkalmaztunk a szomszédos metszeteken. Ekkor a kalciumkötő fehérje megjelenítéséhez monoklonális anti-egér-calbindin antitestet használtunk (1:2000 TBS-ben éjszakára, Swant) vagy anti-nyúl-calbindin antitestet (1:2000, K. G. Baimbridge ajándéka, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada), melyet BGAM vagy BGAR (1:300, 2 óra, Vector Laboratories) szekunder, ABC és DABNi kromogén követett. A metszetek dehidrációja és ozmifikációja a fent leírtak szerint történt.

Arany-jelölés ezüst intenzifikálással

Ez a jelölés fénymikroszkópos és elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz is alkalmas, ha a szekunder antitest arany-konjugált. Ekkor a nagyobb töménységben alkalmazott primer antitestet (vGLUT2 1:2000, vGLUT1 1:5000) halzselatinos (cold water fish skin gelatine, Aurion) blokkolás (TBS + 0,8% BSA + 0,05% NaN_3 + zselatin 0,1%), majd arany-konjugált szekunder (1:50 előző blokkolóoldatban 1 óra szobahőn, éjszakára 4 °C) követett. Ezután 1%-os glutáraldehid kezelés jött, hogy az aranyszemcséket rögzítsük, majd az ezüsthíváshoz használt Aurion R-GENT LM intenzifikáló kit saját hívóoldata (enhancement conditioning solution, ECS, Aurion, 1:10 desztillált vízben oldva). Az ezüsthívás szigorúan 20 °C-on történik. A hívás leállításához a korábbi ECS oldatot használtuk. A posztfixálás és dehidráció során az 1% OsO_4 -ot jégágyban tettük a metszetekre 30 percre, a többi lépés megegyezett a fent említettekkel.

Arany-jel mellett elektronmikroszkóposan jól elkülöníthetőek a DAB kromogénnel előhívott terminálisok. Ezt használtuk ki akkor, amikor a vGLUT1 ellen arany-konjugált szekundert használtunk, majd ezüst-intenzifikálóval hívtuk elő a metszeteket, míg a vGLUT2 ellen BGAM ellenanyagot alkalmaztunk és ABC-DAB reakcióval tettük láthatóvá a terminálisokat.

Félvékony metszetek készítése

A metszeteket OsO_4 kezelés nélkül dehidráltuk 1%-os uranil-acetátot használva. A szomszédos metszetek térképei alapján megfelelőnek ítélt területekről az elektronmikroszkópos technikához hasonlóan átágyazást végeztünk. A blokkból 500 nm vastagságú, ún. félvékony metszeteket készítettünk ultramikrotommal, melyeket tárgylemezen levő víz-

cseppekbe szedtünk és egy éjszakán át szárítottuk. A beágyazószer kimaratásához két perces Na-etanolát kezelést használtunk küvettában. Ezt leszálló alkoholsor követte. A tárgylemezre szárított metszeteket ezt követően nedves kamrába tettük. A primer antitest előtt a blokkoló szérumnak NGS-t (normal goat serum, 10%, 20 perc, nedves kamra) alkalmaztunk, a primer antitest egy éjszakán át volt 4 °C-on a metszeteken. A fluoreszcens festékekkel konjugált szekunder antitest (vGLUT2R – A488-DAR, zöld; vGLUT1Gp – Cy3-DAGp, piros; 1:300) 30 percet volt a metszeteken. Ezt követően a tárgylemez Vectashielddel lefedhető volt.

Kettős immunfluoreszcens jelölések

A tracer és a két vGLUT együttes fluoreszcens kimutatására a metszeteket anti-nyúl-vGLUT1 (1:5000, 0,5% Triton X-100-at tartalmazó TBS-ben) és anti-egér-vGLUT2 (1:3000) primer ellenanyagokkal kezeltük, amit CY3-konjugált szamár-anti-nyúl (1:500, Jackson ImmunoResearch), Cy5-konjugált szamár-anti-egér (1:500, Jackson Immunoresearch) és streptavidin-konjugált Alexa Fluor 488 (1:2000, Invitrogen) követett. A fluoreszcens festést a fluoroforok felcserélésével is elvégeztük. A lipofuszcin autofluoreszcens hátterének csökkentésére a metszeteket 1 órán át CuSO_4 -et tartalmazó oldattal kezeltük Schnell és munkatársai által leírt módon (Schnell és mtsai., 1999). Végül a metszeteket tárgylemezre húztuk, lefedtük Vectashield médiummal (Vector Laboratories), és konfokális mikroszkópban tanulmányoztuk.

Elektronmikroszkópos vizsgálatot megelőző kezelések

Elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz a DAB kromogénnel előhívott, illetve az ezüst-intenzifikált metszeteket a fénymikroszkópos technikáknál leírt módon dehidráltuk.

Fénymikroszkóppal azonosítottuk azokat a területeket a metszeteken, melyeket alkalmasnak találtunk az átágyazásra. Az átágyazott szövetblokkokból 60 nm-es ultravékony metszeteket készítettünk ultramikrotommal. Az úszó metszeteket felváltva vettük föl réz és nikkal gridekre.

A nikkal grideken végeztük el a beágyazás utáni GABA reakciót. Ennek során a metszetekről először perjódsavval (0,5%, 2 min) lemarattuk a Durcupán műgyantát, és a további megfelelő lépéseket követően az anyagot nyúl-anti-GABA ellenanyaggal csep-

pekben (1:2000, 1:6000 TBS-ben, Somogyi Péter ajándéka, University of Oxford, UK) inkubáltuk. 15 nm-es arany szemcsékkel konjugált kecske-anti-nyúl IgG-vel cseppekben (1:20, 1% BSA-t és 0,5% Tween 20-t tartalmazó, 0,05 M TB-ben oldva, pH 7,4) hívtuk elő a jelet. Végül uranyl-acetáttal, majd ólom-nitráttal kontrasztosítottuk a szövetet. A réz grideken nem végeztünk beágyazás utáni GABA reakciót, csak ólommal kontrasztoltuk azokat.

Mikroszkópos fényképek készítése

A fénymikroszkópos metszetekről AxioCam HRc digitális kamerával készítettünk képeket (Carl Zeiss) AxioImager M1 mikroszkóp segítségével (Carl Zeiss). Multifokális képeket a (Zeiss) AxioVision programmal készítettünk, a képek montázsolásához az Image-Pro Express 6.0 (Media Cybernetics) 'Extended depth of field' funkcióját használtuk.

A fluoreszcens konfokális felvételek készítéséhez Nikon A1R mikroszkópot használtunk szekvenciális módban CFI Plan Achromat VC 60x objektívet (numerikus apertúra 1,4) alkalmazva.

Elektronmikroszkópos felvételek készítéséhez egy Hitachi H-7100-as elektronmikroszkópra épített Veleta CCD kamerát használtunk (Olympus Soft Imaging Solutions) vagy JEOL 1200 EXII elektronmikroszkópot.

Ahol szükséges volt a fényességet és a kontrasztot Adobe Photoshop CS2 (Adobe System) segítségével változtattuk, kizárólag a teljes képen alkalmazva a módosítást.

A térképezés menete

A talamusz maghatárainak, körvonalának megrajzolása camera lucida segítségével történt. A talamusz ventrális és kaudomediális határát a talamuszra jellemző sűrű vGLUT1 jelölés alapján húztam meg. Az így kapott rajzokat digitalizáltuk. A vGLUT2, illetve a vGLUT1 pozitív területek határainak kijelöléséhez kis nagyítású, nagy felbontású fényképeket készítettem a metszetekről. Ezt követően nagy nagyítású objektívvel (40x) az erek alapján tájékozódva Adobe Photoshop CS2 szoftver segítségével berajzolható az egyes területek határa. Munkám során a teljes majom talamuszt (500 μm -ononként vett 50 μm -os metszeteken) vGLUT2 és vGLUT1 festődés alapján feltérképeztem a hét majom esetén. Az így kapott térképeket a megfelelő sztereotaxis koordináták alapján összevetettük egy-

mással. A határvonalak helyességét elektronmikroszkópos metszetekkel validáltuk.

A vGLUT2 pozitív óriásbutonokat tartalmazó területek elkülönítése viszonylag könnyű a vGLUT2-mentes zónáktól, mert a térképezést zavaró, kis méretű terminálisokkal csak egy-egy területen találkoztam (pl. dorzális CL, parafascicular nucleus, dorzális MD), illetve a szubkortikális óriás terminálisok sűrűsége igen nagy ahhoz, hogy a határvonal pontosan meghúzható legyen (a határvonalhoz tartozó sűrűség: 24 buton/mm²).

Mivel vGLUT1 elleni antitesttel a hatodik rétegi kis terminálisok is jelölődtek az óriásbutonok mellett, ezért nagy figyelmet fordítottam a butonok méretbeli elkülönítésére, és csak azokat a területeket neveztem vGLUT1 pozitív zónának, ahol egyértelműen nagyok voltak a terminálisok és számuk meghaladta a 20 buton/mm²-et. A határvonalhoz tartozó igen jelentős sűrűségbeli különbség abból adódik, hogy a kortikális driverek eleve kisebb arányban képviseltetik magukat még a nagyon sűrű területeken is (Van Horn , Sherman, 2007).

A hét majom talamusz egymásnak megfelelő szintjeit összehasonlítottam, és csak azokat a körvonalakat mutatom be, melyek konzekvensen minden majomban jelen voltak (lásd 16. ábra). A térképezés során feltűnt, hogy az LGN elhelyezkedése majomról-majomra változik. Feltehetően ez annak köszönhető, hogy kvázi független dombnak tekinthető a talamusz két oldalán, és helyzete nem annyira a közvetlenül mellette levő talamikus régióktól függ. Természetesen a kisméretű foltok, pl. a pulvinar területén sem estek ugyanabba a pozícióba, de minden majom esetében kimutathatóak voltak. Ezt követően eredményeimet a forgalomban levő majom sztereotaxis atlasz maghatárait alapul véve ábrázoltam (Paxinos és mtsai., 2000).

Az elektronmikroszkópos vizsgálatok során kis nagyítással lefényképeztem az egyes metszetek megfelelő méretű területét, majd ezen minden egyes fellelhető óriásvégződést 20000-szeres nagyítással, melyek pontos helyét a kis nagyítású képeken bejelöltem. Így pontosan megállapítható és összehasonlítható a területek nagysága, illetve az óriásvégzések sűrűsége. (Mivel a vGLUT1 antitest nem penetrál elég jól, így csak abban a zónában számoltam a kortikális óriásvégzéseket, ahol még kimutatható volt a vGLUT1 antitesthez tartozó aranyszemcse jel.) A terminálisok keresztmetszeti felszínét találtuk a terminális méretére vonatkozó legjobb paraméternek. Ahhoz, hogy a különböző régiókból származó RL-típusú axonterminálisokat összehasonlítsuk a következő kritériumoknak kellett

megfelelnie a végződéseknél: többszörös aktív zóna vagy puncta adherentia jelenléte és minimum négy mitokondrium keresztmetszet. Korábbi 3D rekonstrukciós eredményeink alapján (Bartho és mtsai., 2002; Bokor és mtsai., 2005; Lavallée és mtsai., 2005; Bodor és mtsai., 2008; Wanaverbecq és mtsai., 2008) a többszörös mitokondria, aktív zónák és puncta adherentia jelenléte jellemző a terminális legnagyobb keresztmetszeténél. Ezzel, úgy gondoljuk, minimalizálni tudtuk az RL terminálisok mintavételezési hibáját (azt, hogy a buton szélén levő kis keresztmetszeti felszínű mintákat is beszámoljuk az átlagos keresztmetszetbe), illetve elkerültük az RS-típusú végzések téves mintavételezését. A kritériumainknak megfelelő terminálisok keresztmetszetének felszínét NIH ImageJ szoftver segítségével mértük le.

Statisztika

Az axonterminálisok keresztmetszeti felületeinek normál eloszlását Shapiro-Wilk W teszttel teszteltük. Mivel a teszt szignifikáns értéket adott minden csoportban, így a nem normál eloszlás miatt nem-parametrikus statisztikát alkalmaztunk (Kruskal-Wallis teszt, multiple comparison). Mivel a Kruskal-Wallis teszt alapján szignifikáns különbség fedezhető fel a mintában, ezért Bonferroni-korrigált két farkú t -teszttel kerestük meg az egymástól különböző párokat Stasistica 8.0 szoftvert használva.

4.2. Az egér kísérletek módszerei

Vírusinjektálás és perfúzió

Az *in vivo* és anatómiai kísérletekhez felnőtt, hím GABA_A receptor (I77F) γ 2-floxolt egereket használtunk (Wulff és mtsai., 2007). AAV2/1-CMV-Cre (titer: 10¹² GC/ml, Vector Biolabs) vírust alkalmaztunk a talamikus beadásokhoz. Az állatokat intraperitoneálisan injektált ketamine/xylazine (83 mg/testsúly kg ketamine, illetve 3,5 mg/testsúly kg xylazine) keverékéből álló altatóval altattuk. Az állatok testhőmérsékletét folyamatosan ellenőriztük. Az egerek fejét Stoelting vagy Narishige sztereotaxis keretbe rögzítettük, és egy szike segítségével felvagtuk a fejbőrt. Fogorvosi fúrót használva a talamusz VB magjának megfelelő koordinátái felett (Bregmától számított anteroposterior irány: 1,6 - 1,9 mm, mediolaterálisan 1,4 - 1,8 mm) kifúrtuk a koponyát. A vírus adagolásához egy Stoelting mikropumpával összekötött WPI injekciós kittet használtunk. Az injekciós kit teflon csövet ásványi olajjal töltöttük fel, mely lehetővé teszi a pontos mennyiségek adagolását. A kit végéhez egy 60 – 120 μ m végátmérőjű boroszilikát kapillárist csatlakoztattunk. A vírus kapillárisba való felszívását követően beállítottuk a dorzoventrális koordinátát (2,8 - 3,2 mm), majd lassan kb. 0,2 – 0,5 μ l/perc sebességgel 2 – 5 percig pumpáltuk a vírust az állatok talamuszába. Amennyiben szükség volt rá, az ellen oldalon is elvégeztük a vírusbeadáást. Az injektálást követően a koponyát fiziológiás sóoldattal lemostuk, a sebet összevarrtuk, és az állatokat a felébredésükig szemmel tartottuk. A műtétet követően a kiszáradást megelőzendő intraperitoneálisan 0,5 – 1 ml fiziológiás sóoldatot injektáltunk, és az egerek itatójába fájdalomcsillapító Paracetamolt kevertünk.

Anatómiai kísérletekhez a vírusinjektált egereket minimum két héttel az injektálás után túlaltattuk, majd szíven át először jéghideg fiziológiás sóoldattal (2 perc), majd 2% paraformaldehides fixálóval (15 perc), végül 0,1 M-os PB-vel (2 perc) perfundáltuk. Ekkor az állatok agyai viszonylag puhák maradtak, ami a GABA_A receptor festéseknek kedvez.

Fluoreszcens immunhisztokémia

Az agykból kivágott talamikus blokkot Leica Vibratommal 50 μ m-es metszetekre metsettük, majd alaposan 0,1 M-os PB-vel kimostuk. Éjszakára 30%-os cukoroldatba ke-

rültek a metszetek, amiket másnap folyékony N₂ felett alumínium tálcára téve háromszor megfagyasztottunk. Ez a lépés az antigének feltárását teszi lehetővé. Újbóli 0,1 M-os PB-s mosássorozatot után a metszetek készen álltak az immunhisztokémiai reakciókra.

A GABA_A receptor γ 2 alegységét csak a metszetek megemésztése után lehet azonosítani. Azonban sajnos azt tapasztaltuk, hogy az emésztés tönkreteszi a Cre-antitestek által felismert epitópokat, ezért egy trükkhöz folyamodtunk. A metszetek blokkolása után (10% normál kecske szérum, NGS, Vector Laboratories) az egér-anti-Cre antitestet tettük rá csak a metszetekre nagy hígításban (1:30000, Millipore). Másnap a metszetek PB-ben történő kimosása után biotinilált-kecske-anti-egér szekundert (BGAM, 1:600, Vector Laboratories) tettünk a metszetekre, majd avidin-biotin-complex-tiramiddal (1:50, 15 perc) amplifikáltuk a jelet. Ezt követte a metszetek pepszines megemésztése (0,1 mg/ml pepszin 20%-os HCl 0,1 M-os PB oldatban, 10 – 15 perc, 37°C). Újbóli mosások és blokkolás után (10% NGS, Vector Laboratories) kerültek a metszetekre egy éjszakán át a GABA_A receptoralegység primer antitestjeinek egyike (nyúl-anti- γ 2, 1:4000 Synaptic System, nyúl-anti- α 1, 1:500, nyúl-anti- α 4, 1:500, a két utóbbi antitest Werner Sieghart ajándéka) és a tengerimalac-anti-vGAT (1:6000, Synaptic System). Másnap intenzív 0,1M-os PB-s mosás után kerültek a metszetekre a szekunder antitestek: szamár-anti-nyúl-CY3 (1:500, Jackson ImmunoResearch), szamár-anti-tengerimalac-CY5 (1:500, Jackson ImmunoResearch), és a biotin megjelenítésére Streptavidin-Alexa 488 (1:3000, Jackson ImmunoResearch) 3 órán át. Végül a metszeteket kimostuk 0,1 M-os PB-vel, majd tárgylemezre húztuk, fél órán át szárítottuk, végül Vectashielddel (Vector Laboratories) lefedtük.

További kettős immunfluoreszcens festéseket végeztünk egér-anti-NeuN (1:3000, Chemicon) vagy egér-anti-gephyrin (1:1000, Synaptic System) és nyúl-anti-Cre (1:5000, Covance) felhasználásával. Másodlagos antitestnek az azonos állat ellen termeltetett fluoroforral (Alexa 488, CY3) konjugált szamár-antitesteket használtuk.

A konfokális képek Olympus BX.61 mikroszkóppal (Fluoview FV1000 konfokális feltétellel) készültek hatvanszoros nagyításon (1,35 NA), A FluoView10 ASW szoftver segítségével szekvenciális módban, kétszeres Kalman-szűrőt alkalmazva a talamusz ipszi- és kontralaterális oldalán. A lézerintenzitás erősségét a vírusinjektált oldalon állítottam be úgy, hogy a jel erőssége a teljes intenzitástartományt lefedje, de ne legyenek kiégett pixelek. A két oldalon ugyanazokat a beállításokat alkalmaztam.

STORM - STochastic Optical Reconstruction Microscopy

A STORM-os felvételekhez a Dani és munkatársai által publikált 2010-es Neuron Neurotechnique cikke szolgált alapul (Dani és mtsai., 2010).

A metszeteken való könnyebb tájékozódás érdekében a STORM-os felvételekhez felhasznált két vírusinjektált egér talamuszába (ugyanoda, ahol a korábbi vírusbeadás is történt, illetve az ellenoldalra) BDA-t elektroporáltunk ($1 \mu\text{A}$, 7 mp on/off, 7 perc) altatás alatt. Másnap a végaltatott állatokat először fiziológiás sóoldattal (2 perc), majd 4%-os paraformaldehid fixálót alkalmazva megperfundáltam (20 perc). A szuperrezolúciós felvételekhez a perfundált agyakat sagitálisan félbe vágtam, majd Vibratommal $20 \mu\text{m}$ -es (illetve minden 10. metszetet $40 \mu\text{m}$ -es) koronális szeletekre metszettem a lehető leglassabban. Ezt követően 0,1 M-os PB-vel alaposan kimostam a metszeteket. A beadási hely megtalálása érdekében a $40 \mu\text{m}$ -es metszeteken hagyományos immunfluoreszcens eljárással hívtam elő a Cre-pozitív sejteket és a BDA beadási helyét a következő képen: Blokkolónak 10%-os normál kecske szérumot használtam 0,1 M-os PB-ben oldva 30 percre. Majd az elsődleges nyúl-anti-Cre (1:12000, Covance) antitestet éjszakára tettem rá a metszetekre. Másnap alapos PB-vel történő mosást követően a másodlagos antitest (szamár-anti-nyúl-CY3, 1:500, Jackson ImmunoResearch) és A488-Streptavidin (1:3000, Jackson ImmunoResearch) került a metszetekre 3 órán át. Ezt követően a metszeteket tárgylemezre húztam, fél órán át rászárítottam a tárgylemezre, majd Vectashield-del (Vector Laboratories) lefedtem. Epifluoreszcens mikroszkóp segítségével megkerestem a beadási helyeket. Ez alapján kiválasztottam azokat a $20 \mu\text{m}$ -es metszeteket, amin biztosan találkozom majd vírusfertőzött és BDA-val feltöltött sejtekkel is.

Mivel a $\gamma 2$ alegység csak a metszetek megemésztése után jeleníthető meg, ezért enyhe pepszines emésztést alkalmaztam a $20 \mu\text{m}$ -es metszeteket-en (0,1 mg/ml pepszin 20%-os HCl 0,1 M-os PB oldatban, 3 perc, 37°C). A STORM felvételekhez az immunfestések előtt blokkolónak normal ló szérumot (10%) használtunk fél órán át, majd további mosás nélkül kerültek a metszetekre a primer antitestek (éjszakára). A felhasznált antitestek a következők voltak: nyúlban termeltetett GABA_A receptor $\gamma 2$ alegysége elleni antitest (1:4000, Synaptic System), tengerimalacban termeltetett vezikuláris GABA transzporter elleni antitest (1:6000, Synaptic System) és egér-anti-Cre (1:4000, Millipor). Másnap a metszeteket 0,1 M-os PB-vel alaposan kimostuk, majd a kifejezetten STORM

képkalkotó eljáráshoz készített STORM szekunder antitesteket tettük a metszetekre 4 órán át (Katona István csoportjának ajándéka, Dudok Barna által készített antitestek) a hagyományos fluoreszcens számár-anti-egér-CY3 és az A488-Streptavidin (1:3000, Jackson ImmunoResearch) mellett. A STORM-os másodlagos antitestek a következők voltak: ló-anti-nyúl-Alexa405/A647 (1:50) és ló-anti-tengerimalac-CY3/A647 (1:55). Ezt követően a metszeteket újból alaposan kimostuk, majd egyesével fedőlemezre húztuk őket. A fedőlemezre való felhúzásra azért volt szükség, mert így ahhoz az üveghez tapad ki a metszet, amelyik oldalról a STORM felvételek is készülni fognak. Az egyenletes, hullám mentes kitapadás elengedhetetlen a jó felvételek készítéséhez. A metszeteket további lefedés nélkül, szárazon 4 °C-os hűtőszekrényben tartottuk, amíg felhasználásra nem kerültek.

A metszeteket közvetlenül a felvételek készítése előtt fedtük le egy frissen készített fedőoldattal, ami a következőket tartalmazta: 80 μ l 1M DPBS (Sigma D8537), 10 μ l 50 %-os glükóz oldat desztillált vízben oldva, 10 μ l 0,5 M mercaptoethylamine (pH 8,5) és 1 μ l Glox (anti-bleaching oxigén scavenger rendszer - 10 mg glükóz oxidáz, 32 μ l kataláz és 93 μ l DPBS keverékéből). A fedőoldat sajátosságaiból adódóan csak rövid ideig, maximum 3 órán át lehetett szuperrezolúciós felvételeket készíteni, ezért is kellett egyesével tárolni a metszeteket. A STORM felvételek a KOKI Nikon központjában a Nikon-STORM-C2 mikroszkóp segítségével készültek, a Nikon NIS-Elements 4.01 STORM 2.0 modul programját használva.

A képkalkotás menete röviden: kis nagyítású objektívvel (10x, 20x) epi-fluoreszcens megvilágításban megkerestem a BDA jelölt sejtek régióját, majd kamerát váltva készítettem egy konfokális felvételt a CY3-al megjelölt Cre-pozitív sejtekről. 100-as olajos objektívre váltva (CFI Apo 100x oil NA 1.49 TIRF WD 0.12) ismét epi-fluoreszcens megvilágításban megkerestem a metszet felszínét, majd visszaváltottam a Nikon C2-es konfokális kamerájára. Ekkor készítettem egy réteg-sorozatfelvételt (150 nm lépésenként), amin látható volt egy zölden jelölt sejttest (vagy dendritszakasz), illetve az 647-es hullámhosszú csatornán megjelent mind a két STORMos antitesttel jelölt struktúra: a γ 2 alegység és a vGAT. A STORM képkalkotás térbeli felbontóképessége nagy Z-irányú stabilitást követel meg a mikroszkóptól. A megfelelő stabilitás egy optikai alapú korrigáló rendszerrel lehetett elérni, amit a Nikon a Perfect Focus System (PFS) megoldásával biztosít. A megfelelő képsíkban aktiváltam a PFS-t, majd a STORM Andor (iXon 897 back-illuminated

EMCCD) kamerájára váltottam. Szuper-rezolúciós képalkotás (3D STORM) eljárást alkalmaztam, ami lehetővé teszi a metszet 700 nm-es vastagságán belül a STORM jelek pontos lokalizációját. A képalkotás során a TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) rendszert használva ferde (45°-os) megvilágítást alkalmaztam, a képeket pedig az Andor (expozíciós idő: 30 ms, EM erősítés: 300, Konverziós faktor 2,4) kamerával rögzítettem. A STORM felvételek szekvenciálisan készültek, 1000 – 3000 cikluson át. Egy ciklusban nyolc kép készült:

- Aktivátor megvilágítás 1. (405 nm alacsony intenzitás, 50 mW lézer 1%)
- Riporter megvilágítás 1. (647 nm nagy intenzitás, 300 mW lézer 100%)
- Riporter megvilágítás 2. (647 nm nagy intenzitás, 300 mW lézer 100%)
- Riporter megvilágítás 3. (647 nm nagy intenzitás, 300 mW lézer 100%)
- Aktivátor megvilágítás 2.(561 nm alacsony intenzitás, 100 mW lézer 0.5%)
- Riporter megvilágítás 4. (647 nm nagy intenzitás, 300 mW lézer 100%)
- Riporter megvilágítás 5. (647 nm nagy intenzitás, 300 mW lézer 100%)
- Riporter megvilágítás 6. (647 nm nagy intenzitás, 300 mW lézer 100%)

Az eljárás során a képalkotás mindig a riporter csatornában történik, de a felvillanások közül ki kellett még szűrni a specifikus jeleket. A végső képre csak azok a felvillant pontok kerültek fel, amelyek közvetlenül az aktivátor lézer felvillanása után jelentek meg, és ezt követően rögtön el is tűntek; illetve a felvillant fluoroforok a megkívánt mélységből származtak, tehát a jelalakjuk nem torz. Miután véget ért a több ezer cikluson át tartó STORM képalkotás, visszaváltottam a konfokális C2 kamerára. Mivel a CY3, mint aktivátor molekula is szerepelt az antitestjeim között, ezért nagy nagyításon korábban még nem tudtam letesztelni, hogy valóban Cre tartalmú (CY3-antitesttel előhívott) sejt fölött jártam-e, mert egy konfokális kép készítése kiégette volna az anti-tengerimalac-CY3/A647-es aktivátor molekuláját. A STORM felvétel befejeztével azonban ennek semmi akadálya nem volt, így az ekkor készült felvétel alapján döntöttem arról, hogy milyen területen járok. Végül a Nikon saját szoftverével cross-talk szelekciót használva kiszelektáltam a valóban specifikus pontokat. Utólag Adobe Photoshop CS2 használatával illesztettem össze a konfokális és STORM-mal készült felvételeket.

***In vitro* elektrofiziológia**

Vírusinjektáláshoz 19 - 21 napos $\gamma 2$ (I77F) floxolt egereket használtam mindkét nemből (kivéve a tónusos GABA_A áram mérésekhez, ahol csak hím egereket, ugyanis nőstényekben a neuroszteroidok hatása miatt a tónusos áram nagysága is az ösztroz ciklusnak megfelelően változik (Brickley , Mody, 2012)). Kétféle vírust használtam a talamikus bilaterális beadásokkor: AAV2/1-CMV-eGFP-t (titer: 10¹² GC/ml, Vector Biolabs) és AAV2/1 CMV-Cre-t (titer: 10¹² GC/ml, Vector Biolabs) fele arányban keverve a AAV2/1-CMV-eGFP vírussal. Az egerek injektálásának folyamata megegyezett az anatómiára és *in vivo* elektrofiziológiára használt egerek műtétével.

Whole-cell patch-clamp mérések

A vírusbeadást követően (1 - 3 hét) az egereket feláldoztam. Röviden, az állatokat mélyen elaltattam isofluránnal, és további ketamine-xylazine alkalmazásával fenntartottam a mélyalvást. Ezt követően transzkraniálisan jéghideg oxigenizált (95% O₂ - 5% CO₂) mesterséges magas cukor tartalmú cerebrospinális folyadékkal (artificial cerebrospinal fluid, ACSF) két percen át perfundáltam az egereket. A magas cukor tartalmú ACSF oldat a következőkből állt (mM-ban kifejezve): 65,5 NaCl, 26 NaHCO₃, 2,5 KCl, 1,25 NaH₂PO₄, 105 szacharóz, 24,7 glükóz, 7 MgCl₂, 0,5 CaCl₂, 1,7 L(+)-aszcorbinsav. Az agyakat ezután gyorsan kiszedtem a koponyából, és ugyanabba az oldatba helyeztem. 300 μ m vastag horizontális, a VB-t és az nRT-t egyaránt tartalmazó szeleteket vágtam vibratom segítségével, majd a szeleteket oxigenizált, ACSF tartalmú tárolókamrába helyeztem. Az ACSF a következő összetevőkből állt (mM-ban kifejezve): 131 NaCl, 26 NaHCO₃, 2,5 KCl, 1,25 NaH₂PO₄, 1,2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 18 glükóz, 1,7 L(+)-aszcorbinsav. A szeletek regenerálódása érdekében myo-inozitol (3 mM) és Na-piruvátot is tettem a kamrába. Az agyszeleteket 30 percen át 35 °C-on, majd a továbbiakban szobahőmérsékleten tartottam a felhasználásig. Felhasználáshoz a mérőkamrába szállítottam a sejteket, melyen keresztül 3,5 ml/perc sebességgel folyattam az oxigenizált ACSF-et, illetve az abban oldott drogot.

Az eGFP tartalmú vírus injektált talamokortikális sejteket OptoLED Lite (Cairn Research, UK) fluoreszcens megvilágítással azonosítottam, a környező régióból vezettem el sejteket. A képalkotás Andor EM-CCD kamera (Axon DU-897) és Andor Solis imag-

ing szoftver V. 4.16 segítségével történt. Az elvezetésekhez MultiClamp 700B erősítőt és Clampex V. 10. 2 (Molecular Devices) programot használtam. Az adatpontok 5 kHz frekvenciával lettek mintavételezve és 2 kHz-en szűrve.

Spontán események elvezetése

A VB sejtekből elvezetett spontán IPSC-k (sIPSC) mérésekor az intracelluláris pipetta a következőkből álló oldatot tartalmazta (mM-ban kifejezve): 120 CsCl, 10 HEPES, 2 EGTA, 8 NaCl, 0,2 MgCl₂, 5 QX-314-Cl, 0,2 Na-GTP, 10 foszfo-kreatin és 0,5% biocytin (295 mOsm, pH 7,35). Az inward gátló áramok izolálásához 6,7- dinitroquinoxalin-2,3-dion-t (DNQX; 40 μM; Tocris) és D,L-2-Amino-5-phosphonopentánsavat (DL-APV; 100 μM; Tocris) adtam az ACSF-hez. A sIPSC-eket -50 mV tartófeszültségen mértem legalább 5 percig. Mivel a liquid junction potential kisebb volt mint 5 mV, nem vettem figyelembe. A pipetta series rezisztenciáját folyamatosan ellenőriztem -10 mV-os teszt pulzus segítségével az egész mérés során. Csak azokat a sejteket vettem bele a végső analízisbe, amelyek series rezisztenciája kisebb volt 20 mΩ-nál, és az ellenállásban bekövetkező változás nem volt nagyobb, mint 25% a teljes mérés során. A tónusos GABA_A áram mérésére a GABA_A receptor blokkoló gabazine-t adtam az oldathoz (SR 95531 hydrobromide/ 6-imino-3-(4-metoxifenil)-1(6H)-piridazin butánsav hidrobromid; 10 μM; Tocris) és a bemosódást követően minimum három percig mértem. A tónusos áram megfelelt a gabazine alkalmazás előtti és azt követő tartóárambeli különbségnek. A drog bemosása előtti és utáni elvezetések 20 – 20 másodperces szakaszain all-point hisztogramokat készítettem, melyekre Gauss görbét illesztve megkaptam az áramok átlagát és szórását.

Kiváltott válaszok mérése

Kiváltott monofázisos IPSC-k méréséhez a monopoláris stimulációs elektródot az nRT-ba helyeztem, és a VB sejteket 34 °C-on mértem. A patch pipetta ugyanazt az intracelluláris oldatot tartalmazta, mint a spontán események elvezetésekor. Glutamáterg blokkolókat használtam a gátló inward áramok izolálására. Monofázisos IPSC-eket 0,2 Hz-el és 10 Hz-el váltottam ki 100 μA-es stimuláló intenzitást használva.

A kiváltott nRT burst indukálta IPSC-k (burst IPSC) mérésekor a patch pipetta a következőket tartalmazta (mM-ban kifejezve): 140 KCH₃SO₄, 10 KCl, 10 HEPES, 0,1

EGTA, 2 MgCl₂, 4 Mg-ATP, 2,5 QX-314-Cl, 0,2 Na-GTP, és 10 foszfokreatin (306–309 mOsm, pH 7,23). A VB sejteket -30 mV tartófeszültségen mértem. A liquid junction potenciált figyelembe vettem, mivel -10 mV volt. A kiváltott monofázisos IPSC-k mérésével szemben, a burst IPSC-k mérésekor a mérőoldat nem tartalmazott glutamáterg blokkolókat. A burst IPSC-eket minden 30 – 60 másodperceben váltottam ki 250 μ A-es stimuláló intenzitást használva.

A kiváltott burst IPSC-k farmakológiai tanulmányozása során a következő oldatot használtam: GABA_B receptor blokkoló CGP55845 hidroklorid (2 μ M; Abcam).

A kiváltott burst IPSC áram-feszültség összefüggésének mérésére, és ahhoz, hogy a Cl⁻ ekvilibrum potenciálját meghatározzam, a patch pipettát a következőkből álló oldatot tartalmazta (mM-ban kifejezve): 120 CsGluconate, 10 CsCl, 10 HEPES, 8 NaCl, 0,2 EGTA, 14 foszfokreatin, 2 Mg-ATP, 0,2 Na-GTP (305 mOsm, pH 7,3). A liquid junction potenciált figyelembe vettem (-10 mV).

Talamikus visszacsapó burst mérések

A rebound burst mérésekhez kontroll, nem vírusfertőzött talamokortikális szeleteket használtunk. A pipetta mérőoldata megegyezett a kiváltott burst IPSC-k mérésekor használt intracelluláris oldattal hozzáadott QX-314-Cl nélkül. A talamokortikális sejtek -70 mV tartófeszültségen lettek lemérve current clamp módban. Áram protokollként a korábban kontroll és γ 2^{-/-} VB sejtekből kiváltott burst IPSC-eket használtunk különböző amplitúdóra skálázva. Az elektrofiziológiai méréseket Chiara Pellegrini végezte.

Analízis

A mérések off-line analíziséhez Clampfit V.10.2-es és MiniAnalysis 6.0 (Synaptosoft) szoftvert használtam. A spontán események esetén a root-mean-square (RMS) zaj érték kiszámításához egy IPSC nélküli 60 ms hosszú időablakot választottam. Az IPSC-k minimális csúcsának az RMS zaj kétszeresét állítottam be, mint detekciós kritérium. Gabazine alatt történt elvezetések alkalmazva ezeket a paramétereket egyetlen IPSC-t sem talált a szoftver.

Kiváltott burst IPSC-k esetén a kontroll és manipulált értékek minden esetben legalább négy-négy válasz átlagából származnak. A burst IPSC amplitúdójának megfelelő

értéket úgy kaptam, hogy a kiváltott áram csúcsánál mért értékből kivontam a stimulációs artefaktot megelőző tartó áram értékét. A 10 – 90%-os rise-time kiszámítása helyett a csúcsig eltelt időt használtam, ugyanis a burst IPSC multifázisos esemény, így a rise-time értékek nem informatívak. A lecsengési időállandót (decay-time constant) úgy kaptam meg, hogy a maximális amplitúdó utántól a burst IPSC teljes lecsengéséig illeszttem egy monoexponenciális görbét, melynek τ értéke megadta az időállandót. A töltés átvitel kiszámításához a burst IPSC görbe alatti területét vettem.

Statisztikailag szignifikáns különbségek kiszámításához Student-féle t -tesztet használtam. A szignifikancia szintet $p < 0,05$ értéknek választottam. Mind a szövegben és az ábrákon az adatok átlag \pm SD-ként vannak ábrázolva.

***In vivo* elektrofiziológia**

In vivo mérésekre 3 - 8 héttel a vírusinjektálást követően került sor. A kortikális mezőpotenciálok (LFP) meghatározásához 16-csatornájú silicone probe-okat használtunk a primer szomatoszenzoros kéregben (S1, AP 1,2 és ML 3,2 mm a Bregmától). A talamikus multiunit aktivitás monitorozásához 32-csatornájú silicone probe-ot használtunk a vírusbeadással megegyező koordinátákat használva. A silicone probe-bal mért jeleket 0,3 Hz felett szűrtük, 2000-szeresére erősítettük egy 64-csatornás erősítővel, digitalizáltuk 20 kHz-en két National Instruments PCI-6259 kártya segítségével. A talamokortikális egység aktivitás méréséhez 0,5 M-os NaCl és 2% neurobiotin (Vector Laboratories) tartalmú üveg mikropillárist (10–40 M Ω) használtunk. Az idegsejtaktivitást DC erősítővel amplifikáltuk (AxoClamp 2B, Molecular Devices) és 0,16 és 5 kHz között szűrtük egy további erősítővel (LinearAmp, Supertech). A sejtek juxtacelluláris jelölése a korábban publikáltakkal megegyező módon történt (Pinault, 1996).

Burst detekció és analízis

Minden *in vivo* mérés Matlab programmal (Mathworks MA) lett kianalizálva. Önkényes intra- és interburst intervallumok meghatározása helyett egy félautomata burst detekciós módszert használtunk (Slézia és mtsai., 2011). A burstök azonosítása után a következő paramétereket határoztuk meg: átlagos tüzelési frekvencia, a burstök első akciós potenciáljának a frekvenciája (burst frekvencia), a burstön belüli tüzelések frekvenciája (intraburst frekvencia), a burstön belüli átlagos tüzelések száma (intraburst spike number -

IBSN), a burstök átlagos hossza (burst hossz), végül a burstön belüli akciós potenciálok aránya az összes akciós potenciálhoz képest (burstiness index). A csoportok közti eltérést Mann-Whitney U teszttel ellenőriztük, a szignifikanciaszintet $p > 0,05$ értékben határoztuk meg.

LFP analízis. Az LFP elvezetésekkel mért lassú oszcilláció frekvenciáját speciális Matlab rutinok segítségével határoztuk meg: wavelet spektrumok analízisével, Fourier transzformációval és autokorrelációval.

Spindle analízis. A spindle oszcillációk talamikus multiunit aktivitásból történő fél-automata detektálására Barthó Péter által írt Matlab rutint használtuk. A program által talált orsókat minden esetben vizuálisan is ellenőriztük, a rosszul beazonosított jeleket töröltük.

Szabadon mozgó állatok elvezetései

Az EEG és EMG mérésekhez 4 – 4 AAV-GFP és AAV-Cre vírussal bilaterálisan injektált $\gamma 2$ egeret használtunk. A fronto-parietális elektródok beültetését a korábban publikáltakkal megegyezően végeztük (Franken és mtsai., 1998; Wimmer és mtsai., 2012). Röviden: izofluránnal történő előaltatást követően az egereket elaltattuk ketamine/xylazine altató keverékkel (100 mg/testsúly kg ketamine és 16 mg/testsúly kg xylazine). Az egerek fejét sztereotaxis állványba fogva a koponyába összesen hat arany csavarelektrodot helyeztünk (3 jobb és 3 bal oldalt), melyből a jobb oldali rostrális és kaudális elektródot használtuk a fronto-parietális ECoG mérésekhez. Az EMG mérésekhez használt elektródokat óvatosan a nyak izomzatába helyeztük. Tíz nap felépülési idő után az elektródokat rácsatlakoztattuk a mérő kábelekre, majd további egy hét habituáció után kezdtük el a méréseket. Az analóg jeleket felerősítettük (2000x), majd az ECoG jeleket 0,7 Hz, a EMG jeleket 10 Hz fölött szűrtük. Az alvási EEG-t és EMG-t 4 másodperces szakaszokra osztottuk, majd vizuálisan kategorizáltunk minden egyes szakaszt ébrenlétre, NREM és REM alvási állapotra.

5. EREDMÉNYEK

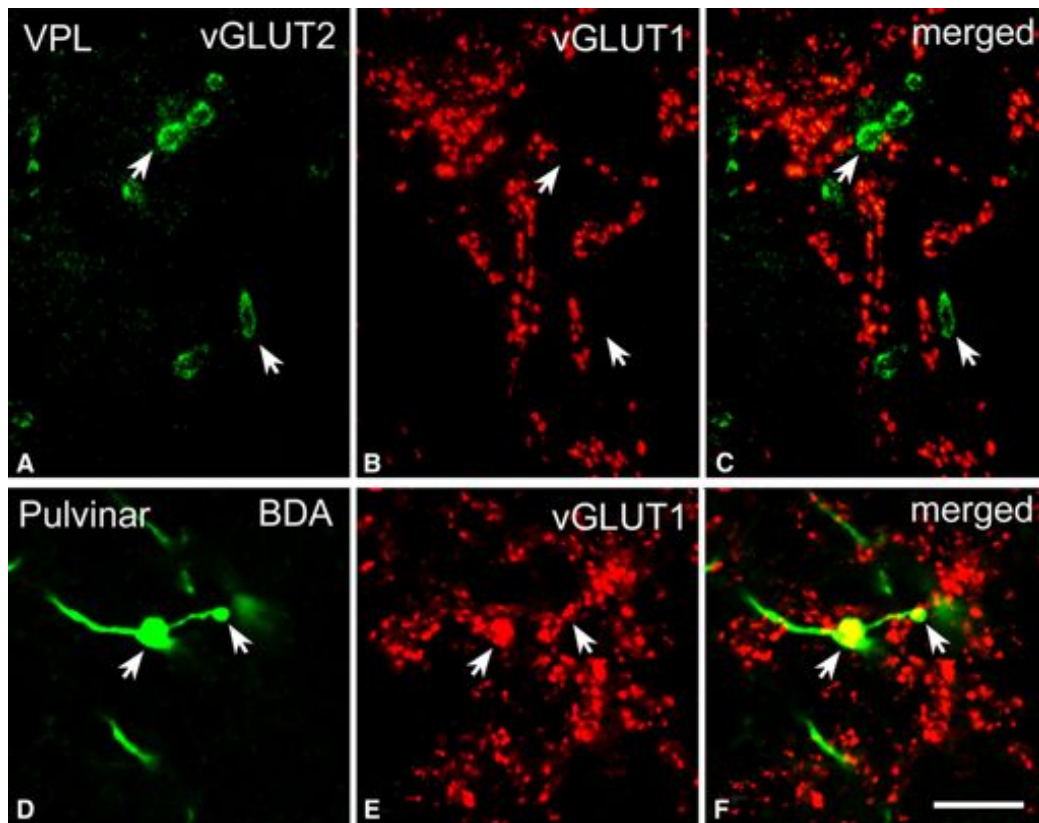
5.1. A driver bemenetek eloszlása a főemlősök talamuszában

A munkám során a *Macaca mulatta* talamikus magjainak elnevezéséhez a 2000-es kiadású Paxinos atlaszt vettem alapul, a magok neveit ennek megfelelően angolul használtam. A továbbiakban driver vagy serkentő óriásterminálisként utalok minden olyan axonvégződésre, ami elektronmikroszkópos szinten az alábbi kritériumoknak megfelel: többszörös aktív zóna vagy puncta adherentia jelenléte és minimum négy mitokondrium keresztmetszet. Korábbi 3D rekonstrukciós eredményeink alapján (Bartho és mtsai., 2002; Bokor és mtsai., 2005; Lavallée és mtsai., 2005; Bodor és mtsai., 2008; Wanaverbecq és mtsai., 2008) a többszörös mitokondria, aktív zónák és puncta adherentia jelenléte jellemző a terminális legnagyobb keresztmetszeténél. Mivel csak anatómiai módszerekkel vizsgáltuk a talamuszt, az eredményekből nem következik az, hogy ezek a végzések funkcionálisan is „drivererek” lennének.

5.1.1. vGLUT1 és vGLUT2, mint a kortikális és szubkortikális serkentő terminálisok markere

Ahhoz, hogy egyértelmű képet kapjunk a kortikális és szubkortikális óriásbemenetek elrendeződéséről a talamuszban, a hagyományosan használt pályakövető eljárások helyett immuncitokémiai markereket kell választanunk. Hisz a pályakövető anyagok segítségével lehetetlen minden rostot megjelölni, így sokszor megismételt beadások után is csak hozzávetőleges információval rendelkezhetünk egy adott pálya lefutásáról.

Mivel mi a serkentő driver bemenetei alapján kívántuk felosztani a főemlősök talamuszát, így szükségünk volt egy olyan markerre, ami alapján egyértelműen elkülöníthetőek egymástól a kéreg felől és a kéreg alatti struktúrák felől érkező serkentő végzések. Mind a vGLUT1-et, mind a vGLUT2-t széles körben alkalmazzák a kortikális és szubkortikális axonvégzések szelektív megjelölésére (Lavallée és mtsai., 2005; Graziano és mtsai., 2008; Masterson és mtsai., 2009), így mi is ezt a két markert választottuk a munkánk során. Azt, hogy az általunk használt anyagon is egyértelműen elkülöníthető festést eredményez a két antitest elleni immunreakció, kétféleképpen teszteltük: egyrészt kettős fluoreszcens immunjelöléssel (6. ábra A - F), másrészt DAB és ezüst intenzifikált aranszemcse jelöléssel, melyet elektronmikroszkópos szinten is megvizsgáltunk (10. és



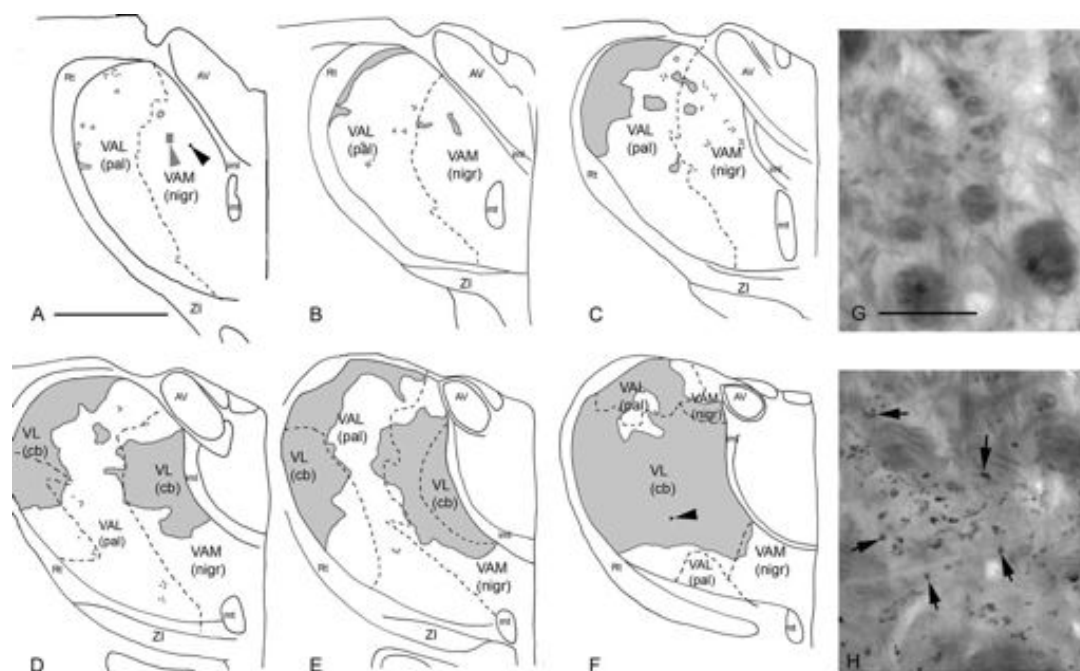
6. ábra. Nagy nagyítású fluoreszcens képek vGLUT1- és vGLUT2-immunoreaktív terminálisokról. A-C, A vGLUT2 (A, zöld) és a vGLUT1 (B, piros) fehérjék egymással nem átfedő axonvégződéseknél találhatók a majom VPL-ben. A nyilak szubkortikális óriásvégződésekre mutatnak. D-F, A capsula internából származó anterograd módon megjelölt végződés (zöld színben, D) vGLUT1-immunoreaktivitást mutat (piros fluoreszcens jelölés, E) a pulvinar területén. Skála: 10 μm .

15. ábra). Egyik módszer sem utalt a két antigén együttes előfordulására egy terminálison belül, ami a terminálisok különböző eredetére utal.

Három állatban az agykéreg különböző területeire anterograd pályakövető anyagot (biotinilált dextrán amin, BDA) adtunk be. A BDA-jelölt kortikális óriásterminálisok térbeli eloszlása átfedett a vGLUT1-immunoreaktív óriásterminálisok elhelyezkedésével. A pályakövető és immuncitokémiai módszer együttes alkalmazása megerősítette a korábbi kettős immunjelölés eredményeit. Mindezt a vGLUT1 és BDA kolokalizációja is bizonyítja az 6. ábrán.

5.1.2. Óriás vGLUT2 tartalmú végződések a talamuszban

A vGLUT2 immunjelölés nagy méretű ($2 - 7 \mu\text{m}$) szabálytalan alakú struktúrákat jelölt meg számos talamikus régióban (8. ábra) fénymikroszkópos szinten. Elektronmikroszkópos mintát véve két jól karakterizált elsőrendű talamikus régióból, a lateral geniculate nucleus (LGN), a ventral posterolateral és posteromedial (VPL/VPM) területéről beigazolódott, hogy a fénymikroszkóppal megfigyelt struktúrák valójában RL-típusú nagy axonvégzések voltak, melyek több mitokondriumot tartalmaztak, illetve többszörös szinapszist és puncta adherentia sort képeztek a célelemükkel (8. ábra). Emellett gyakran vezikula-tartalmú dendrit volt a célelem (triádot alkotva), ami ugyancsak jellemző a jól karakterizált RL-típusú végzésekre (Colonnier, Guillery, 1964). Az elektronmikroszkópos mintákban minden RL-típusú végződés pozitív volt a vGLUT2 immunjelölésre ($n = 160$), míg más struktúrák nem. A vGLUT1 immunjelölés egyetlen RL-típusú terminálist sem jelölt meg a vizsgált régiókban. A terminálisok méretét egyedi elektronmikroszkópos szinteken mértük le (lásd Anyagok és módszerek fejezet). Mivel a terminálisok méreteinek halmaza nem normál eloszlású volt, hanem a nagyobb méretek felé ferde eloszlást mutatott (Shapiro–Wilk teszt, $W = 0,941$, $p = 0,0264$ az LGN-re és $W = 0,821$, $p = 0,000001$ VPL-re) nem-parametrikus statisztikai teszttel hasonlítottuk össze a különböző területekről származó értékeket. Az RL-típusú terminálisok mérete nem különbözött az LGN-ben a VPL RL-típusú terminálisaitól (LGN medián, $6,02 \mu\text{m}^2$; elsőől harmadik kvartilis, $4,63 - 8,46 \mu\text{m}^2$; $n = 44$; VPL medián, $4,45 \mu\text{m}^2$; elsőől harmadik kvartilis, $3,20 - 6,12 \mu\text{m}^2$; $n = 116$; $p = 0,913$). A nagy vGLUT2-es végzések egyenlőtlen térbeli eloszlást mutattak a talamuszban. Sűrű vGLUT2 pozitivitás jellemezte a fő szenzoros magokat, mint az LGN (retinális bemenetek), VPL/VPM (szomatoszenzoros bemenetek) és a MGN anterior része (inferior colliculus közvetítette hallási bemenetek) (8. ábra C). Mindez megegyezik az irodalomban fellelhető adatokkal (Colonnier, Guillery, 1964; Wilson, 1989; Boivie, 1979; Rausell és mtsai., 1992; Molinari és mtsai., 1995). A sűrű vGLUT2 jelölés a VPL/VPM komplextől rostrálisan is elnyúlt, és kiterjedt a teljes ventrolateral nucleus (VL) területére. Ezek a szubkortikális bemenetek a mély kisagyi magok felől érkeznek (Rouiller és mtsai., 1994; Percheron és mtsai., 1996). Ahol a motoros talamusz (VL) összeolvadt a laterális pallidorecipiens, illetve mediális nigrorecipiens talamusszal (laterális, ill. mediális ventral anterior nucleus, VAL, ill. VAM) a vGLUT2



7. ábra. A vGLUT2 immunjelölés térbeli eloszlása a majom motoros talamuszában. A-F, Szürkével színezett régiók jelölik a vGLUT2-immunoreaktív óriásterminálisokat tartalmazó talamikus régiókat hat koronális talamusz metszeten. A rajzokon feltüntetett maghatárok Paxinos 2000-es atlaszából származnak (cb, cerebellorecipiens talamusz; nigr, nigrorecipiens talamusz; pal, pallidorecipiens talamusz). A vGLUT2-es régió (szürke) nagy vonalakban egybeesik az atlaszban feltüntetett cerebellorecipiens területtel. A B és C ábrán látható vGLUT2-es foltok megegyeznek a kisagyra vonatkozó pályakövető vizsgálatok során kapott foltokban megjelenő cerebelláris végződésekkkel. G, H, Nagy nagyítású fénymikroszkópos felvételek vGLUT2-immunfestett nigrorecipiens (G) és cerebellorecipiens (H) talamuszból. A nagy vGLUT2-pozitív terminálisok teljes mértékben hiányoznak a nigrorecipiens talamuszból, míg sűrűn borítják a cerebellorecipiens talamuszt (nyílak). Az A ábrán feltüntetett szürke nyílhegy az elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz átágyazott régióra mutat, míg a fekete nyílhegyek az A és F ábrán a G és H fénymikroszkópos képek helyeire mutatnak. Rövidítések: mt, mammillothalamic tract; AV, anteroventral nucleus; ZI, zona incerta; Rt, reticular nucleus; iml, internal medullary lamina; VAL, ventral anterior nucleus, lateral part; VAM, ventral anterior nucleus, medial part; VL, ventrolateral nucleus. Skála: A–F, 2 mm; G, H, 50 μ m

jelölés is foltokra esett szét.

A talamusz rostrális metszetein az anterior magcsoport mutatott még sűrű vGLUT2 jelölést, az emlő alakú testek felől érkező szubkortikális bemenetnek megfelelően (Vicq d' Azyr, 1786) (7. és 8. ábra).

Elektronmikroszkópos vizsgálatokkal igazoltuk, hogy a fénymikroszkóppal nagynak látszó vGLUT2-pozitív végzések valóban RL-típusúak voltak, sőt minden RL-típusú

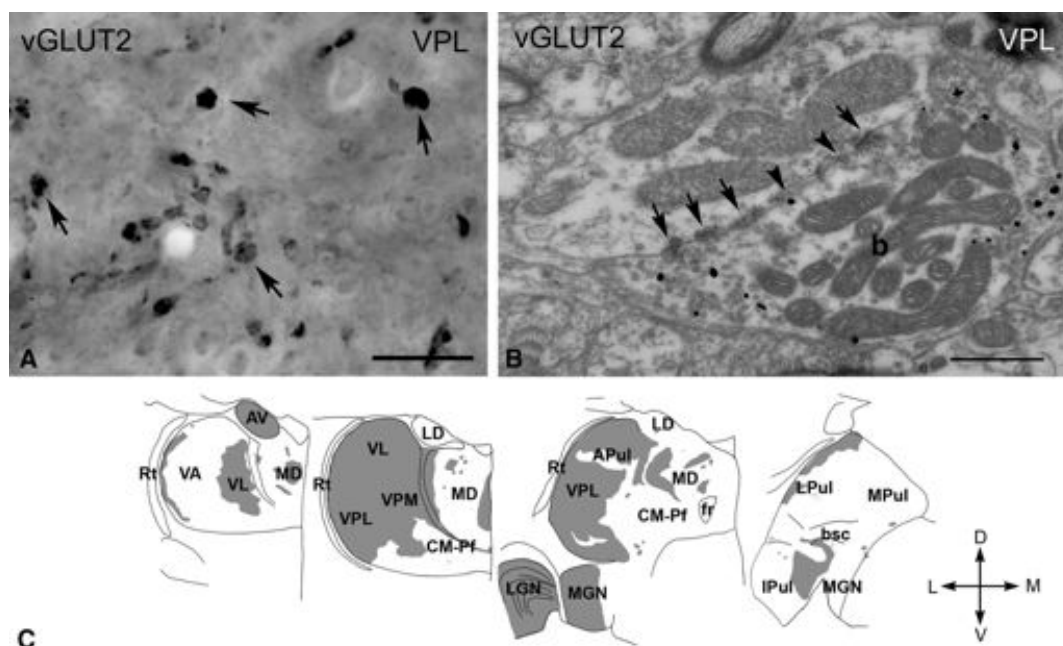
végződés vGLUT2-pozitivitást mutatott, míg más struktúra nem. A vGLUT1 immunjelölés nem jelölt meg egyetlen RL-típusú terminálist sem a vizsgált régiókban.

Érdekes módon több, korábban magasabbrendű funkciókkal azonosított (tehát kortikális driver beidegzéssel jellemzett) talamikus régióba érkezett kéreg alatti struktúrákból serkentő irányító bemenetet (8. ábra C). Ilyen területek a mediális mediodorsal nucleus a mellette található midline magokkal együtt, a rostrális intralamináris mag (CL) a mediodorsal nucleus paralamelláris részével együtt, és az anterior és laterális pulvinar egyes részei. Ezzel ellentétben, a talamusz nagy részéről teljesen hiányoztak a szubkortikális irányító bemenetek (8. ábra C).

5.1.3. Óriás vGLUT1 tartalmú végzódések a talamuszban

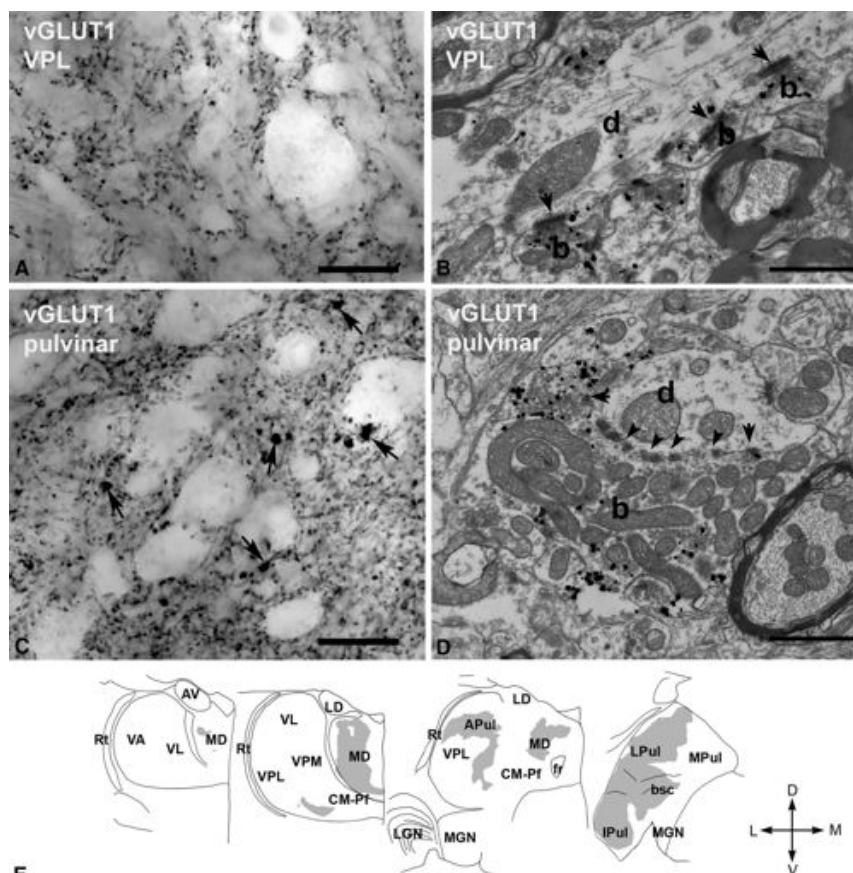
A kettős kortikális beidegzésnek megfelelően (hatodik és ötödik rétegi piramis sejtek felől érkező bemenetek) kis és nagy méretű vGLUT1 tartalmú végzódéseket tudunk elkülöníteni a talamuszban fénymikroszkópos szinten (Rouiller , Welker, 2000). A kis méretű (< 1 μm átmérővel rendelkező) végzódések sűrűn beborították a teljes talamusz területét (9. ábra A, C). Elektronmikroszkópos szinten a kis méretű terminálisokról kiderült, hogy valóban kortikális hatodik rétegből származó RS-típusú végzódések: egyszeres szinapszist alkottak a célelemükkel, nem rendelkeztek punctum adherens sorral, és ritkán tartalmaztak mitokondriumot (9. ábra B) (Jones , Powell, 1969; Ralston , Herman, 1969). A kis terminálisok keresztmetszetének területe egy nagyságrenddel kisebb volt, mint az RL-típusú terminálisok területe (medián, 0,47 μm^2 ; elsőől harmadik kvartilis, 0,19 – 1,09 μm^2 ; n = 58 a VPL-ben mérve; p = 0,000001).

Fénymikroszkópos szinten a talamusz nagy részét kizárólag kis méretű kortikális serkentő végzódések borították be (9. ábra A, B). Azonban akadtak olyan régiók is, ahol egyértelműen elkülöníthető vGLUT1-tartalmú óriásvégzódéseket lehetett azonosítani a kis kortikális végzódések mellett (9. ábra C, D). Elsősorban a mediodorsalis és a pulvinar magok területén talákoztunk vGLUT1-pozitív óriásterminálissal (9. ábra E); mindez megegyezik a pályakövető vizsgálatok eredményeivel (Schwartz és mtsai., 1991; Takta-kishvili és mtsai., 2002; Cappe és mtsai., 2007). Emellett egy kis régióban a VPL/VPM és a VL magoktól ventrálsan szintén előfordultak kortikális irányító bemenetek. Egyes vizsgálatok szerint ez a talamikus régió a ventral posteroinferior mag (VPI) (Jones, 2007), és feltehetőleg a fájdalom érzékelésben lehet szerepe (Apkarian , Shi, 1994).



8. ábra. vGLUT2-immunoreaktív végződések a makákótalamuszban. A, Fénymikroszkópos felvétel egy DAB-Ni kromogénnel előhívott vGLUT2-pozitív terminálisról a VPL területéről. B, Nagy nagyítású elektronmikroszkópos kép egy vGLUT2-pozitív terminálisról (b), ahol ezüst intenzifikált arany szemcsé volt a kromogén (apró fekete szemcsék). Az axonvégződés egy tipikus RL-típusú végződés: nagy méretű, többszörös mitokondria keresztmetszettel, puncta adherentia sorral (nyílhegyek), többszörös szinapszissal (nyilak) rendelkezik. C, A nagy vGLUT2-pozitív terminálisok térbeli eloszlása a majom thalamusz négy koronális szintjén. Ezen a négy szinten is jól látszik, hogy nagy területekről teljesen hiányoznak a vGLUT2 jelölődésű terminálisok. Rövidítések: APul, anterior pulvinar; AV, anteroventral; bsc, brachium of superior colliculus; CM-Pf, centromedian–parafascicular; fr, fasciculus retroflexus; IPul, inferior pulvinar; LD, laterodorsal; LGN, lateral geniculate nucleus; LPul, lateral pulvinar; MD, mediodorsal; MGN, medial geniculate nucleus; MPul, medial pulvinar; VA, ventral anterior; VL, ventrolateral; VPL, ventral posterolateral; VPM, ventral posteromedial; Rt, reticular thalamus. Skála: A, 20 μm ; B, 0,5 μm .

Elektronmikroszkópos vizsgálatokkal igazoltuk, hogy a laterális pulvinarban fénymikroszkóppal azonosított vGLUT1-pozitív óriásterminálisok megfeleltek az RL-típusú axonvégzések kritériumának (nagy méret, többszörös szinapszis, punctum adherentia sor, számos mitokondrium, triádok jelenléte; 9. ábra D). Tulajdonságaik alapján megállapítottuk, hogy valójában kortikális ötödik rétegi végzésekkel volt dolgunk (Deschênes és mtsai., 1994; Bourassa, Deschênes, 1995; Bourassa és mtsai., 1995). Az RL-típusú axonterminálisok keresztmetszetének mérete a laterális pulvinarban nem különbözött a VPL vagy az LGN vGLUT2-pozitív drivereinek méretétől (medián, 4,56 μm^2 ; elsőől



9. ábra. vGLUT1-immunoreaktív végződések a majom talamuszában. A, Fénymikroszkópos felvétel egy vGLUT1-immunjelölt metszetről a VPL területéről, ahol kizárólag kis méretű vGLUT1-immunoreaktív terminálisok találhatók. B, Elektronmikroszkópos szinten ezek a végződések (b, ezüst-intenzifikált arany szemcse jelölés) az RS-típusú terminálisok tulajdonságaival egyeznek meg, úgy mint: kis méret, maximálisan egy, esetleg kettő mitokondrium keresztmetszet, punctum adherens hiánya, egyszeres szinapszis (nyíl). d, posztszinaptikus dendrit. C, A laterális pulvinar területén a kis méretű vGLUT1-immunoreaktív terminálisok mellett nagy vGLUT1 tartalmú végződések fellelhetők már fénymikroszkópos szinten is. D, Elektronmikroszkópos szinten ezek a végződések (b, ezüst-intenzifikált arany szemcse jelölés) az RL-típusú terminálisok tulajdonságaival rendelkeznek. Nyilak, szinapszisok; nyílhegyek, puncta adherentia; d, posztszinaptikus dendrit. E, A vGLUT1-pozitív óriásterminálisok térbeli eloszlása a majom talamuszának négy koronális metszetén. Nemcsak az elsőrendű régiókból, de számos magasabbrendű területéről is hiányoznak a fénymikroszkóppal azonosítható vGLUT1-immunoreaktív óriás-végződések. Rövidítések: APul, anterior pulvinar; AV, anteroventral; bsc, brachium of superior colliculus; CM-Pf, centromedian–parafascicular; fr, fasciculus retroflexus; IPul, inferior pulvinar; LD, laterodorsal; LGN, lateral geniculate nucleus; LPul, lateral pulvinar; MD, mediodorsal; MGN, medial geniculate nucleus; MPul, medial pulvinar; VA, ventral anterior; VL, ventrolateral; VPL, ventral posterolateral; VPM, ventral posteromedial; Rt, reticular thalamus. Skála: A, C, 20 μm ; B, D, 1 μm .

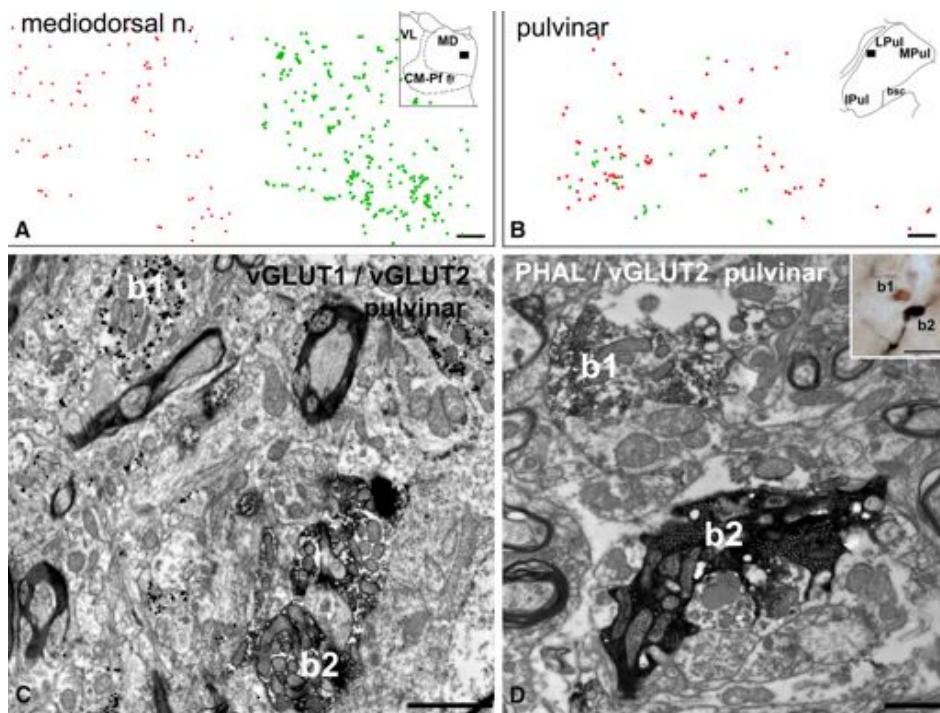
harmadik kvartilis, $3,34 - 5,75 \mu m^2$; $n = 64$; Bonferroni-korrigált két oldalú t -teszt, $p = 1$ mindkét magra).

A kortikális driverek térbeli eloszlása nem volt egyenletes azokban a magokban sem, ahol egyáltalán jelen voltak (9. ábra E). Pontosabban a mediodorsal magban csak a centrális régióban fordultak elő, a pulvinarnak az anterior, laterális, és inferior aspektusában, de a mediális régiókban nem. Vizsgálataink megmutatták, hogy számos magasabbrendűnek tekintett régió területéről hiányoznak a kortikális driver bemenetek; ilyen régió a rostrális intralamináris magok vagy a centromedian-parafascicular komplex területei.

5.1.4. A kortikális és szubkortikális driverek konvergenciája

A vGLUT1- és vGLUT2-immunoreaktív óriásvégződések már az első vizsgálatok során is feltűnően egymással komplementer (nem átfedő) eloszlást mutattak a főemlősök talamuszában. A határvonalak alapos felülvizsgálatával azonban kitért néhány régió, ahol elképzelhető a kortikális és szubkortikális driver bemenetek egy relésejtre történő konvergenciája. Ezek a határvonalak a következő helyeken fordultak elő: a mediodorsal és a centrolateral magok találkozásánál, a VPI és VPM átmenetben, valamint a ventrolateral mag és anterior vagy lateral pulvinar átmenetnél. Az inferior pulvinar mediális részén is találkoztunk egymással átfedő vGLUT1-es és vGLUT2-es nagy butonokkal. (A konvergens zónák pontos helyei a 16. ábrán láthatóak.)

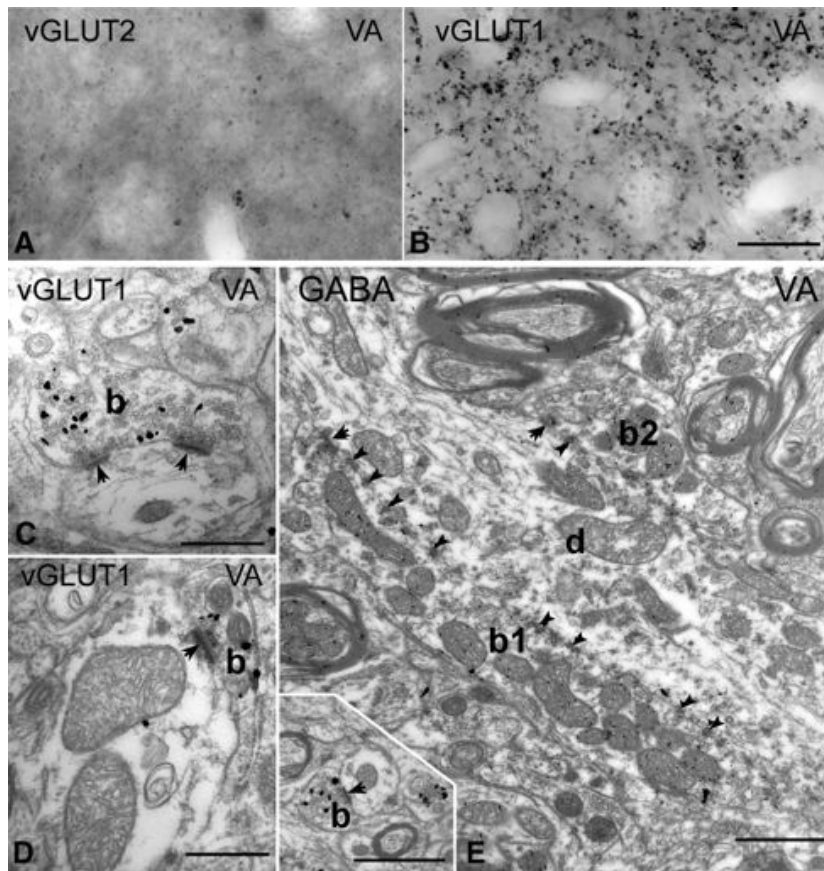
Kettősfestett (DAB és DAB-Ni) fénymikroszkópos metszeteken jól elkülöníthetőek voltak egymástól a vGLUT1-es és vGLUT2-es óriásterminálisok. A határzónákra fókuszálva két mintázatot lehetett azonosítani. A mediodorsal mag mediális részén a kortikális és a szubkortikális driverek egyértelműen szegregálódtak (10. ábra A). Ezzel szemben a laterális pulvinar laterális felén (VL határterületein) a kortikális és szubkortikális driverek homogén módon keveredtek egymással (10. ábra B). A konvergens régiók elektronmikroszkópos vizsgálata alátámasztotta, hogy mind a vGLUT1-, mind a vGLUT2-immunoreaktív terminálisok valóban driver bemenetek (RL-típusúak) voltak, és ténylegesen egymáshoz nagyon közel helyezkedtek el (az anterior pulvinar esetében kevesebb, mint $5 \mu m$ -en belül) egy elektronmikroszkópos metszeten (10. ábra C). Azt, hogy a különböző eredetű driver bemenetek valójában egyazon relésejtet is beidegeznének, nem tudtam megállapítani, mivel az sokkal részletesebb követéses vizsgálatokat igényelt volna, ami a jelen



10. ábra. A nagy vGLUT1- és vGLUT2 tartalmú terminálisok konvergenciája. A, B, vGLUT1-immunoreaktív (piros pontok) és vGLUT2-immunoreaktív (zöld pontok) óriásvégződések térbeli eloszlása kettős immunfestett metszeteken a mediodorsal nucleus (A) és a pulvinar területéről (B). A mediodorsal mag területén feltűnő a kétféle végződés elkülönülése, míg a pulvinarban homogén módon keverednek a bemenetek. C, Elektronmikroszkópos felvételek az anterior pulvinarból, ahol egy nagy vGLUT1-immunoreaktív (b1, ezüst intenzifikált arany szemcse) buton nagyon közel ($3\ \mu\text{m}$ -en belül) van egy vGLUT2-pozitív (b2, DAB csapadék) végződéshez. D, Korrelált fény (beszúrt ábra) és elektronmikroszkópos felvétel az anterior pulvinar területéről egy vGLUT2-immunoreaktív óriásterminálisról (b1, barna DAB csapadék) és egy a közelében levő a kéreg felől anterográd módon megjelölődött kortikális óriásterminálisról (b2, fekete DAB-Ni csapadék). Mindkét óriásvégződés RL-típusú tulajdonságokkal rendelkezik. Skála: A, B, $50\ \mu\text{m}$; C, $2\ \mu\text{m}$; D, $1\ \mu\text{m}$; beszúrt ábra, $20\ \mu\text{m}$.

munkában nem volt reális cél.

A kettősfestett immunhisztokémiai eredményeket anterográd pályakövető anyagot használva is megerősítettük ($n = 3$ majom). A kortikális injektálás hatására kis és nagy terminálisok rajzolódtak ki a talamuszban. Mivel a beadási helyek két esetben a motoros kérget érintették, a kis méretű végződések főleg a ventrolateral magra koncentráálódtak. A capsula interna ventrális részébe történt beadás során ugyancsak hasonló mintázattal találkoztunk a talamuszban. BDA-töltött óriásterminálisokat csak azokon a helyeken



11. ábra. Talamikus régiók szubkortikális és kortikális driver bemenetek nélkül. A, B, Fénymikroszkópos képek vGLUT2- (A) és vGLUT1-immunjelölt (B) metszetekről a ventral anterior mag területéről azt a megfigyelést támasztják alá, miszerint ezen a területen nincsenek a két marker által jelölődő serkentő óriásvégződés. C, D, Elektronmikroszkópos szinten a vGLUT1-pozitív végződésekre az RS-típus jellemző. E, A ventral anterior magban fellelhető óriásvégződés a vGLUT1 jelölés során nem festődnek, de posztembedding GABA reakció után egyértelműen gátló terminálisként azonosíthatóak. A beszúrt ábrán egy vGLUT1-immunoreaktív terminális látható ugyanakkora nagyítással, mint az E ábrán. Skála: A, B, 20 μm ; C, D, 500 nm; E és beszúrt ábra, 1 μm .

találtunk, ahol a vGLUT1 immunjelöléssel is láttunk kortikális drivereket (mediodorsal mag, pulvinar). Kettős immunfluoreszcens festéssel igazoltuk, hogy a kortikális óriásterminálisok vGLUT1-et expresszálnak (6. ábra D-F). A három állatból kettőben néhány BDA-jelölt kortikális driver potenciális konvergens területre érkezett, a vGLUT2-es óriásbutonok közé ágyazódott be (10. ábra D).

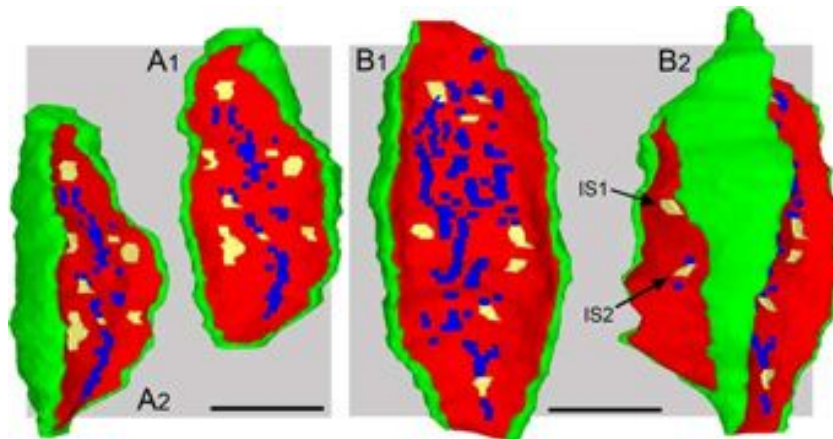
5.1.5. Drivermentes területek

A vGLUT1 és vGLUT2 tartalmú óriásterminálisok fénymikroszkópos feltérképezése során kitűnt, hogy a talamusz jelentős része (kb. 35%) nem rendelkezik semmilyen driver bemenettel sem. Azért, hogy kizárjuk az esetleges technikai, mérési hibákat, elektronmikroszkópos szinten is megvizsgáltuk, vajon felfedezhető-e ezekben a régiókban bármilyen RL-típusú struktúra. A ventral anterior mag köztudottan a bazális előagyból (VAL), illetve a substantia nigrából (VAM) kapja a bemeneteit (Ilinsky és mtsai., 1985; Rouiller és mtsai., 1994). Mégis, a vGLUT2 immunjelölés nem eredményezett azonosítható terminálisokat a VA területén (11. ábra A). Viszont vGLUT1 immunjelöléssel is csak kis méretű butonok rajzolódtak ki. A fénymikroszkópos adatokat megerősítve, intenzív elektronmikroszkópos vizsgálat során sem került elő egyetlen RL-típusú struktúra sem. Minden fellelhető vGLUT1-jelölt buton az RS-típusba tartozott: a terminálisok keresztmetszete kicsi volt, maximálisan két szinapszist képeztek a célelemmel, egy mitokondriumnál ritkán tartalmaztak többet, és hiányzott róluk a puncta adherentia sor (11. ábra C, D és beszúrt ábra az E-n). Összehasonlítottuk a vGLUT1-immunoreaktív terminálisokat a VA és a VPL területén (ahol csak hatodik rétegből származó, RS-típusú végződések vannak jelen), és méretben nem találtunk különbséget a két csoport között (Bonferroni korrigált két oldalú *t*-teszt, $p = 1$; VA medián, $0,40 \mu\text{m}^2$; elsőől harmadik interkvartilis, $0,30 - 0,55 \mu\text{m}^2$; $n = 83$; VPL medián $0,43 \mu\text{m}^2$; elsőől harmadik interkvartilis, $0,29 - 0,56 \mu\text{m}^2$; $n = 58$).

Ennek ellenére a ventral anterior mag neuropilje (más talamuszterületekhez hasonlóan) számos hatalmas, multiszinaptikus, puncta adherentia sorral és számos mitokondriummal rendelkező axonvégződést tartalmazott. Csakhogy ebben az esetben ezek a végződések GABAerg bemenetek, mint ahogy arról a saját beágyazás utáni GABA festésünk, vagy számos korábbi publikáció tanúskodik (Kultas-Ilinsky, Ilinsky, 1990; Kultas-Ilinsky és mtsai., 1997; Bodor és mtsai., 2008). Minden általunk talált óriásvégződés ebben a régióban GABA-pozitivitást mutatott ($n = 20$; 11. ábra E és 12. ábra).

5.1.6. Az RL-típusú végződések változatossága

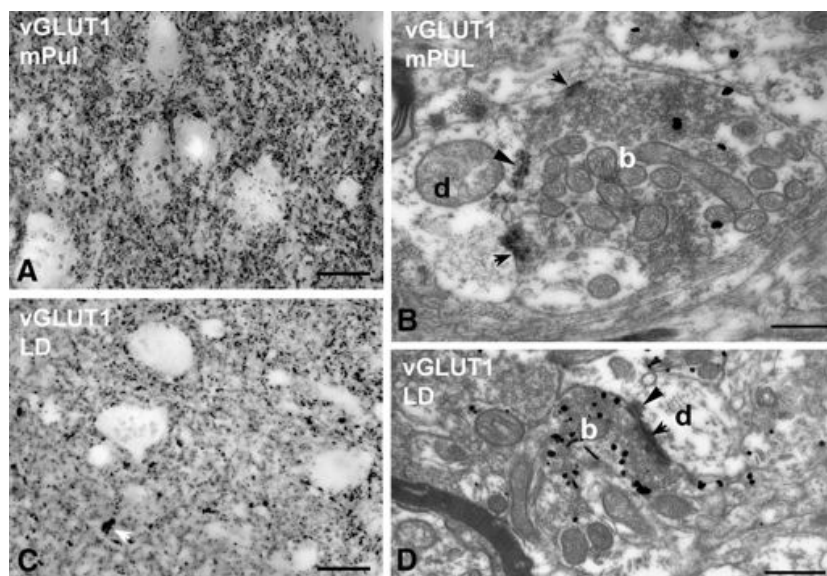
Fénymikroszkópos szinten a ventral anterior mag mellett más talamikus régiókból is hiányoztak a serkentő óriásterminálisok. Ilyen terület volt a mediális pulvinar vagy a la-



12. ábra. Nagy nigrotalamikus GABAerg butonok térbeli rekonstrukciója. A-B, Két terminális látható két különböző nézetben. Színkód: sárga, aktív zóna; kék, puncta adherentia; piros, terminális membrán; zöld, glia. A1, A2, Minden aktív zóna a buton ugyanazon oldalán található. Puncta adherentia sor a buton centrális felületén, míg az aktív zónák attól laterálisabban helyezkednek el. B1, B2, az előző butontól eltérően a buton túloldalán is kialakul két aktív zóna, melynek a posztszinaptikus eleme egy interneurondendrit. Az elektronmikroszkópos felvételeket és térbeli rekonstrukciót Bodor Ágnes végezte. Skála: $1 \mu\text{m}$

terodorsal nucleus (13. ábra). A mediális pulvinarban a fénymikroszkópban tapasztalt vGLUT1-jelölt végződés homogenitásának ellenére elektronmikroszkópos szinten két-féle vGLUT1-immunoreaktív végződést lehetett azonosítani. A végződés többsége az RS-típusúakhoz tartozott, a kisebbségük viszont RL tulajdonságokkal rendelkezett (többszörös aktív zóna, számos mitokondrium keresztmetszet, puncta adherentia sor, 13. ábra B). Habár a mediális pulvinarban található driverek mérete kevesebb, mint a fele volt (medián, $2,24 \mu\text{m}^2$; elsőől harmadik kvartilis, $1,64 - 2,83 \mu\text{m}^2$; $n = 50$), mint akár a laterális pulvinarból származó kortikális driverek mérete, vagy a VPL/LGN-ből származó szubkortikális driverek mérete ($p < 0,00001$ mPUL vs. LPUL/VPL/LGN; 14. ábra A). Ehhez hasonlóan a laterodorsal nucleusban is találkozhattunk multiszinaptikus vGLUT1-immunoreaktív RL-típusú butonokkal, melyek mérete ugyancsak kisebb, mint a korábban bemutatott RL-típusú végződés mérete a laterális pulvinarban (Bonferroni korrigált két oldalú t -teszt, medián, $1,76 \mu\text{m}^2$; elsőől harmadik kvartilis, $0,97 - 2,27 \mu\text{m}^2$; $n = 35$; $p = 0,00001$; 13. ábra D, 14. ábra A).

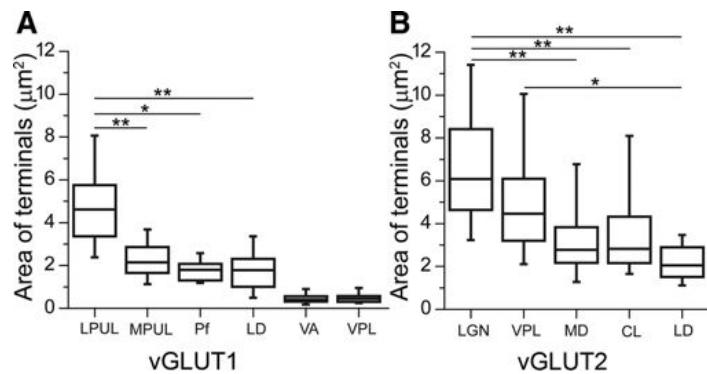
Ezen eredmények alapján világosan látszik, hogy a vGLUT1-tartalmú RL-típusú végződés jelentős méretbeli heterogenitással rendelkezhetnek a talamuszban. A kis mé-



13. ábra. Kis méretű RL-típusú axonvégződések. A-D, Fény (A, C) és elektronmikroszkópos (B, D) felvételek vGLUT1-immunjelölt metszetekről a mediális pulvinar (mPUL; A, B) és a laterodorsal mag (LD; C, D) területéről. Fénymikroszkópos szinten nem azonosíthatók a vGLUT1-pozitív óriásvégződések (a fehér nyíl egy csoport kis terminálisra mutat a C ábrán). Elektronmikroszkópos nagyítással viszont mind a mediális pulvinarban (B), mind a laterodorsal magban (D) a vGLUT1-pozitív végződések egy része (b, ezüstintenzifikált arany szemcse) RL tulajdonságokat mutat (többszörös mitokondria; punctum adherentia sor, nyílhegyek; összetett szinapszis, nyilak). Ezek az RL-típusú végződések szignifikánsan kisebbek és kevésbé összetett struktúrák, mint a laterális pulvinar vagy a VPL óriásterminálisai. Skála: fénymikroszkópos képek, 20 μm ; elektronmikroszkópos képek, 500 nm

retű RL-típusú butonokat fénymikroszkópos szinten nem lehetett elkülöníteni a hatodik rétegi terminálisok tengerében, de elektronmikroszkópos szinten nyilvánvalóvá váltak a különbségek.

Nemcsak a vGLUT1-tartalmú, de a vGLUT2-t expresszáló driverekben is fellelhetők szignifikáns méretbeli különbségek és magspecifikusságok. Példának okáért a mediális mediodorsal magban a vGLUT2-pozitív végződések mérete fele volt az LGN-ben mért RL-típusú terminálisok méretének (medián, 2,78 μm^2 ; interkvartilis, 2,16 – 3,91 μm^2 ; $p < 0,001$; $n = 44$; 14. ábra B.). Emellett a laterodorsal nucleus kis számban szintén tartalmazott az átlagnál (LGN, VPL) kisebb méretű vGLUT2-pozitív RL-típusú terminálisokat (Bonferroni korrigált két oldalú t -teszt, medián, 2,02 μm^2 ; kvartilis, 1,42 – 3,00 μm^2 ; $n = 12$; $p < 0,001$ az LGN-hez hasonlítva és $p < 0,05$ a VPL-hez hasonlítva).

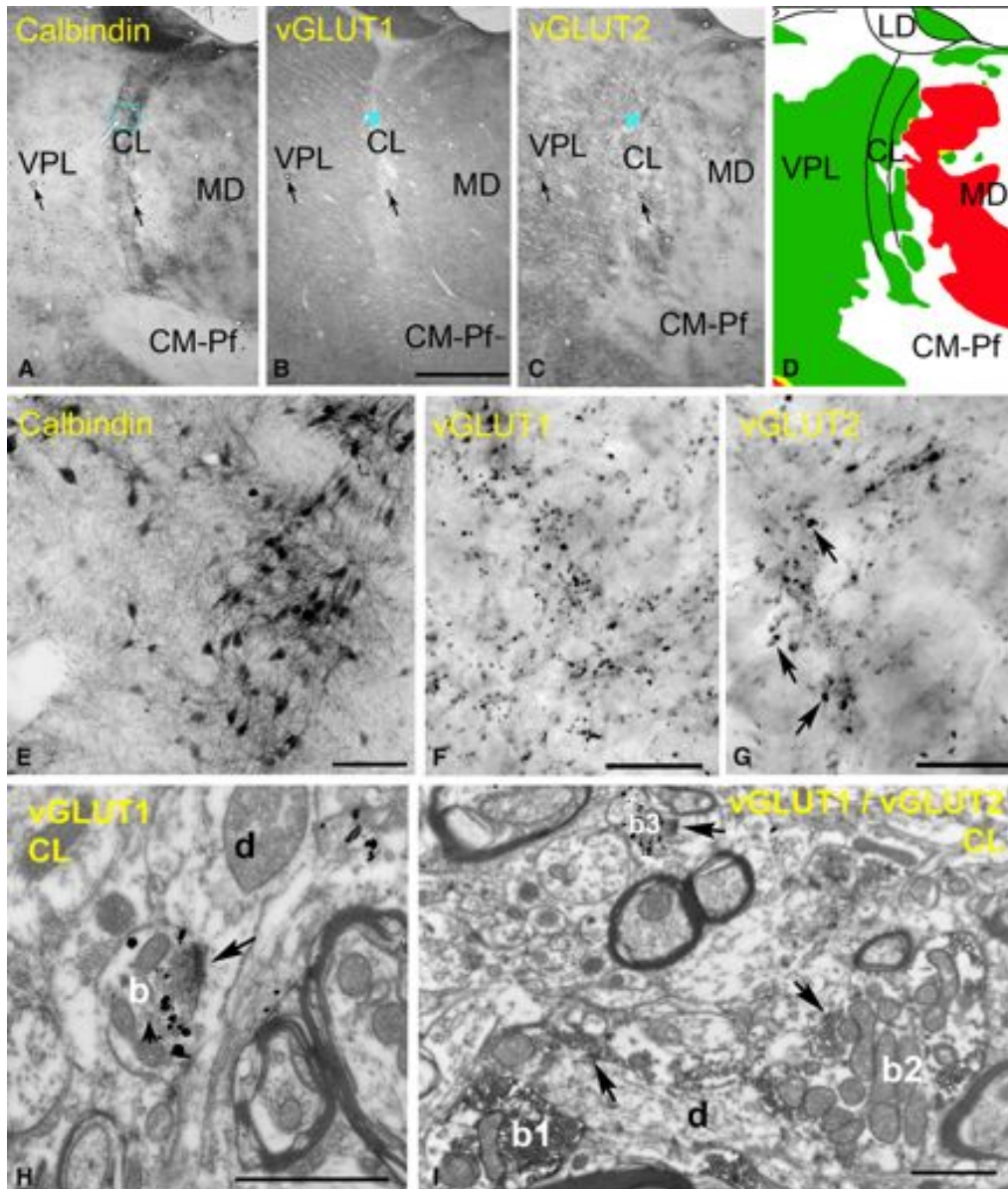


14. ábra. A vGLUT2- és vGLUT1-pozitív terminálisok méretbeli magspecifikus változottsága. A, Box plot (medián, interkvartilisok, 5 - 95%-os távolsága) a vGLUT1-pozitív RL-típusú terminálisok (LPUL, MPUL, Pf, LD) és RS-típusú terminálisok méretéről. B, Box plot a vGLUT2-pozitív RL-típusú terminálisok (LGN, VPL, MD, CL, LD) keresztmetszetének területéről. Az MPUL-ban, Pf-ben és az LD-ben szignifikánsan kisebbek a vGLUT1-immunjelölt RL-típusú terminális keresztmetszetek, mint a laterális pulvinarban. A VA területén a vGLUT1-es végződések mérete nem különbözik a VPL-ben mért RS-típusú terminálisok méretétől. Ehhez hasonlóan, a vGLUT2-es végződések között is szignifikáns különbségek fedezhetők fel. Rövidítések: CL, centrolateral; LD, laterodorsal; LGN, lateral geniculate nucleus; LPUL, lateral pulvinar; MD, mediodorsal; MPUL, medial pulvinar; Pf, parafascicular, VA, ventral anterior; VPL, ventral posterolateral. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

5.1.7. Intralaminaris magok

A thalamuskutatás egyik gócpontjának számító intralaminaris magok egy külön fejezetet érdemelnek, hisz a magkomplex jelentősége a tudatos és magasabb rendű folyamatokban régóta ismert és kutatott (Castaigne és mtsai., 1981; Laureys és mtsai., 2000; Schiff és mtsai., 2007; Yamamoto és mtsai., 2010).

Az intralaminaris magok két fő részre oszthatóak: a kaudális centromedian-parafascicular komplexre (CM-Pf komplex) és a rostrális centrolateral magra. A CM-Pf komplex esetében vGLUT1-pozitív RL-típusú terminálisok nagyon ritkán fordultak elő. Intenzív keresés után is mindössze kilenc olyan terminálist találtunk, ami megfelelt az RL-kritériumainak. Ezeknek a mérete a kis méretű RL-típusú terminálisok méretével egyezett meg, mint amelyeket a mediális pulvinarban vagy a laterodorsal nucleusban láthattunk (medián, $1,78 \mu\text{m}^2$; kvartilis, $1,29 - 2,06 \mu\text{m}^2$; 14. ábra A). A ventral anterior maghoz hasonlóan a CM-Pf komplex területén is előfordultak multiszinaptikus GABA-pozitív óriásvégzések, mint ahogyan arra korábbi publikációk is felhívják a figyelmet



15. ábra.

15. ábra. A rostrális intralaminaris mag serkentő idegvégződése. A-D, Az intralaminaris mag elkülönítése az azt körülvevő struktúráktól. Kis nagyítású felvétel három szomszédos calbindin- (A), vGLUT1- (B) és vGLUT2- (C) immunjelölt metszetről. Az intralaminaris mag határai csak a calbindin festésen különíthetők el egyértelműen. A nyilak a mindhárom metszeten látható kapilláris keresztmetszetekre mutatnak. A színtérkép (D) az óriásterminálisok eloszlását mutatja (zöld, nagy vGLUT2 végződések; piros, nagy vGLUT1 végződések). A vGLUT2 jelölés alapján látható, hogy az intralaminaris magba a tőle laterálisan található VPL területéhez hasonlóan szubkortikális bemenetek érkeznek, nem úgy mint az intralaminaris magtól mediálisan található mediodorsal magba. E-G, nagy nagyítású fénymikroszkópos képek az A-C ábra kék négyzettel jelölt területeiről. Látható, hogy a CL területén nincsenek vGLUT1-pozitív óriásvégződések, míg a vGLUT2-pozitív végződések között fellelhetők közepes méretű butonok (nyilak a G ábrán). H, Elektronmikroszkópos szinten látható, hogy a vGLUT1-pozitív végződések (b) RS-típusba sorolhatóak. I, Kettős immunjelölt metszeten szembevetve a méretbeli különbség a vGLUT2-pozitív RL-típusú butonok (b1, b2, DAB csapadék) és az RS-típusú vGLUT1-pozitív végződések között (b3, ezüst intenzifikált aranyszemcse). Skála: A–C, 2 mm; E, 100 μm ; F,G, 20 μm ; H,I, 1 μm .

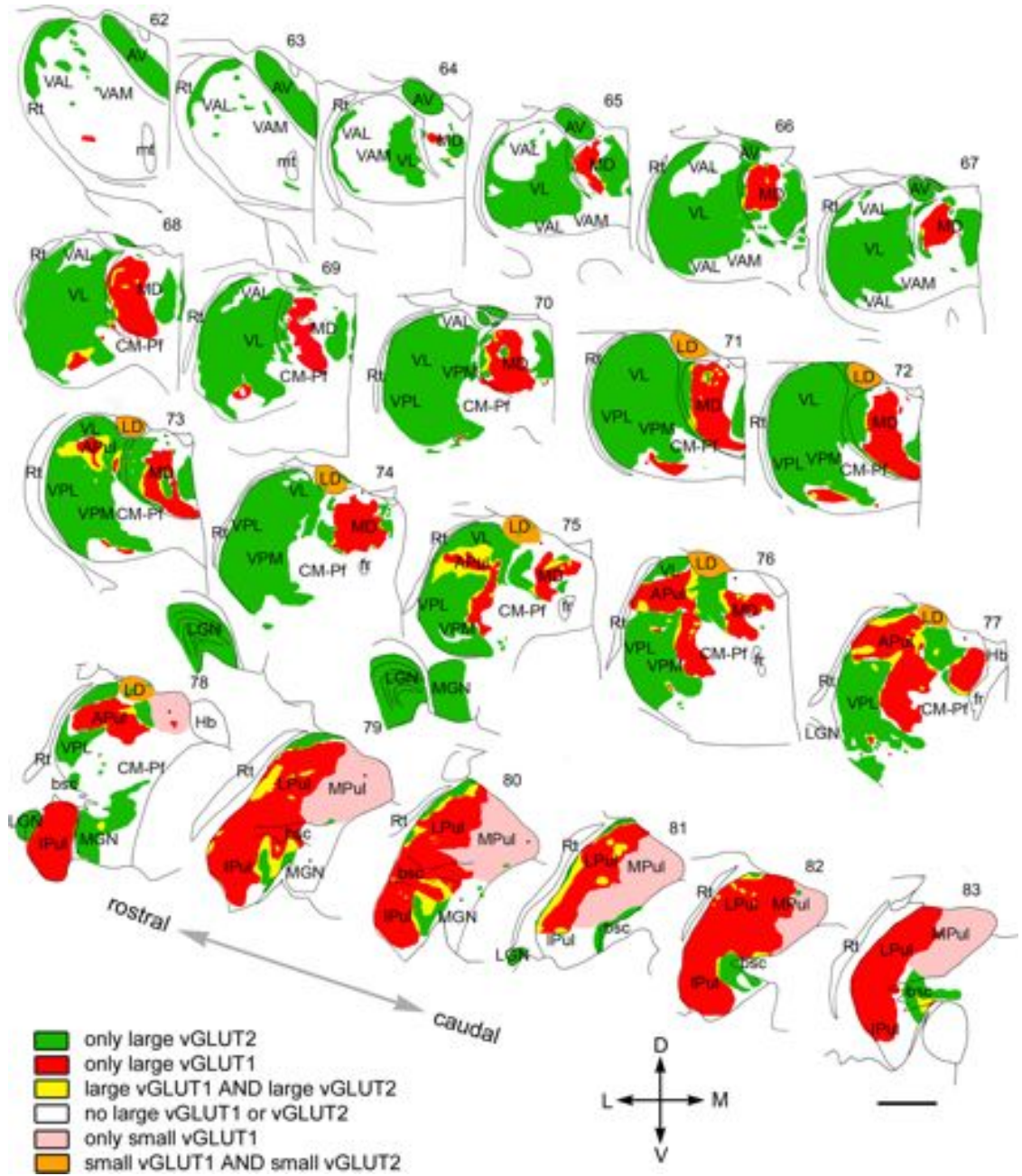
(Kultas-Ilinsky és mtsai., 1997).

A rostrális intralaminaris mag (CL) egy keskeny struktúra a mediodorsal nucleustól laterálisan. Az általunk használt vGLUT1-, illetve vGLUT2 immunfestéssel az intralaminaris mag határait nem lehetett egyértelműen azonosítani. Éppen ezért calbindin-D28 immunjelöléshez folyamodtunk, ami a rostrális intralaminaris sejteknek jól karakterizált markere (Jones, 2007). Ezt követően a szomszédos metszeteket előhívtuk vGLUT1, ill. vGLUT2 elleni antitesttel, majd a kapillárisok alapján kiválasztottuk az azonos területeket mindhárom metszeten (15. ábra A-G).

A CL területén a vGLUT1-pozitív végződések szinte kizárólag csak RS tulajdonságokkal rendelkeztek. Intenzív keresés után is mindössze két végződésre illett rá az RL-típusú terminálisokra felállított kritériumunk. Ugyanez a régió ezzel szemben vGLUT2-pozitív drivereket tartalmazott nagy számban, melyek mérete alul maradt a VPL/LGN-ben fellelhető driverek méretétől, de megegyezett a mediodorsalis mag szubkortikális drive-reinek méretével (medián, 2,82 μm^2 ; kvartilis, 2,15 – 4,32 μm^2 ; n = 49; 14. ábra B). A rostrális intralaminaris mag területén fellelhető szubkortikális driverek jelenléte egybe-vág az irodalomban leírt superior colliculusból (Harting és mtsai., 1980) és a gerincvelőből (Apkarian , Shi, 1994) ide érkező bemenetekkel.

5.1.8. A talamusz drivertérképe

A fény- és elektronmikroszkópos eredményeink alapján a vizsgált hét majom adatait figyelembe véve elkészítettük a makákó talamuszának teljes drivertérképét (16. ábra). A térképen megjelenik a driverek eredete (kortikális vs. szubkortikális), a mérete (nagy vagy közepes), illetve a különböző eredetű driverek konvergenciája, szegregációja. Mindezeket figyelembe véve a majom talamuszban hat különböző típusú driver előfordulást különítettünk el: (1) kizárólag vGLUT2-tartalmú óriásbemenettel rendelkező régiók - zölddel jelölve a 16. ábrán, (2) kizárólag vGLUT1-tartalmú óriásbemenettel rendelkező régiók - piros színnel jelölve az ábrán, (3) vGLUT2- és vGLUT1-pozitív drivereket egyaránt tartalmazó, konvergens régiók - sárga színnel jelölve az ábrán, (4) RL-típusú végződéseket nélkülöző területek - fehérrel jelölve az ábrán, (5) kizárólag kis méretű vGLUT1-pozitív RL-típusú végződéseket tartalmazó régiók - rózsaszín színnel jelölve az ábrán, (6) kis méretű vGLUT1-es és kis méretű vGLUT2-es RL-típusú végződéseket tartalmazó régiók - narancssárga színnel jelölve az ábrán.



16. ábra.

16. ábra. A driver bemenetek mozaikossága a főemlősök talamuszában. A térképen a kéreg felől és a kéreg alatti struktúrákból érkező serkentő óriásterminálisok eloszlása látható a teljes majom talamuszban 22 koronális metszeten ($500\ \mu\text{m}$ közökkel) anterior-posterior irányban feltüntetve. A térkép mind a hét majom eredményeit figyelembe veszi. Hat különféle beidegzés különíthető el a fény- és elektronmikroszkópos megfigyeléseink alapján. Kiterjedt régiók kizárólag szubkortikális (vGLUT2, zöld), vagy kortikális driver bemenettel (vGLUT1, piros) rendelkeznek. A kétféle óriásterminális konvergenciája csak a határzónákra korlátozódik. A basal ganglion recipiens mag (VA) nem rendelkezik semmilyen RL-típusú bemenettel (fehér). Kis méretű RL-típusú butonok jellemzik a mediális pulvinart és a CM-Pf komplexet (rózsaszín). Végül a laterodorsal magában kis méretű kortikális és szubkortikális driverek keveredését figyeltük meg (narancssárga). Egyes talamikus magokban, mint a pulvinar és a mediodorsal mag, a driver bemenetek eloszlása heterogén. Rövidítések: APul, anterior pulvinar; AV, anteroventral; bsc, brachium of superior colliculus; CM-Pf, centromedian–parafascicular; fr, fasciculus retroflexus; Hb, habenula; Ipul, inferior pulvinar; LD, laterodorsal; LGN, lateral geniculate nucleus; LPul, lateral pulvinar; MD, mediodorsal; MGN, medial geniculate nucleus; MPul, medial pulvinar; mt, mammillothalamic tract; VA, ventral anterior; VL, ventrolateral; VPL, ventral posterolateral; VPM, ventral posteromedial; Rt, reticular thalamus. Skála: 2 mm.

5.1.9. A majom kísérletek eredményeinek összegzése

1. Bebizonyítottuk, hogy nagy talamikus régiók kizárólag szubkortikális eredetű driverek irányítása alatt állnak. Emellett magasabbrendű talamikus területek is rendelkeznek jelentős szubkortikális driver beidegzéssel. Végül kiterjedt talamikus területekről hiányzik a szubkortikális serkentő driver bemenet, vagyis nem állnak kéregalatti irányítás alatt.
2. Kimutattuk, hogy nagy talamikus régiók a pulvinarban és a mediodorsal magban kizárólag kortikális irányítás alatt állnak, területükre csak ötödik rétegi driver bemenetek érkezik. Mindemellett kitűnt, hogy mind a mediodorsal mag, mind a pulvinar driver bemeneteit tekintve igen heterogén struktúra.
3. A driverek eloszlásában alapvetően a különböző eredetű bemenetek szegregációja dominál. Mindemellett a határzónákat alaposan szemügyre véve kimutattuk, hogy egyes talamikus területeken elképzelhető a kortikális és szubkortikális driver bemenetek keveredése, ezáltal megvalósulhat a kétféle jel integrációja az adott relésejten.
4. A korábbi megfigyeléseinkkel összhangban alátámasztottuk azt a tényt, hogy a bazális ganglion-recipiens talamuszban nincsenek sem kortikális, sem szubkortikális

- driver bemenetek. Szerepüket feltehetőleg a hasonló megjelenéssel bíró gátló óriásvégződéssek vehették át.
5. A különböző régiókból származó driver bemenetek méreteit összehasonlítva kimutattuk, hogy jelentős méretbeli változatosságot mutathatnak az RL-típusú végződés a régiók között.
 6. Az intralamináris magkomplexről bebizonyítottuk, hogy magasabbrendű funkciói ellenére nagyon kevés kortikális driver bemenettel rendelkeznek, ellenben a rostrális intralaminaris magokat kis méretű szubkortikális driverek idegzik be.
 7. Végezetül a birtokunkban levő eredmények alapján egy a klinikumban is jól használható driver bemeneteken alapuló térképet hoztunk létre a majom talamuszról.

5.2. Talamokortikális ritmusok szinaptikus GABA_A receptor-független szabályozása

PhD munkám második szakaszában egy nagyszabású projektbe kapcsolódtam be, melynek során arra tettünk kísérletet, hogy szétválasszuk a szinaptikus gátlást a GABA_A receptor $\gamma 2$ alegységétől független extraszinaptikus gátlástól a talamuszban. Mindezt a farmakogenetika új módszerével, a vírus-közvetítette kondicionális géndeléciónal értük el. Rendelkezésünkre állt egy egértörzs, aminek a genomjában a GABA_A receptor $\gamma 2$ alegysége azonos irányultságú loxP szekvenciákkal van körülvéve (Azaz a gén floxolt – *flanked by loxP sequances*). Így amennyiben Cre-rekombinázt juttattunk a sejtekbe (mí ezt AAV2/1-CMV-Cre vírus injektálásával értük el, továbbiakban csak AAV-Cre), akkor az felismerte a loxP szekvenciákat, és rekombinációt indukált, aminek a következménye a génszakasz kivágódása, majd eliminálódása lett. Kísérleteink során arra kerestük a választ, hogy hogyan működik a talamusz, illetve a talamokortikális kör, ha a talamusz egyes régióiban kikapcsoljuk a $\gamma 2$ alegységeket (ezáltal megszüntetjük a szinaptikus GABA_A receptor közvetítette gátlást), találkozunk-e bármilyen aberráns fenotípussal, epileptikus aktivitással, megváltozott tüzelési mintázattal.

A következő három alfejezetekben az általam végzett anatómiai és *in vitro* elektrofiziológiai munka előzményeit mutatom be, mely elsősorban *in vivo* altatott, illetve éber állatok agyi elvezetésein alapul. Az altatott állatokból történő elvezetéseket Mátyás Ferenc és Slézia Andrea végezte, míg az EEG beültetéseket, és adatelemzést Sandro Lecci Anita Lüthi csoportjában. A sokcsatornás silicone probe-bal végzett kísérletekhez Barthó Péter nyújtott segítséget, míg a juxtacelluláris burst elvezetések elemzéséhez Hangya Balázs írt programot.

5.2.1. A talamusz GABA_A receptor $\gamma 2$ alegységeinek kondicionális eltűnésére kialakuló agyi aktivitásmintázatok *in vivo*

A talamik GABA_A receptorok farmakológiai blokkolása aberráns oszcillációt okoz, míg a szinaptikus GABA_A receptorok vírusmediált kiütése nem. Ketamine-xylazine altatás során lassú hullámú agyi aktivitás mutatható ki az agykéregben (Steriade és mtsai., 1993a). Amikor azonban gabazine (GABA_A receptor blokkoló, 1 mM) mikrodializáltunk az unilaterális talamuszba (n = 3), közvetlenül a drog bemosódása után a lassú hullámú agyi aktivitás megszűnt, és 2,5 - 3 Hz-es aberráns agyi aktivitás alakult ki

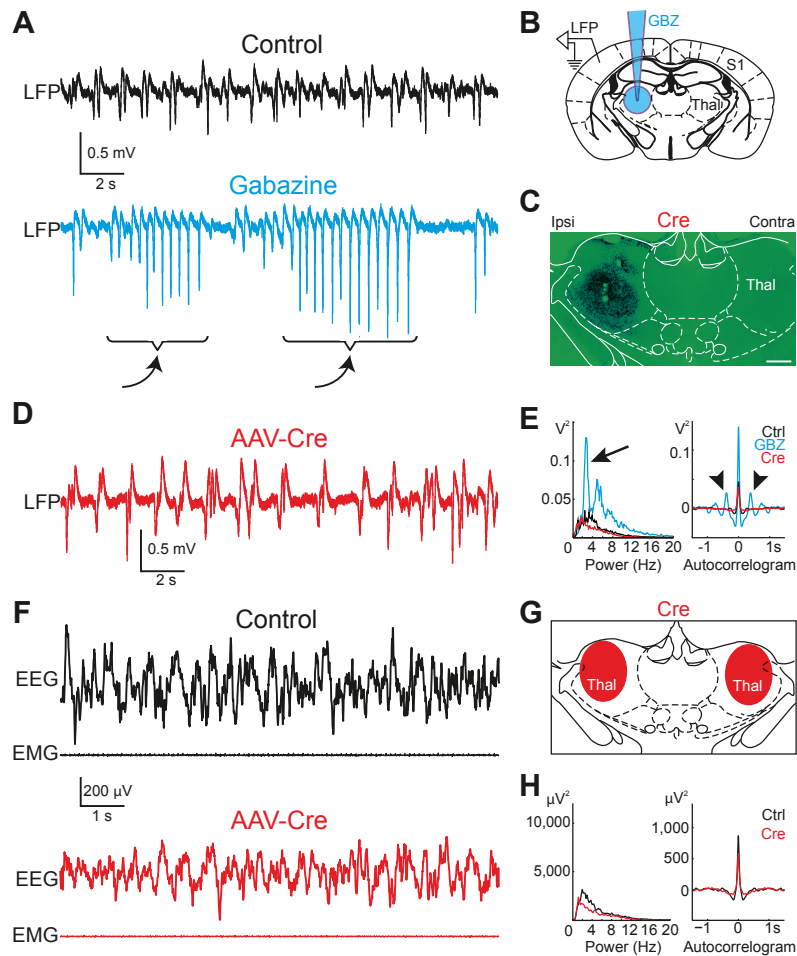
mindkét primer szomatoszenzoros kéregben (17. ábra A, B és E).

Ezzel szemben az unilaterálisan AAV-Cre injektált egerek több mint 2 – 8 héttel a kezelés után is, mikorra már minden $\gamma 2$ alegység eltűnt a citoplazmáról, így a szinaptikus GABA_A receptorok sem funkcionálisak, a kontrollhoz hasonló agyi aktivitást mutattak altatás során (n = 9). Szabadon mozgó állatokból elvezetett poliszomnográfias elvezetésen szintén nem volt változás a kontroll, AAV-GFP injektált állatokhoz képest (n = 4 mindkét esetben); nem tapasztaltunk epilepsziát sem éber állapotban, sem az alvás különböző szakaszaiban (17. ábra).

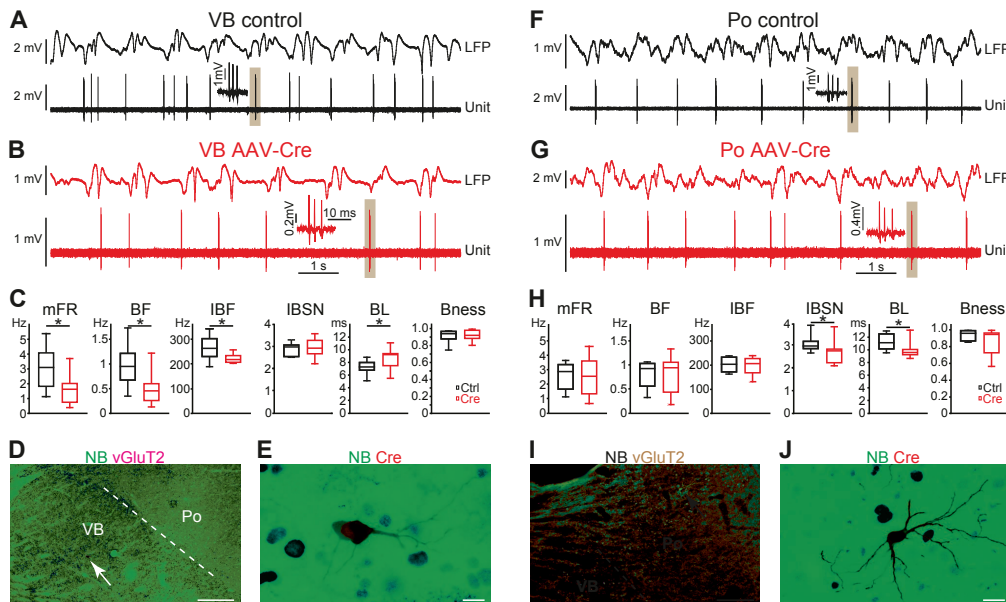
***In vivo* egysejt elvezetések a burst aktivitás megmaradásáról tanúskodnak a szinaptikus gátlás megszűnésének ellenére a talamuszban.** Ketamine-xylazine altatás alatt tapasztalt lassú hullámú kérgi aktivitás során a talamusz sejtjei ~99%-ban burst módban tüzelnek (Timofeev, Steriade, 1996), ezért leginkább a sejtek burst aktivitását tudjuk vizsgálni. Altatott, AAV-Cre injektált egerekben az egyedileg azonosított vírusfertőzött talamikus relésejtek továbbra is burst módban, az LFP jelhez fáziskapcsolatlan tüzeltek szinaptikus GABA_A gátlás nélkül is. Bár a burst-ök nem minden tekintetben egyeztek meg a kontroll sejtekből mért burstökkel: több, a burstök lassulására utaló folyamatot mutattunk ki. Mind az elvezetett Po (n = 8), mind a VB (n = 9) sejtekben tapasztaltunk szignifikáns változást a sejtek tüzelésében (18. ábra).

A VB sejtek esetében ezek alapján csökkent a sejtek tüzelésének átlagos frekvenciája, amit a csökkent burst frekvencia, illetve az interburst frekvencia lassulása magyaráz. A VB sejtek burstjeiben az egy burstöt alkotó akciós potenciálok száma nem változott, míg a burstök hossza megnőtt (18. ábra C). Ezzel ellentétben a Po-ban a burstök változása egyedül a burstön belüli akciós potenciálok számának szignifikáns csökkenésében, és ezáltal a burstök hosszának csökkenésében nyilvánult meg (18. ábra D). A Po burstök többi vizsgált paraméterei megegyezettek a kontroll Po sejtek burstjeivel. A juxtacellulárisan elvezetett sejteket feltöltöttük neurobiotinnel, így tudtuk azonosítani, hogy pontosan honnan történtek az elvezetések (18. ábra D és H).

A spindle oszcillációhoz nem elengedhetetlen a szinaptikus $\gamma 2$ GABA_A receptoralegység. Azért, hogy részletes képet kapjunk arról, milyen folyamatok zajlanak le a ví-



17. ábra. A szinaptikus GABA_A receptorok hiánya a talamuszban nem okoz epilepsziát. A-B, Ketamine-xylazine-nal altatott $\gamma 2$ -floxolt egerek primer szomatoszenzoros kérgi aktivitása abnormálissá válik az unilaterálisan a szomatoszenzoros talamuszba történő GABA_A receptor antagonist, gabazine (Gbz, 1 mM, késsel jelölve a sematikus rajzon) mikrodializálását követően. Jellegzetes aberráns aktivitás (kék, alsó elvezetés) alakul ki gabazine hatására a drog adminisztrációját megelőző lassú hullámú aktivitáshoz (fekete, felső elvezetés, nyilak) képest. C-D, Ezzel ellentétben a $\gamma 2$ -floxolt transzgén egerek szinaptikus GABA_A receptorainak AAV-Cre vírus közvetítette szelektív kiütése a szomatoszenzoros talamuszból (piros immunjelölés, C) nem okozott semmilyen változást a kortikális LFP-ben (D). E, Az agykérgi LFP-ből számított power spektrumból és autokorrelláció is látszik, hogy az AAV-Cre injektált $\gamma 2$ -floxolt egerek LFP-jében nem jelenik meg a kontroll állatban gabazine által kiváltott szinkron ~ 3 Hz-es aberráns aktivitás. F-G, Bilaterálisan AAV-GFP, mint kontroll (fekete elvezetés) és AAV-Cre vírusfertőzött állatok két hasonló reprezentatív EEG elvezetésből látszik, hogy a GABA_A receptor $\gamma 2$ alegységének eltűnése a talamuszból robusztus mértékben nem befolyásolja a NREM során mérhető lassú hullámú agyi aktivitást. H, Hasonlóképpen, a kontroll (Ctrl) és AAV-Cre injektált állatok 300 másodperc hosszú EEG szakaszaiból számított power spectrum és autokorrelláció is közel azonos lefutást mutat.



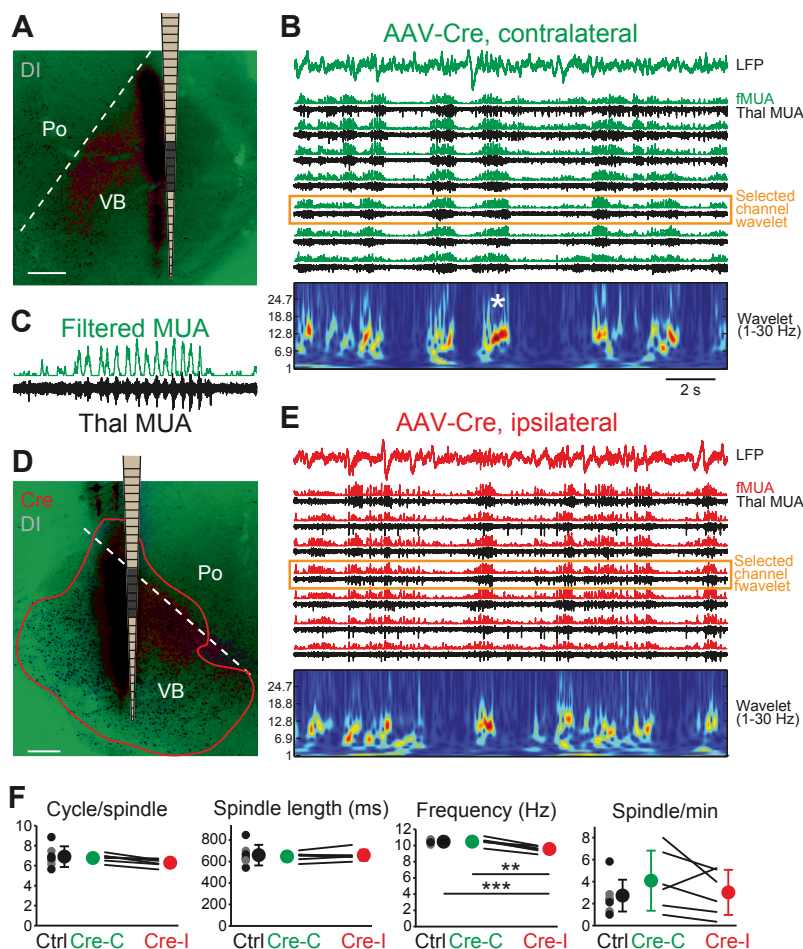
18. ábra. A thalamikus relésejtek burst aktivitása fennmarad a szinaptikus GABA_A receptorok hiányában is. A-B, Kortikális LFP (felső elvezetések), valamint egysejt aktivitás (alsó elvezetések) egy kontroll (fekete) és egy $\gamma 2^{-/-}$ VB sejtől (piros) elvezetve. A kontroll sejt és a $\gamma 2^{-/-}$ sejt burstjai hasonlóak (az elvezetésen árnyékolással vannak jelölve kinagyítások helyei). C, Az akciós potenciálok részletes analízise azt mutatja, hogy a $\gamma 2^{-/-}$ sejtek (pirossal jelölve) szignifikánsan kevesebbet tüzelnek (mFR - mean firing rate csökkent) a lecsökkent burst (BF) és intraburst frekvencia (IBF) miatt a kontrollhoz képest. D, Az A ábrán bemutatott elvezetéshez tartozó kontroll, neurobiotinnel (NB, zöld) feltöltött és előhívott sejt pontos lokalizációja a VB területén (a VB határait a vGLUT2-immunfestés alapján határoztuk meg - lilával jelölve). E, Konfokális fluoreszcens felvétel a B ábrán bemutatott elvezetéshez tartozó neurobiotin töltött $\gamma 2^{-/-}$ VB sejtről. Piros színnel a Cre immunjelölés látható. F-G, Kortikális LFP (felső elvezetések), valamint egysejt-aktivitás (alsó elvezetések) egy kontroll (zöld) és egy $\gamma 2^{-/-}$ Po sejtől (piros) elvezetve. Az egysejt elvezetésekéből (F - G) és populációs adatok analizálásából (H) származó adatok alapján közel hasonló tüzelési tulajdonságokkal rendelkeznek az intakt $\gamma 2$ GABA_A receptoralegységgel rendelkező Po sejtek és a $\gamma 2$ alegység nélküli Po sejtek. I, Az F ábrán bemutatott Po sejt lokalizációja vGLUT2 immunfestést alkalmazva. J, Konfokális fluoreszcens kép a G-n bemutatott $\gamma 2^{-/-}$ Po sejtről (zöld színnel) Cre immunjelöléssel együtt (piros színnel). IBSN, intraburst spike number; BL, burst length; Bness, burstiness. * $p < 0,05$, Mann-Whitney U teszt.

rusinjektált szomatoszenzoros talamuszban, bilaterálisan sok csatornás lineáris probe-ok segítségével mértük a vírusinjektált állatok agyi aktivitását a talamuszban és a kéregben ($n = 6$). A talamikus orsó elvezetések a VB-ben végeztük, mert a VB gátló bemeneteket csak a szomszédos nRT felől kap (Pinault, 2004). A kísérleteket uretán altatott egereken végeztük, mert ez az altatás olyan hálózati aktivitást idéz elő, ami a természetes alvás során megjelenő orsók megjelenéséhez vezet (Steriade és mtsai., 1993b). Az orsók detektálására Barthó Péter írt egy Matlab rutint, aminek segítségével ki tudtunk választani, és elemezni minden olyan talamikus 7 – 15 Hz közötti multiunit aktivitást, ami az orsók kritériumainak megfelelt. A lineáris probe-ok DyeI-ba voltak mártva, mely lehetővé tette az elektródok utólagos pozíciójának pontos meghatározását (18. ábra A és D), illetve azon csatornák kiválasztását, amelyek a VB vírusfertőzött területén haladtak keresztül (19. ábra B és E).

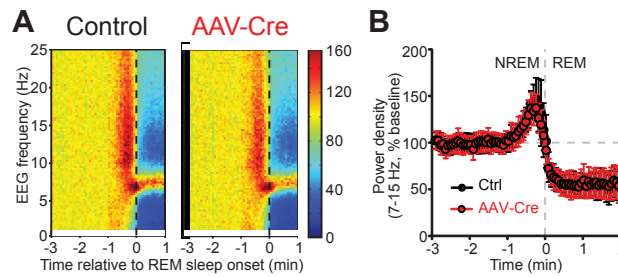
Az eredményekből az látszik, hogy a spindle oszcilláció fennmaradt szinaptikus GABA_A gátlás hiányában is, ugyan az oszcillációban mintegy 1 Hz-es frekvenciacsökkenés tapasztalható az ellen oldalhoz képest (19. ábra E). A csatornánként talált orsószám és az orsón belüli ciklusszám is csökkenő tendenciát mutatott, de az adatok nagy szórása miatt szignifikáns különbség ezekben az esetekben nem mutatható ki (19. ábra F). Az orsók hossza mindkét esetben 600 – 700 ms körül változott.

Hogyha kontroll, nem vírusfertőzött állatokból származó orsókkal vetettük össze az adatainkat ($n = 7$), a tendencia hasonlóan bizonyult, mint a kontralaterális és az ipsilaterális oldal között: a ciklus szám a kontroll állatban magasabb volt, az orsók frekvenciája szintén gyorsabb, hasonlóan a kontralaterális oldalhoz (19. ábra F).

Bilaterális AAV-Cre ($n = 4$), illetve AAV-GFP (mint kontroll, $n = 4$) vírus injektálást követően arra voltunk kíváncsiak, hogy szabadon mozgó, alvó állatok agykérgi aktivitásában kimutatható-e bármi változás természetes alvás során. Elsősorban az orsó (7 – 15 Hz) frekvenciatartományra voltunk kíváncsiak. Ennek a frekvenciatartománynak a sűrűsége megnő természetes alvás során a NREM/REM átmenetet megelőzően, míg az átmenet után lecsökken (Wimmer és mtsai., 2012; Astori és mtsai., 2011). Mint ahogy az a 20. ábrán is látszik, NREM/REM átváltás előtt a 7 – 15 Hz közötti frekvenciatartomány sűrűségének emelkedése mind a kontroll, mind az AAV-Cre fertőzött állatokban kimutatható. A 20. ábra B részén a két állatcsoportból származó átlagos normalizált sűrűség változása



19. ábra. Szinaptikus GABA_A receptor független talamikus orsók. A és D, A 32-csatornás lineáris probe-ok talamikus lokalizációja (DyeI, fehér színnel) a kontralaterális, nem-fertőzött (A) és az ipsilaterális, AAV-Cre fertőzött (D) γ 2 floxolt egér talamuszában. B és E, Hét egymást követő multiunit elvezetés (a bal oldali sematikus silicone probe rajzon sötétszürke sávokként jelölve) és wavelet spektrum analízis (alul) kontroll (B) és AAV-Cre vírusfertőzött talamusz félben (E) után altatás alatt. A kontralaterális és ipsilaterális talamusz hasonló orsó aktivitást mutat (kinagyítva a C ábrán egy példa látható). Legfelül a B és E ábrán a talamikus elvezetéshez tartozó kortikális LFP aktivitás látható a primer szomatoszenzoros kéregből mérve. A hőtésképen színekódolva látható a kiválasztott csatorna 1 – 30 Hz közötti sűrűségeinek változása az idő függvényében, ahol a melegebb színek magasabb sűrűség értékekre utalnak. A talamikus multiunit aktivitás 7 és 15 Hz között volt szűrve. C, Két másodperc hosszú orsó a kontroll oldalból szűrés előtt (fekete színnel) és szűrés után (zöld színnel). Az orsó helyét a B ábrán csillag jelöli. F, Populációs eredmények arra utalnak, hogy a vizsgált orsó paraméterek közül csak az orsók frekvenciájában tapasztalható szignifikáns 1 Hz-es csökkenés az AAV-Cre fertőzött oldalon (Cre-I) a kontralaterális oldalhoz (Cre-C) és kontroll állatokhoz (Ctrl) képest. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$, Student t -test



20. ábra. A $GABA_A$ receptor $\gamma 2$ -es alegységének hiánya a talamuszban nem befolyásolja a természetes alvás során tapasztalható EEG σ hullám sűrűségének nagyságát. A, 0,75 – 25 Hz között normalizált EEG sűrűségek szín-kódolt hőtérképe a NREM-ből REM-be történő átmenet során kontroll és AAV-Cre fertőzött állatban. A NREM/REM átmenet előtt jellegzetesen megnő a 7 – 15 Hz közötti orsók sűrűsége, és lecsökken a REM szakasz kezdetén. B, A 7 – 15 Hz közötti sűrűségek alakulásának időbeni függése a NREM/REM átmenetknél 48 órányi EEG elvezetésből átlagolva. Az adatok az átmenetet -1 és -3 perccel megelőző átlagos sűrűség értékekhez lettek normalizálva. Minden adatpont egy négy másodperces EEG szakaszt reprezentál.

látható a NREM/REM átmenethez viszonyítva.

5.2.2. A $GABA_A$ receptor $\gamma 2$ alegység eltűnésének anatómiai és *in vitro* elektrofiziológiai bizonyítékai

A következő alfejezetekben az *in vivo* eredmények alapjául szolgáló anatómiai és *in vitro* akut talamikus szeletekből mért elektrofiziológiai eredményeket veszem számba. A kísérleteket Acsády László és Anita Lüthi felügyelete mellett én végeztem, kivéve az utolsó alfejezetben előkerülő kiváltott talamikus visszacsapó burst kísérleteket, melyeket Chiara Pellegrini, Anita Lüthi diákja végzett.

A $\gamma 2$ alegység eltűnésének anatómiai bizonyítása. Természetesen felmerül a kérdés, vajon tényleg működik-e az általunk használt AAV-Cre vírus, nem lép-e fel bárminemű rövidtávú kompenzációs mechanizmus, ami elfedné a szinaptikus $GABA_A$ gátlás valódi jelentőségét. Anatómiai módszerekhez folyamodtunk, hogy erre választ kapjunk. Mindezelőtt a vírushordozó sejtek arányát vizsgáltuk meg ($n = 8$), ami meggyőzött minket arról, hogy a fertőzött terület közepén közel 100%-os a vírushordozó sejtek aránya (21. ábra). Továbbá igazoltuk, hogy a $\gamma 2$ alegység eltűnik a fertőzött sejtek membránjából ($n = 11$) (22. ábra A és B), míg az általunk vizsgált két másik $GABA_A$ receptoralegység, a szinaptikus $\alpha 1$ és az extraszinaptikus $\alpha 4$ expressziójában nem történt változás (22. ábra C-F).

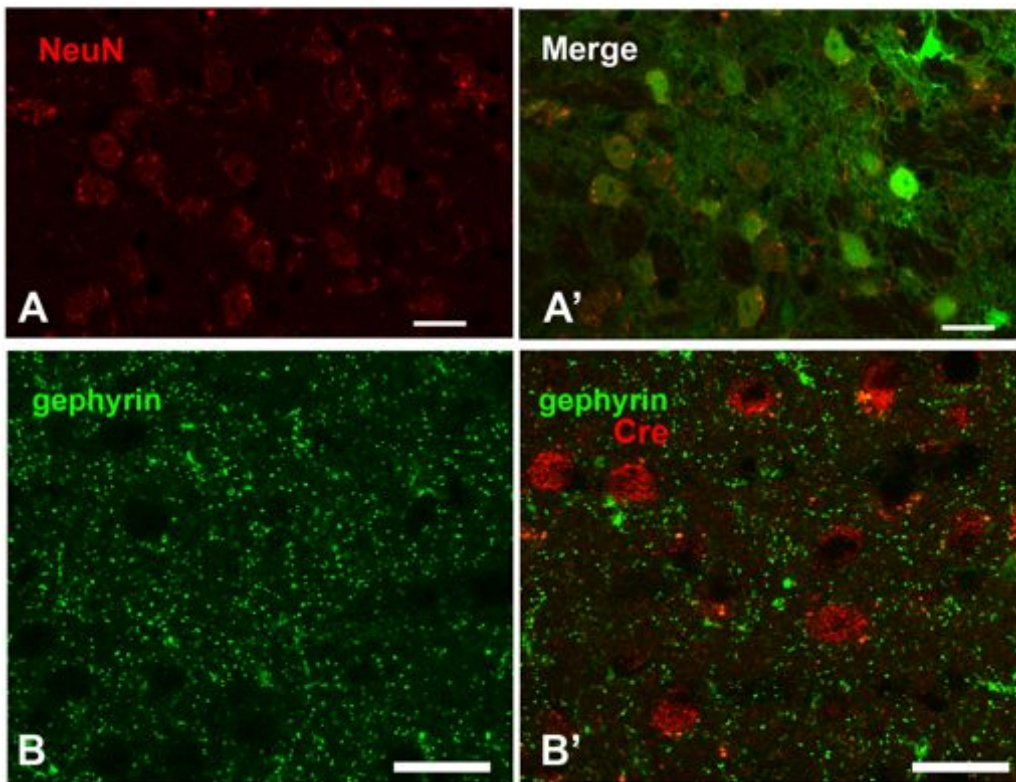
Szinaptikus membránfehérjék helyének pontos megállapítására a hagyományos elektronmikroszkópos vizsgálatok kevésbé alkalmasak, mivel a fehérje kimutatása legtöbb esetben a szövet roncsolásával járó feltárást igényel, ami az ultrastruktúrák azonosítását szinte lehetetlenné teszi. Éppen ezért mi egy új nagy felbontású eljáráshoz, nevezetesen a STORM (STochastic Optical Reconstruction Microscopy) módszeréhez folyamodtunk, melynek az egyszerű kivitelezés mellett további előnye, hogy többszörös festések is alkalmazhatók a mintákon. A mikroszkópos eljárás felbontása megközelíti az elektronmikroszkópos felvételek felbontását, így valóban magukról a szinapszisokról is képet kaphattunk. A módszer nagy hátránya azonban, hogy nem láthatók a tájékozódást elősegítő membránok. (A módszer pontos ismertetése a Módszerek fejezetben található.)

Preszinaptikus jelölő anyagként a vezikuláris GABA transzportert használtuk (vGAT) (22. ábra G-J). A kontralaterális oldalhoz viszonyítva nem tapasztaltunk intenzitásbeli változást, ami arra utal, hogy ennyi idő alatt nem csökkent a gátló afferensek száma az érintett területen.

A $GABA_A$ receptoralegységek mellett posztzinaptikus markerként a gephyrint választottuk. A gephyrin expressziója ugyancsak megegyezett az ipsilaterális és kontralaterális oldalak között, vagyis a $\gamma 2$ alegység eltűnése nem vonta maga után más, a szinapszis működéséhez elengedhetetlen fehérjék eliminálódását (21. ábra).

STORM segítségével bebizonyítottam, hogy az AAV-Cre fertőzött talamikus régióból, a szinapszisok aktív zónáiból valóban eltűnnek a $GABA_A$ receptor $\gamma 2$ alegységek (22. ábra G-J) ($n = 2$). Míg a kontralaterális oldalon (22. ábra G és I) egyértelműen beazonosíthatóak a vGAT-jelölt preszinaptikus terminálissal szemközt elhelyezkedő $\gamma 2$ alegységek (az aktív zónát kirajzolva), addig az ipsilaterális oldalon semmiféle rendezettséget nem mutatnak a $\gamma 2$ alegységek, számuk is jóval kevesebb, mint az ellen oldalon (22 H és J). A pre- és posztzinaptikus klaszterek nagysága (300 – 400 nm) megegyezik a 3D rekonstruált nRT terminálisok elektronmikroszkóppal mért szinapszisainak nagyságával (Wanaverbecq és mtsai., 2008).

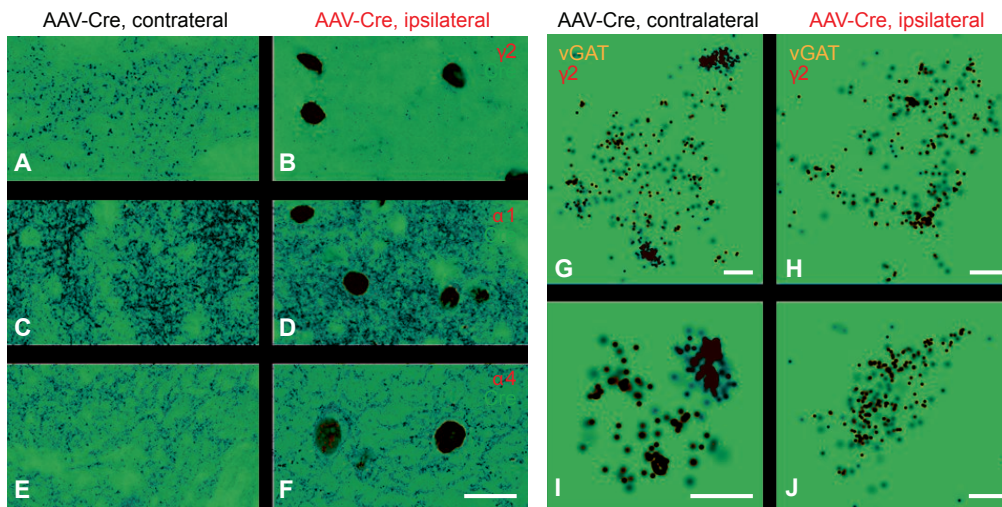
Továbbá igazoltam, hogy az AAV-Cre vírussal fertőzött sejtekben mind a $\beta 2$, mind az $\alpha 4$ alegység expressziója változatlanul kimutatható (23. ábra).



21. ábra. Az AAV-Cre vírus talamikus injektálásának hatékonysága két héttel a kezelés után. A-A', A vírusfertőzött sejtek aránya közel 100% ($87\% \pm 5\%$) a fertőzött régió közepén. Pirossal NeuN neuronális jelölő anyag, zölddel a Cre-pozitív vírusfertőzött sejtek láthatóak. B-B', A szinaptikus GABA_A receptorok eltűnése a plazmamembránból nem befolyásolja a posztzinaptikus gephyrin expresszióját, klasztereződését a citoplazmában. Skála: 20 μm

5.2.3. *In vitro* elektrofiziológiai mérések akut talamikus egér agyszeleteken a $\gamma 2$ alegység eltűnését bizonyítják

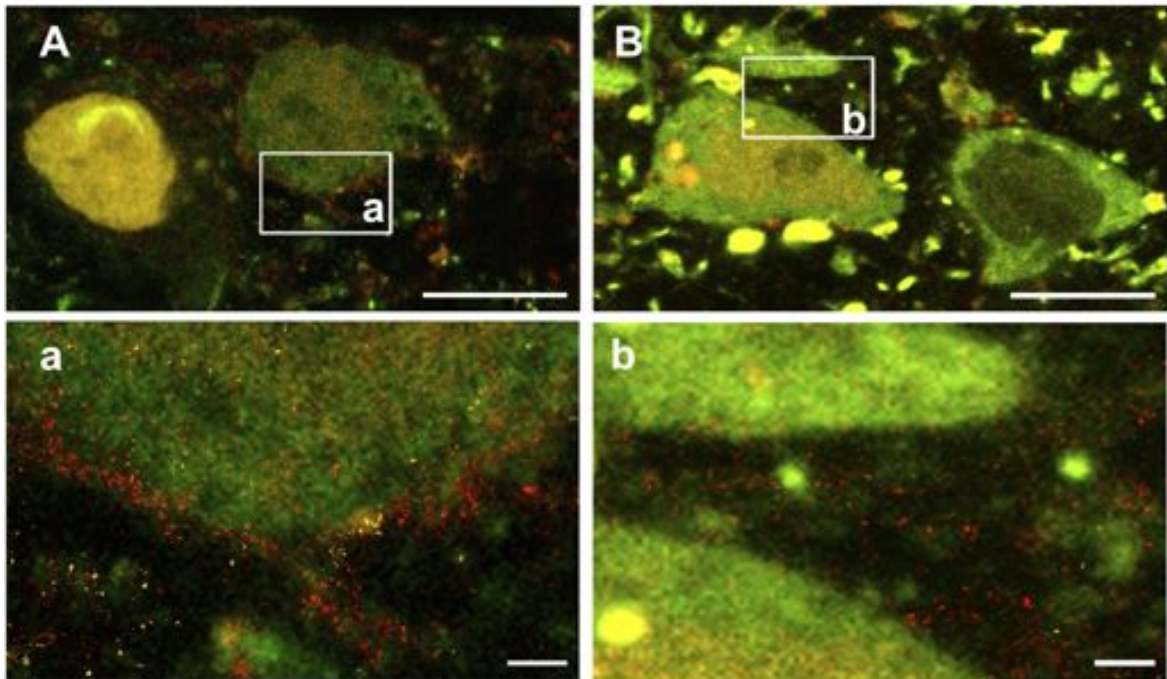
Az anatómiai eredmények meggyőztek minket arról, hogy a $\gamma 2$ alegységek valóban eltűntek az érintett sejtek szinapszisaiból. Ezt követően *in vitro* elektrofiziológiai mérésekkel igazoltuk, hogy ennek mi a funkcionális jelentősége. Azt, hogy a $\gamma 2$ alegység eltűnése valójában a gyors IPSC-k eltűnésével is járt, akut horizontális talamikus szeleteken teszteltük le glutamáterg blokkolók jelenlétében (DNQX 40 μM , D,L-APV 100 μM). A kontrollként AAV-GFP fertőzött talamokortikális sejtekben nagy frekvenciával ($1,33 \pm 0,89$ Hz) fordultak elő gyors IPSC-k (24. ábra B, felső fekete elvezetések, $n = 11$), míg az AAV-Cre fertőzött állatok talamuszából vírusinjektálást követően 7 – 21 nap elteltével már semmilyen gyors (< 2 ms rise-time-mal jellemezhető) gátló áramot nem lehetett elvezetni ($0,006 \pm 0,018$ Hz, 24. ábra B, $n = 22$). Időnként azonban lassabb (rise-time



22. ábra. GABA_A receptoralegységek az AAV-Cre-fertőzött (ipszilaterális) és a nem-fertőzött (kontralaterális) talamuszban. A-B, A GABA_A receptor $\gamma 2$ alegység immunfestése az alegység klaszterizációját mutatja a kontralaterális talamuszban (A), míg a klaszterek hiányát a vírusfertőzött (Cre-pozitív sejtek zölden) oldalon (B). C-D, GABA_A receptor $\alpha 1$ alegység immunjelölése a kontralaterális (C) és az ipszilaterális talamuszban (D). E-F, GABA_A receptor $\alpha 4$ alegység immunjelölése a kontralaterális (E) és az ipszilaterális (F) talamuszban. Az $\alpha 1$ és $\alpha 4$ alegységek denzitása megegyezik az ipszi- és a kontralaterális oldalon. G-J, A nagy felbontású STORM felvételek a vGAT (sárgával jelölve), mint preszinaptikus GABA_A receptor jelölő anyag és a GABA_A receptor $\gamma 2$ (pirossal jelölve) alegységéről. G és I, Kontralaterális oldalról származó intakt aktív zónával rendelkező gátló szinapszisok láthatóak, míg a vírusfertőzött régióból (H és J) származó gátló terminálisok aktív zónáit nem rajzolja ki a $\gamma 2$ alegység. Skála: A-F 20 μ m, G-J 200 nm

> 15 ms) tranziensek felbukkantak mindkét csoportban, habár ezek frekvenciája messze alulmaradt a kontrollban mért gyors IPSC-k frekvenciájához képest. Gabazine (10 μ M) hatására a kontroll sejtek esetén eltűntek a fázisos IPSC-k, míg az AAV-Cre fertőzött sejtekben nem láttunk lényeges változást a gátló áramok sűrűségében (hisz alap esetben sem voltak gyors gátló áramok). Érdeemes megfigyelni a hasonlóságot a gabazine alatt mért kontroll és a mindössze glutamáterg blokkolók jelenlétében mért AAV-Cre fertőzött elvezetések között. A mérőpipetában biocytint oldva a mért sejtek egy része később azonosításra került (24. ábra A), ami alapján meggyőződünk arról, hogy valóban a vírusfertőzött régióból, Cre-pozitív relésejtekéből történtek az elvezetések.

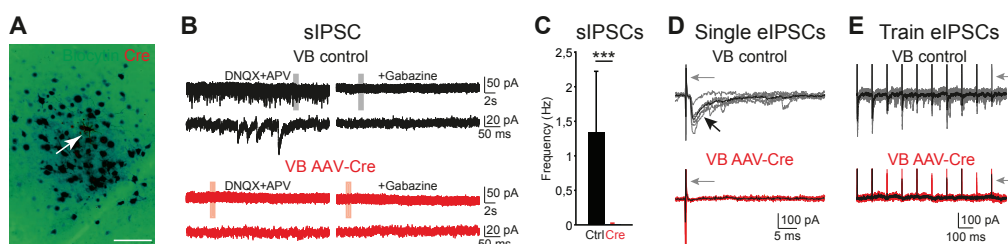
Mivel horizontális szeletben a VB területén, ahonnan az elvezetéseimet végeztem, a gátlás kizárólag az nRT-ból érkezik (Pinault, 2004), úgy gondoltuk szisztematikusan is megnézzük, hogy a kiváltott válaszok is eltűntek-e a $\gamma 2^{-/-}$ sejtekből. A tapasztalat azt



23. ábra. A GABA_A receptor $\beta 2$ és $\alpha 4$ alegységei intakt módon megmaradnak a talamikus relésejtek plazmamembránján AAV-Cre vírusinjektálást követően $\gamma 2$ -floxolt állatokban. A-a, Konfokális fluoreszcens és STORM felvétel két Streptavidinnel megjelölt (zöld citoplazma festés) Cre-pozitív (sárga magfestés) sejtről az AAV-Cre vírusfertőzött talamuszból. A $\beta 2$ alegységek egyenletesen oszlanak el a plazmamembránon (piros konfokális fluoreszcens jelölés és piros STORM pontozottság). a, A nagyított felvételen jól látható a GABA_A receptor $\beta 2$ alegységének eloszlása, illetve egy sárga színben megjelenő vGAT-pozitív gátló terminális. B-b, Konfokális fluoreszcens és STORM felvétel két Cre-pozitív (sárga magfestés) VB sejt sejttestjéről. b, A B ábrán megjelölt terület nagyobb nagyításban. Az $\alpha 4$ alegységek (piros pontozottság) klaszterekben csoportosulnak a plazmamembránon. Skála: A, B 10 μm , a, b 1 μm

mutatja, hogy az nRT rostokat extracelluláris monopoláris elektróddal stimulálva a kontroll sejtek esetében ki lehetett váltani gyors IPSC-eket (rise time < 1 ms, decay time < 4 ms) ötből négy esetben ($- 82 \pm 27$ pA és $0,19 \pm 0,15$ pC töltés átvitel), míg ezt az AAV-Cre fertőzött VB sejtek esetében hatból öt esetben semmilyen választ nem kaptunk sem egyszeri, sem 10 Hz-es stimulációs protokollt alkalmazva. Az egy esetben, ahol az nRT stimuláció kiváltott válasszal járt, ott a kapott IPSC sokkal lassabb és nagyobb amplitúdójú volt, mint a kontroll esetben (rise time 5 ms, decay-time 28 ms, amplitúdó 120 pA).

Összefoglalva, az adatok alapján az látszik, hogy az AAV-Cre fertőzött, $\gamma 2^{-/-}$ talamokortikális sejtekből valóban eltűnt a gyors szinaptikus gátlás.

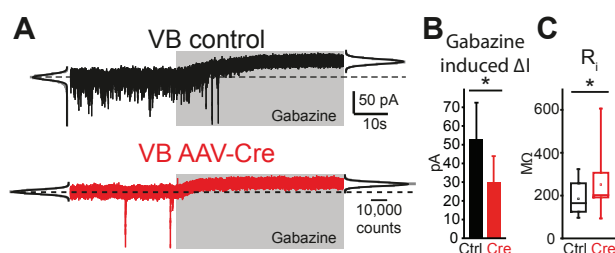


24. ábra. A gyors fázisos IPSC-k eltűnése a $\gamma 2^{-/-}$ talamokortikális sejtekből. A, Biocytinnel töltött $\gamma 2^{-/-}$ talamokortikális reléjeit a vírusfertőzött régió közepéből (nyíl). B, Spontán IPSC-k egy kontroll (AAV-GFP fertőzött, felső, fekete elvezetések) és egy $\gamma 2^{-/-}$ VB sejtől (alsó, piros elvezetések) glutamáterg blokkolók, (DNQX, 40 μM , D,L-APV 100 μM), illetve ezen felül adagolt GABA_A receptor blokkoló, gabazine (10 μM) jelenlétében. Árnyékolt sávok jelölik a felső elvezetésekkel kinagyított részt. C, Spontán IPSC-k átlagos frekvenciája a kontroll és $\gamma 2^{-/-}$ reléjeitek esetében. D, Monopoláris nRT-rost stimulációval monofázisos IPSC-k válthatók ki a kontroll VB sejtől (szürkével az egyedi kiváltott válaszok, feketével azok átlaga látható), míg a $\gamma 2^{-/-}$ VB sejtől sohasem. E, Ugyanezen kontroll és $\gamma 2^{-/-}$ sejtek 10 Hz-es stimulációja. A D és E ábrán a nyilak a megcsonkított stimulációs artefactra mutatnak. *** $p < 0,001$).

5.2.4. A GABA_A tónusos áram mértéke kisebbnek bizonyult $\gamma 2^{-/-}$ reléjeitekben, mint a kontroll sejtekben *in vitro*

Habár a tónusos áram nagyságáért elsősorban az extraszinaptikus GABA_A receptorok tehetők felelőssé (Jia és mtsai., 2005; Richardson és mtsai., 2011; Farrant, Nusser, 2005; Cope és mtsai., 2005), mi mégis azt tapasztaltuk, hogy 10 μM gabazine hatására a $\gamma 2^{-/-}$ VB sejtekben szignifikánsan, mintegy 40%-al lecsökkent a tónusos áram a kontrollhoz képest (25. ábra A és B). Míg a kontroll sejtek esetében a $\Delta I = 53 \pm 19$ pA ($n = 7$), az AAV-Cre fertőzött reléjeitekben mindössze 30 ± 14 pA ($n = 9$, $p < 0,05$) áramváltozást mértünk.

Az AAV-Cre fertőzött sejtek input rezisztenciája szintén nőtt, ami arra utal, hogy kevesebb működő ioncsatorna található a plazmamembránjukon, mint a kontroll sejtek membránján (255 ± 110 M Ω vs. 177 ± 84 M Ω , $n_{\text{kontroll}} = 12$, $n_{\text{AAV-Cre}} = 27$, $p < 0,05$; 25. ábra C). Mindez ugyancsak alátámasztja azt a feltételezésünket, hogy a $\gamma 2$ alegység eltűnésével megszűnnek a funkcionális szinaptikus GABA_A receptorok az érintett sejtekben. Ezen felül ezek alapján valószínűnek látszik, hogy az extraszinaptikus receptorok kompenzációs upregulációja nem áll fenn.

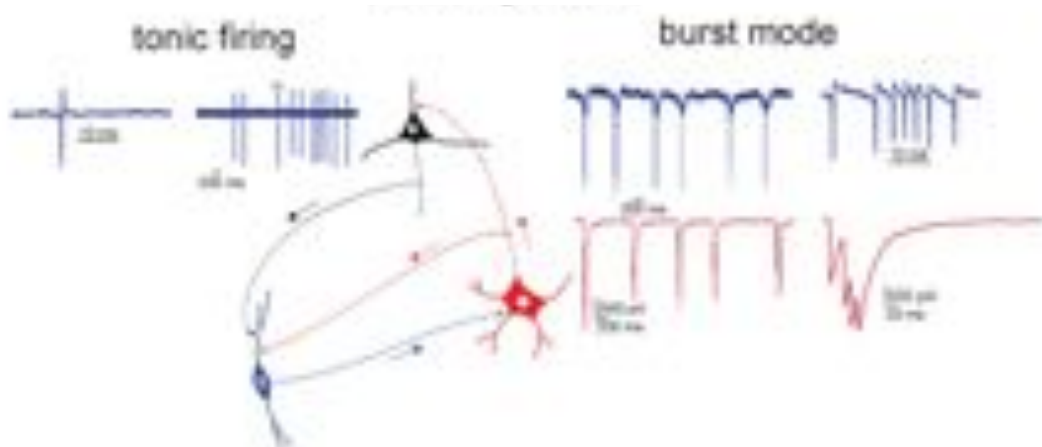


25. ábra. A tónusos áram nagysága csökken $\gamma 2^{-/-}$ VB sejtekben a kontrollhoz képest. A, A tónusos áram a tartóáramban bekövetkező outward irányú elmozdulásként jeleníthető meg GABA_A antagonistá, gabazine (10 μ M) hatására mind a kontroll, mind a $\gamma 2^{-/-}$ sejtek esetében. Az átlagos tartóáram értékek a gabazine alkalmazás előtti és azt követő 20 - 20 másodperces szakasz all-point hisztogramjára illesztett Gauss-görbéből származnak. B, A gabazine által előidézett tartóáram-változás szignifikánsan kisebb a $\gamma 2^{-/-}$ sejtek esetén, mint a kontrollban. C, $\gamma 2^{-/-}$ sejteknek szignifikánsan nagyobb az input rezisztenciájuk, mint a kontroll sejteknek. * $p < 0,05$

5.2.5. Burst IPSC a $\gamma 2^{-/-}$ relésejtekben is mérhető *in vitro*

Érdekes módon, elszórtan, átlagosan félszáz percenként előfordultak nagy amplitúdójú, lassú áramok, néha több is egymást követően mind a kontroll, mind az AAV-Cre fertőzött sejtekben ($1,9 \pm 3,9$ /perc vs. $1,7 \pm 2,0$ /perc, $n_{\text{kontroll}} = 16$ sejt, $n_{\text{AAV-Cre}} = 13$ sejt, ns.), annak ellenére, hogy gyors IPSC-t nem lehetett detektálni az AAV-Cre vírusfertőzött VB sejtekben glutamáterg blokkolók jelenlétében. A csoportosan érkező áramok interburst intervalluma pár száz ms, ami nagyon hasonlít az nRT-ből mérhető spontán repetitív burstok intervallumaira (Wimmer és mtsai., 2012).

További hasonlóság volt a sorozatban érkező lassú IPSC-k depressziója. Egy szembeötlő különbség azonban volt a két sejtípusban mért lassú IPSC-k között: míg a kontroll sejtek esetében a detektált áram jellemzően több csúcsú volt (több, általában 5 – 9 individuális IPSC-ből állt), addig a $\gamma 2^{-/-}$ relésejtekben individuális IPSC-eket nem lehetett felfedezni, csupán a lassú fel-, és lassú lefutású áramot. Az áramokat GABA_A receptorok közvetítették, mivel a mérőkamrába oldott gabazine hatására (10 μ M) eltűntek a spontán módon megjelenő lassú IPSC-k is. Mivel a horizontális agyszövetekben az nRT-VB kapcsolatok intakt módon megőrződnek, és mivel más, a szeletben is jelen levő, a VB-be gátló rostokat küldő területekről nincs tudomásunk (Pinault, 2004), ezért feltételeztük, hogy a lassú áramok forrása az nRT. Sőt, a kontroll sejtekben mért lassú IPSC-k individuális IPSC-inek frekvenciája az nRT jellemző burst tüzelésének frekvenciájában fordult elő (Wimmer és mtsai., 2012) (26. ábra). A mért áramot ezek alapján beazonosítottuk,

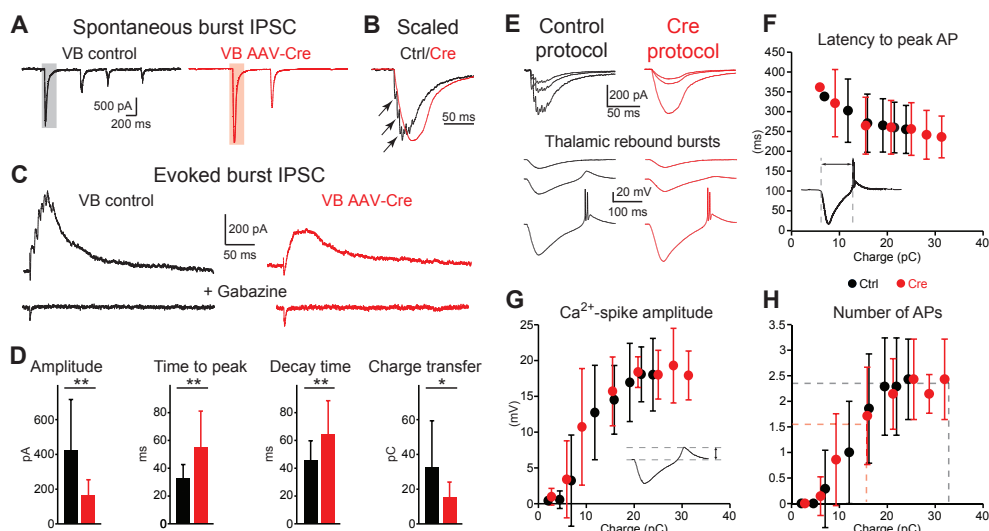


26. ábra. A talamokortikális kör sematikus rajza. *In vitro* cell-attach elvezetések spontán tüzelő nRT sejtekből (kék színnek jelölve) tónusos és burst módban. Az elvezetések két oldalán a szürke sávval megjelölt szakasz látható kinagyítva. A jobb oldalon piros színnel nRT burst aktivitás során talamokortikális relésejtől elvezetett spontán áramok láthatók, míg mellette kinagyítva az első burst IPSC. (Saját elvezetések)

mint nRT eredetű burst IPSC.

Mivel ezek az események viszonylag ritkán, nagy variációval és legfőképpen nem kontrollált módon keletkeztek ezért, hogy össze tudjuk hasonlítani a kétfajta burst IPSC-t, nRT stimulációhoz folyamodtunk. Ugyan *in vitro* glutamáterg blokkolók jelenlétében is tapasztaltunk valamennyi spontán nRT burstölés, hogy biztosítsuk a burstöléshez a legoptimálisabb feltételeket, elhagytuk a glutamáterg blokkolókat a mérőoldatból, mint ahogy azt az irodalomban fellelhető munkák javasolják (Crandall és mtsai., 2010; Deleuze , Huguenard, 2006; Sanchez-Vives és mtsai., 1997). Ennek érdekében változtatni kellett a mérési körülményeken is. Így normális (5 mM) Cl^- tartalmú standard intracelluláris oldatot használtam, és az előzőekhez képest pozitívabb, -30 mV-os feszültségen tartottam a sejteket. Ezen a potenciálon mérve a serkentő inward irányú áramok minimális méretűek csupán, hisz a kationok hajtó ereje kicsi. Ugyanakkor az anionok (legfőképpen a Cl^-) hajtóereje annál nagyobb, mivel távol vagyunk a Cl^- reverz potenciáljától. A gátló áram ekkor outward irányban jelenik meg.

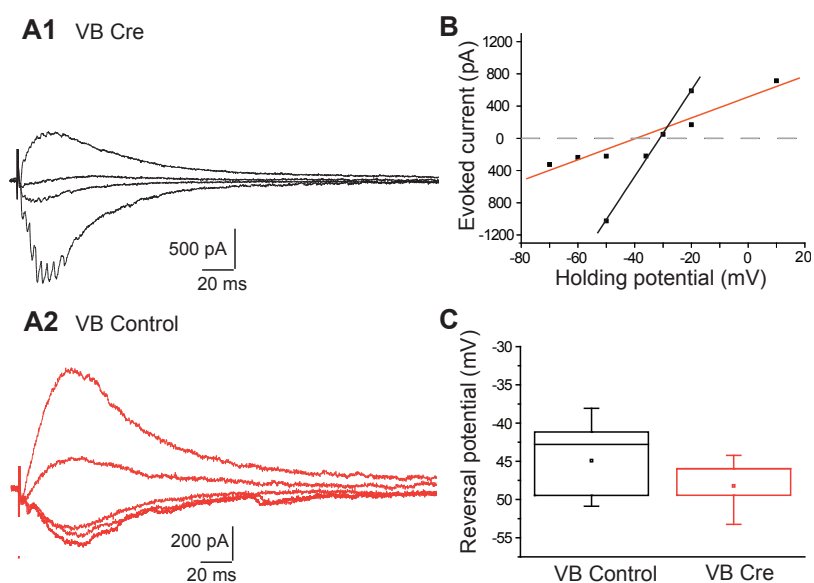
Ilyen körülmények között szobahőmérsékleten az nRT-t extracelluláris elektróddal stimulálva viszonylag nagy valószínűséggel (~ 75%) ki lehetett váltani burst IPSC-eket a talamokortikális sejtekből. És míg a $\gamma 2^{-/-}$ VB sejtekben egyetlen gyors IPSC-vel sem találkoztunk, addig a burst IPSC-k nRT stimulálással kiválthatóak voltak (27. ábra C).



27. ábra. Burst IPSC a talamuszban. A, Spontán repetitív burst IPSC-k egy AAV-GFP injektált kontroll (bal oldalt) és egy $\gamma 2^{-/-}$ VB sejtben -50 mV tartófeszültségen, magas Cl^- tartalmú intracelluláris mérőoldattal mérve. B, Az A-n árnyékolással jelölt első burst IPSC-k azonos amplitúdóra skálázott kinagyított változata látható. A kontroll sejt esetében individuális fázisos IPSC-k azonosíthatók (nyilak). Ezzel ellentétben, a $\gamma 2^{-/-}$ VB sejt spontán burst IPSC-jének lefutása egyenletes. C, Extracelluláris retikulotalamikus stimulációval gabazine-szenzitív burst IPSC-k válthatók ki mind a kontroll (bal oldalt), mint a $\gamma 2^{-/-}$ VB sejtekben. A sejtek normális, K^+ alapú mérőoldattal lettek megmérve -30 mV tartófeszültségen. D, A kiváltott burst IPSC-k karakterizálása. E, felső elvezetések: kontroll (fekete) és AAV-Cre (piros) VB sejtéből mért kiváltott burst IPSC-k különböző amplitúdóra skálázva, injektált áram protokollként használva kontroll VB sejtek esetében („Control protocol” és „Cre protocol”). Alsó elvezetések: reprezentatív feszültség válaszok növekvő áram amplitúdóval. F-H, Az injektált burst IPSC parancs hatására kiváltott talamikuss visszacsapó burst-ök kvantifikálása. A Cre protokoll hosszabb latenciával rendelkező hiperpolarizációt váltott ki (F), de hasonló amplitúdóval rendelkező alacsony küszöbű Ca_2^+ áramokat (G), és megegyező számú akciós potenciált (H) a kontroll protokollhoz képest. Az F-en és G-n egy-egy reprezentatív válasz látható, ahol a szaggatott vonalak az elemzett tulajdonságokat mutatja. A H-n feltüntetett piros és fekete szaggatott vonal a mért kontroll és AAV-Cre burst IPSC-k átlagos töltés átviteléhez tartozó akciós potenciálok számát mutatja meg. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Ugyan a $\gamma 2^{-/-}$ sejtekből mért burst IPSC-k minden vonatkozásukban eltértek a kontroll sejtekben kiváltott áramoktól (27. ábra D). Átlagosan mintegy harmada volt az áram amplitúdója (425 ± 291 pA a kontroll vs. 161 ± 93 pA az AAV-Cre sejtekben, $n_{\text{kontroll}} = 13$, $n_{\text{AAV-Cre}} = 20$, $p < 0,01$; 27. ábra D), ezáltal a töltés átvitel is kevesebb mint a felére esett vissza ($32,8 \pm 26,5$ pC a kontroll vs. $15,7 \pm 8,3$ pC az AAV-Cre sejtekben, $p < 0,05$; 27. ábra D). Az áramok felfutása is lassabb volt, mint a kontrollban (time-to-peak $33,1 \pm 10,0$ ms a kontroll vs. $55,1 \pm 25,9$ ms az AAV-Cre sejtekben, $p < 0,01$), és a lecsengése is tovább tartott (decay time constant $45,6 \pm 14,6$ ms a kontroll vs. $64,3 \pm 24,3$ ms az AAV-Cre sejtekben, $p < 0,01$; 27. ábra D). Mindennek ellenére az biztos, hogy GABA_A receptor közvetítette gátló áramról volt szó, hisz a gabazine teljes mértékben blokkolta a burst IPSC-eket ($n_{\text{kontroll}} = 12$, $n_{\text{AAV-Cre}} = 14$, 27. ábra C), míg a GABA_B blokkolónak nem volt hatása az áram nagyságára. Az is biztos, hogy nem egy nem kívánt, rosszul clamp-elt áramot láttunk, hanem Cl^- ionok mozogtak az ioncsatornákon keresztül. Ezt egy közepes Cl^- koncentrációval rendelkező intracelluláris mérőoldatot használva teszteltük le ($n_{\text{kontroll}} = 7$ és $n_{\text{AAV-Cre}} = 4$). Ekkor a stimulációs intenzitást nem változtatva, különböző tartó feszültségeken mérve a sejteket a kiváltott burst IPSC-k maximális amplitúdóinak értékei minden esetben egy egyenesre illeszkedtek (áram-feszültség összefüggés). A mért Cl^- reverz potenciál értéke megegyezett az intracelluláris és extracelluláris oldat Cl^- koncentrációja alapján számolt értékkel mind a kontroll, mind a $\gamma 2^{-/-}$ sejtek esetében (28. ábra, mért reverz potenciál érték: $-56,12 \pm 1,4$ mV, az intracelluláris és extracelluláris oldat Cl^- koncentrációja alapján számolt érték: $-56,86$ mV). Az adatok tehát arra utalnak, hogy a szinaptikus GABA_A receptorok hiányában is számottevő lassú, fázisos GABA_A áram mérhető abban az esetben, ha a preszinaptikus sejt burst módban tüzel. Úgy tűnik, ezek az események a szinaptikus GABA_A receptoroktól függetlenül, nem-szinaptikus GABA_A receptorok bevonásával keletkeznek.

Egyetlen nRT sejt burstölése elegendő ahhoz, hogy a vele kapcsolatban álló poszt-szinaptikus talamokortikális relésejtet visszacsapó burst tüzelésre készítse (Kim és mtsai., 1997). Arra, hogy mennyire hatékony a $\gamma 2^{-/-}$ sejtekben megmaradó burst IPSC a poszt-szinaptikus relésejtekben visszacsapó burst kiváltására, további kísérletekkel teszteltük. Az általam kontroll és $\gamma 2^{-/-}$ VB sejtekből mért burst IPSC-eket áram parancsként alkalmaztuk kontroll, nem fertőzött állatok relésejtjein ($n = 7$ mindkét esetben). A burst



28. ábra. A burst IPSC-k egyértelműen Cl^- mozgáshoz köthetők. A, Különböző tartó-feszültségen tartott kontroll (fekete) és $\gamma 2^{-/-}$ (piros) relésejteken kiváltott burst IPSC. B, Az áram-feszültség összefüggés alapján látható, hogy az áram lineárisan változik a feszültséggel, azaz feltehetőleg csak a Cl^- mozgása alakítja ki a mért áramot. C, A kontroll és $\gamma 2^{-/-}$ relésejtekből mért Cl^- reverz potenciálok megegyeznek egymással, sőt az intracelluláris oldat Cl^- koncentrációja alapján számolt értékkel is azonosak.

IPSC-k amplitúdóját úgy skáláztuk, hogy a posztzinaptikus relésejtek burst tulajdonságait részletesen ki tudjuk elemezni. A 27. ábrán látható, hogy mind a kontrollból, mind a $\gamma 2^{-/-}$ relésejtekből származó burst IPSC elegendő hiperpolarizációt biztosít a relésejtek T-csatornáinak deinaktiválására, és ezáltal visszacsapó burstok kiváltására. Egyedüli szignifikáns különbséget abban találtunk, hogy a relésejt mikor éri el a leghiperpolarizáltabb állapotot (27. ábra F): ez a $\gamma 2^{-/-}$ sejtekből származó parancsra mindig később következett be. Azonban sem a keletkező Ca_2^+ áramokban (27. ábra G), sem a burston belüli akciós potenciálok számában (27. ábra H) nem találtunk különbségeket a kétféle áram parancs hatására. Mindemellett nem szabad elfeledkeznünk arról, hogy átlagosan a burst IPSC-k amplitúdója, és ezáltal töltés átvitele is sokkal kisebb volt a $\gamma 2^{-/-}$ relésejtekből, mint a kontroll sejtekből. Így nem érdemes egy az egyben összehasonlítani az azonos értékekre skálázott burst IPSC parancsok által kapott eredményeket, hisz a kontroll sejtekből kisebb nRT aktivitás is elegendő ahhoz, hogy a posztzinaptikus relésejtet burstölére készítse, mint a $\gamma 2^{-/-}$ sejtek esetében. A 27. ábra H részén szaggatott vonal jelöli a kontroll és a $\gamma 2^{-/-}$ relésejtekből mért töltés átvitel értékeknek megfelelő akciós potenciál számot.

Az eredményekből mégis az látszik, hogy a csökkent töltés átvitel ellenére is fennmarad a talamikus visszacsapó burst-ölés.

5.2.6. A GABA_A γ 2 floxolt egér kísérleteinek összefoglalása

1. A GABA_A receptor γ 2 alegységének kondicionális kiütése nem okoz aberráns oszcillációt a kéregben.
2. Egysejt elvezetések azt tanúsítják, hogy a szinaptikus gátlás megszűnésének ellenére a relésejtek burst aktivitása fennmarad ketamine-xylazine altatott egerek talamuszában. A burstök tulajdonságai azonban eltértek a kontroll sejtekben mért tulajdonságoktól.
3. Sok-csatornás talamikus elvezetések alapján megállapíthatjuk, hogy a talamokortikális spindle oszcilláció keletkezéséhez nincs szükség szinaptikus γ 2 GABA_A receptoralegységre. A kortikális 7-15 Hz-es aktivitás is intakt módon megmarad szabadonmozgó állatokban.
4. A GABA_A receptor γ 2 alegysége valóban eltűnik a talamikus relésejtek plazmamembránjáról az AAV-Cre vírusfertőzés következtében γ 2 floxolt egerekben.
5. A γ 2^{-/-} talamikus relésejtekből nem vezethető el gyors IPSC.
6. A γ 2^{-/-} relésejtekből kisebb tónusos áram mérhető, mint a kontroll sejtekben.
7. A γ 2^{-/-} relésejtek kompaktabbak, input rezisztenciájuk nagyobb, mint a kontroll sejteké.
8. A γ 2^{-/-} relésejtekből is mérhető burst IPSC, ugyan lassabb és kisebb, mint a kontroll sejtek esetében.
9. A maradék burst IPSC elegendő ahhoz, hogy a VB sejteket kellőképpen hiperolarizálja, és fenntartsa az alacsony küszöbű burstölést *in vitro*.

6. MEGBESZÉLÉS

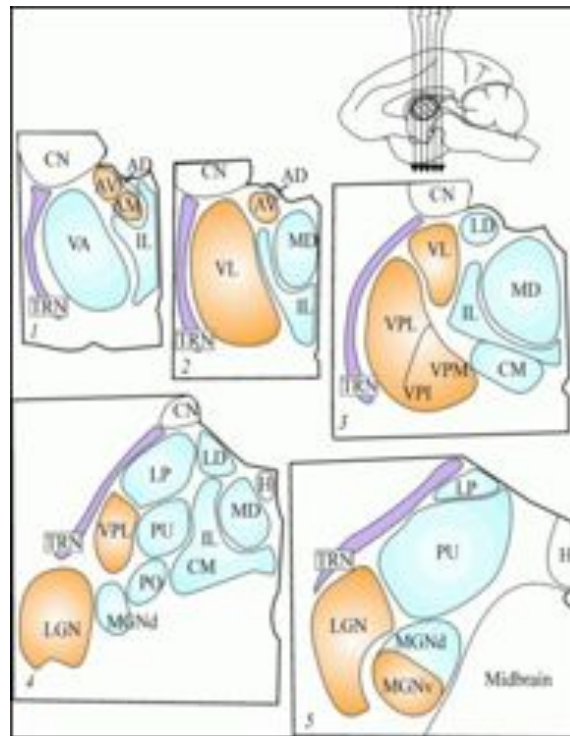
PhD munkám során mind a majmokon végzett anatómiai, mind a $\gamma 2$ floxolt egereken végzett anatómiai és *in vitro* elektrofiziológiai kísérletsorozatban a talamusz szerveződését, szinaptikus kapcsolatait kísértem meg feltárni.

6.1. A főmlős talamusz drivereinek nyomában

Munkám során arra törekedtem, hogy a lehető legpontosabb képet adjak a főmlősök talamuszának serkentő óriásterminálisainak térbeli eloszlásáról. A térképezés során azzal az egyszerűsítéssel éltünk, hogy driver bemenetnek tekintettünk minden olyan glutamáterg terminálist, melyre elektronmikroszkópos szinten ráillett az RL-típusba való sorolás. Ez a kritérium természetesen kevés ahhoz, hogy meggyőződjünk arról, hogy az óriásterminálisok aktivitását a posztzinaptikus relésejtek tüzelése követi. Ezt csak elektrofiziológiai mérésekkel lehetne tisztázni. Mégis, úgy gondolom, a terminális mérete önmagában nagyon jó indikációja annak, hogy potenciális driver bemenettel van dolgunk.

Mivel ezen driver bemenetek képezik az alapját a bevezetőben ismertetett driver teóriának, elengedhetetlen, hogy birtokunkban legyen az információ azok pontos elhelyezkedéséről. Sherman és Guillery felvázolták a driver bemenetek lehetséges térbeli eloszlását a talamuszban (29. ábra). Mindehhez nagy segítséget jelentett számukra az irodalomban fellelhető számos pályakövető vizsgálat eredménye. Elképzelésük alapján a talamuszt kb. fele-fele arányban idegzik be szubkortikális eredetű, ill. kortikális eredetű driverek (Sherman, Guillery, 2006).

Mi a főmlősök talamuszának drivertérképét alapos fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatok alapján vázoltuk fel. Az így kapott térképen megjelenik a driverek eredete (kortikális vs. szubkortikális), a mérete (nagy vagy közepes), illetve a különböző eredetű driverek konvergenciája, szegregációja. Mindezeket figyelembe véve, mint ahogy az a 16. ábrán is látható, a majom talamuszban hat különböző típusú driver előfordulást különítettünk el. Ezek között megtalálható kizárólag szubkortikális (hagyományos) elsőrendű relé, kizárólag kortikális driver bemenettel rendelkező magasabbrendű relé, e két típusú terület határait jellemző konvergens régió, serkentő óriásbemenettel nem rendelkező régió, kis méretű kortikális driverekkel beidegzett talamikus terület, illetve kis méretű kortikális és



29. ábra. A főemlős thalamusz felosztása Sherman és Guillery rendszere alapján. Az elsőrendű (narancssárga) és a magasabbrendű (világoskék) thalamikus relék elhelyezkedése a makákó thalamusz öt koronális szintjén. Elsőrendű magok ez alapján: az anteroventral, anteromedial (AV, AM) és a ventrolateral nucleus (VL), a ventral posterolateral, a ventral posteromedial, a ventral posteroinferior nucleus (VPL, VPM, VPI), a lateral geniculate nucleus (LGN) és a ventral medial geniculate nucleus (MGN(V)). Magasabbrendű magokhoz tartozik az anterodorsal nucleus, az intralaminar nucleus (IL), a ventral anterior nucleus, a mediodorsal nucleus (MD), a centromedian nucleus (CM), a laterodorsal (LD), a lateroposterior (LP), a posterior nucleus (Po), a pulvinar (PU) és a dorsal medial geniculate nucleus (MGN(D)). A thalamic reticular nucleus (TRN) a ventrális thalamusz része, míg a caudate nucleus (CN) és a habenula (H) nem thalamikus struktúra. (Sherman, Guillery, 2006)

kis méretű szubkortikális driver bemenetekkel egyaránt ellátott terület.

Az így kapott régiók alapvetően, de nem minden tekintetben, megegyeznek a korábban megállapított thalamikus maghatárokkal. A térkép jelentős klinikai alkalmazási lehetőségeket rejt magában, hisz általa jól elkülöníthetőek a motoros thalamusz cerebellum-recipient és bazális ganglion-recipient régiói, vagy például a pulvinar az azt körülvevő szenzoros és motoros thalamusztól. Ezzel szemben a bemenet alapú térképezés nem teszi lehetővé, hogy a VPL zónáját elkülönítsük a VPM-től vagy a motoros VL magtól. Illetve azt sem tudjuk meg, hogy egy adott vGLUT1 vagy vGLUT2 tartalmú terminális valójában

honnan ered. Így továbbra is érdekes kérdés, hogy a talamuszra jellemző, jól ismert topografikus vetülés ellenére létezik-e olyan régió, ahol különböző eredetű perifériás, vagy különböző kérgi régiókból származó ötödik rétegi bemenetek konvergálnak.

Eredményeink keretet adnak a korábbi és jövőbeni talamuszt érintő főemlőskutatóknak, és emellett hozzásegítenek a talamuszt érintő humán neurológiai kórképek morfológiai karakterizálásához.

6.1.1. Valódi szubkortikális irányítás

Több talamikus régióról igazoltuk szubkortikális driver bemenetei alapján, hogy valóban megfelelnek az elsőrendű relé besorolásnak, mint a primer szenzoros magok, a cerebellum recipiens talamusz, vagy az anterior magcsoport (Sherman, Guillery, 2006). Elsőként sikerült bebizonyítanunk, hogy ezen régiók egységesen és kizárólag kéreg alatti serkentő óriásbemenetekkel rendelkeznek.

Habár a talamusz első felismert és mindmáig köztudottan legfontosabb tulajdonsága a perifériás (szenzoros) információ agykéreg felé való relézése, eredményeinkből az látszik, hogy a főemlős talamusz igen nagy hányadáról hiányoznak az ehhez szükséges szubkortikális driver bemenetek.

Továbbá, Sherman és Guillery által alkalmazott felosztás ellenére számos magasabbrendű talamikus régióról derült ki az adataink alapján, hogy kizárólagosan szubkortikális driver beidegzéssel rendelkeznek, azaz a driverek eredete alapján nem sorolhatók többé a magasabbrendű relék közé. Ilyen talamikus régió volt a rostrális intralaminaris magcsoport, vagy a mediodorsal mag mediális aspektusa az azt szegélyező midline magokkal együtt. Mindkét magcsoportot felelőssé tették fájdalom ingerek közvetítésében (Krouse és Mtsai, 2002). Ez alapján feltételezhető, hogy ezek a régiók szubkortikális driverek révén abnormális perifériás ingerekről értesítik az anterior cingulate kéreg krónikus fájdalom során (Price, 2000; Krouse és Mtsai, 2002)

6.1.2. Valódi kortikális irányítás

Eredményeink minden kétséget kizárólag igazolják, hogy kiterjedt talamikus régiók kizárólag az agykéreg felől kapnak irányító serkentő óriásbemeneteket, kéreg alatti területekről nem (9. ábra és 16. ábra). Mindez azt jelenti, hogy az ilyen régiókban található

relésejtek csak az ötödik rétegi piramissejtek aktivitásától függenek, minden más bemenet moduláló tulajdonsággal rendelkezik mindössze. A kortikális eredetű driver bemenetekről újabban igazolták, hogy ugyanolyan hatékonysággal és elektrofiziológiai tulajdonságokkal rendelkeznek, mint a szubkortikális driver bemenetek (Reichova , Sherman, 2004; Groh és mtsai., 2008). Mivel az ötödik rétegi piramissejtek által hajtott relésejtek a kéregbe vetítenek vissza, ezért ez a neurális összeköttetés-rendszer megalapozhatja a talamuszon keresztül zajló kortiko-kortikális információtovábbítást (Theyel és mtsai., 2010), illetve olyan magasabb rendű szenzoros folyamatokat, ahol egyaránt szükség van a magasabb és alacsonyabb szintű információk bevonására (Purushothaman és mtsai., 2012). A magasabbrendű talamusz pontos funkciója forró vita tárgyát képezi a kutatók körében, mindazonáltal eredményeink arra utalnak, hogy a főemlősök talamuszának nagy hányada magasabb rendű funkciók ellátására szakosodott.

6.1.3. Konvergáló driver bemenetek

Az első- és magasabbrendű relék találkozásánál a kortikális és szubkortikális serkentő óriásterminálisok közel helyezkednek el egymáshoz (10. ábra). Mégis, a rágcsáló adatokkal ellentétben, a főemlősök talamuszában a kétféle eredetű driver bemenetek szegregációja jellemző, habár kisebb határzónákon a különböző eredetű driver bemenetek egymással átfedő beidegzést mutattak. Amennyiben az itt található relésejtekről beigazolódik, hogy mindkét fajta driver bemenettel rendelkeznek, akkor azok feltehetőleg a „fentről” érkező motoros-, illetve „lentől” érkező szenzoros információk egyszerre történő detektálásában lehetnek fontosak.

6.1.4. Driver bemenetek hiányában

A bazális ganglionokkal összeköttetésben álló talamikus területeken (ventral anterior mag) egyetlen RL-típusú multiszinaptikus végződést sem lehetett detektálni. A relésejtek proximális dendritszakaszai ezekben a régiókban bazális ganglion eredetű gátló óriásvégzésekkel képeznek szinapszisokat (Kultas-Ilinsky , Ilinsky, 1990; Kultas-Ilinsky és mtsai., 1997; Bodor és mtsai., 2008). A bazális ganglionok által kialakított multiszinaptikus gátló végzések nagyon hatékonyak a nagy frekvenciával érkező gátló ingerek továbbításában (Wanaverbecq és mtsai., 2008). A bazális ganglion eredetű rostok inger-

lése elegendő ahhoz, hogy az a posztszinaptikus relésejtekből visszacsapó burst tüzelést váltson ki (Person , Perkel, 2005). Mindez a GABAerg jelátviteli útvonal hatékonyságát és fontosságát hangsúlyozza. A ventral anterior mag erős GABAerg befolyása lehet az alapja a Parkinson-kór során kialakuló aberráns bazális ganglion aktivitás kéreg felé történő közvetítésének (Bosch-Bouju és mtsai., 2013).

Habár a kortikális driverek hiányoznak a VA területéről, ez nem azt jelenti, hogy az ötödik rétegi piramis sejtek ne küldenének ide axonokat (Zikopoulos , Barbas, 2007). Csoportunk jelenleg is intenzíven vizsgálja azt, hogy az ötödik rétegi RS-típusú végződéssek elektrofiziológiai tulajdonságaikban mennyiben térnek el a hatodik rétegi modulátoros végződésektől.

Egy újabb elmélet szerint a motoros talamikus magok a mozgás előkészítését és kivitelezését segítik elő nyitott visszacsatoló kör részeként (Bosch-Bouju és mtsai., 2013).

6.1.5. Lehet-e GABAerg bemenet „driver” a talamuszban?

Egy gátló inger abban az esetben közvetít információt, ha egy viszonylag magas alapaktivitással rendelkező sejtre érkezik. Ebben az esetben a tüzelési frekvenciában bekövetkező csökkenéssel képes a posztszinaptikus sejt továbbítani a ráérkező ingert. Ellenben, ha ez nem következik be, akkor a gátló ingernek a serkentő ingerrel közel azonos időben kell ahhoz érkeznie, hogy a gátlás érvényesüljön. A talamusz esetében további fontos tényező, hogy a gátló inger képes-e annyira hiperpolarizálni a relésejteket, hogy azok T-csatornái deaktiválódjanak, ezáltal kialakulhasson a visszacsapó vagy rebound burst.

Lassú hullámú alvás során, amikor a talamokortikális és nRT sejtek hiperpolarizáltak, és ritmikus burst módban tüzelnek, a relésejtek aktivitását a gátló nRT bemenet dominálja. Ekkor a serkentő driverek által keltetett EPSP-k nem elegendőek ahhoz, hogy megtörjék az nRT diktálta ritmust. A relézés ideiglenesen szünetel, amiről a kéreg a ritmikus burst tüzelés révén értesül. Ha keresztkorrelációt készítenénk a bemenetet biztosító nRT és a relésejtek tüzelése között, akkor a drivereknél látott csúcsot kapnánk (lásd 2. ábra), ugyan nagyobb, pár száz ms-os latenciával. Mégsem tekinthetjük ezt a fajta bemenetet drivernek, hisz a szinkronitás alapja a szoros reciprok kapcsolat a két serkentő és gátló sejt populáció között. Ennek ellenére modulátornak sem tekinthető az inger, hisz a relésejtek tüzelését egyértelműen az nRT irányítja.

Mivel a gátló óriásterminálisok sok tekintetben hasonlítanak a serkentő driverekre,

felmerül a kérdés, hogy a szerepüket is át tudják-e venni. Aktiválódásuk jelentősen befolyásolja a posztszinaptikus relésejtek tüzelését: a zona incerta felől érkező gátló ingerek hatásosan interferálnak a perifériás driverekkel előre csatoló gátlás révén (Lavallée és mtsai., 2005), az APT-talamikus rostok aktiválása rebound burst tüzelést vált ki a relésejtekből (Bokor és mtsai., 2005). Az azonban továbbra is vitatott, hogy serkentő driverek hiányában a gátló óriásterminálisok milyen szerepet játszanak a relésejtek tüzelésében.

6.1.6. A driver terminálisok méretbeli inhomogenitása

Mint ahogy azt a 14. ábra is mutatja, a talamikus magokba érkező driver bemenetek mérete és komplexitása nagy változatosságot mutat. A különböző régiókból származó RL-típusú terminálisokat folytonosan csökkenő méret szerint sorba lehet rendezni, egészen addig, mígnem az RS-típusú végződés méretéig nem jutunk. A két véglet között számos kisebb, multiszinaptikus végződéssel találkozhatunk a talamusz különböző régióiban mind a kortikális, mind a szubkortikális fajtából. Mivel a talamuszon keresztül relézett üzenet függ a driver bemenetek méretétől és eredetétől, az adataink számottevő változatosságot sugallnak a talamokortikális sejtek jelfeldolgozásában. Kis méretű RL-típusú végződéseket más is kimutatott már a makákók mediális pulvinarjában (Darian-Smith és mtsai., 1999), illetve a CM-Pf komplexében (Balercia és mtsai., 1996), ami alátámasztja a saját eredményeinket. Az idegvégzódések pontos karakterizálása azok nagy populációjának térbeli rekonstrukcióját igényli, ami a jelen munkában nem volt cél. Adataink azonban ahhoz elég részletesek, hogy megállapítsuk, a driver bemenetek mérete és komplexitása nagyon különbözik a talamusz régiói között. Ezért a talamokortikális információtranszfer megértéséhez a driver bemenetek méretét feltétlenül figyelembe kell venni. További vizsgálatok szükségesek ahhoz, hogy eldöntsük, a kisebb méretű óriásterminálisok is képesek-e irányítani a posztszinaptikus relésejtek tüzelését. Nem kizárt, hogy bár az átlagos terminális méret ezeken a területeken kisebb, de ezt a sejt kompenzálja nagyobb számú terminálissal vagy sűrűbb beidegzéssel.

Mi lehet a driver bemenetek heterogenitásának funkcionális jelentősége? A hagyományos talamokortikális információtovábbítás két legfontosabb tulajdonsága a posztszinaptikus sejt kisütésének nagy valószínűsége, illetve a repetitív aktivációt követő gyors depresszió (Chung és mtsai., 2002; Chen és mtsai., 2002; Deschênes és mtsai., 2003; Groh és mtsai., 2008; Budisantoso és mtsai., 2012). Ez azt jelenti, hogy a talamikus termináli-

sok pontos mérete és alakja jelentősen befolyásolják a szinaptikus jelátvitelt, mint ahogy azt összetett kisagyi terminálisokban is leírták (Cathala és mtsai., 2005).

A mikroszkópban látott ultrastruktúrát funkcionális paraméterekkel korreláltatni nem egyszerű feladat. Egy nagyszabású kísérletsorozatban Holderith Noémi és munkatársai mégis ezt tűzték ki célul (Holderith és mtsai., 2012). Korrelált két-foton Ca_2^+ -imaging alapú kvantális analízis és elektronmikroszkópos térbeli rekonstrukció segítségével igazolták, hogy szoros összefüggés van az axonterminális aktív zónájának mérete és a vezikuláürülés valószínűsége között hippocampális glutamáterg szinapszisokban. A terminálisok térfogata szintén párhuzamosan változott az aktív zóna méretével, habár ebben az esetben a korreláció kisebb mértékűnek bizonyult.

Az azonban továbbra is kérdéses, hogy hasonló összefüggés komplex struktúrával jellemezhető serkentő terminálisokra is fennáll-e. Mindezen eredmények ellenére a makákók talamuszában megfigyelt változatos méretű RL-típusú terminálisok jelenléte arra utal, hogy a talamokortikális információtranszfer is változatos lesz.

6.2. Mihez (nem) kell egy szinaptikus GABA_A receptoralegység?

A központi idegrendszerben tapasztalat gátlási formák egyre szélesebb körével ismerkedhettünk meg az utóbbi fél évszázadban. Legkorábban a gátlás szinaptikus formáját ismerték fel, majd a pontos GABA_A receptoralegységek ismeretében a receptorok kinetikájáról is részletes képet kaptunk. Később a pre- és posztszinaptikus membránban is megtalálható GABA_B receptorok családjával egészült ki a gátlásról kialakult kép, további változottságot, és szabályozási lehetőséget biztosítva az idegrendszerben. Az utóbbi évtizedek jelentős felfedezése volt a fázisos transzmitterürüléshez közvetlenül nem köthető tónusos gátlás kimutatása egyes agyterületeken (Farrant , Nusser, 2005; Mody , Pearce, 2004). Végül, gyakran morfológiailag specializált, periszinaptikus GABA_A receptorokhoz köthető, spillover-közvetítette lassú GABA_A áramokat lokalizáltak az agykéregben (Szabadics és mtsai., 2007), a kisagyban (Rossi , Hamann, 1998; Crowley és mtsai., 2009), illetve az amygdalában (Mańko és mtsai., 2012).

A második tanulmányban megmutattuk, hogy a talamokortikális kör $\gamma 2$ alegységfüggetlen GABA_Areceptorok által szabályozott. Ezek a receptorok abban az esetben aktiválódnak, amikor az nRT átvált burst tüzelésre, így egy tüzelési mód specifikus gátló kommunikáció valósul meg. Ellentétben a korábbi nézetekkel, eredményeinkből úgy tűnik, hogy a konvencionális szinaptikus GABA_A receptorok nem nélkülözhetetlenek a talamikus ritmusokhoz, mivel a burst-közvetítette nem-szinaptikus gátlás önmagában is hatékonyan kiváltja a posztszinaptikus visszacsapó burst tüzelést a talamikus relésejtekben, illetve elegendő a lassú hullámú és spindle oszcilláció fenntartásához mind alvás, mind altatás során.

6.2.1. Az alkalmazott módszer előnyei

Kísérletsorozatunk a GABA_A receptor $\gamma 2$ alegységek lokális vírusmediált génkiütésén alapult. A módszernek számos előnye van a farmakológiai módszerek és a hagyományos teljes KO állatok használatával szemben. Először is, a módszer szelektív a $\gamma 2$ alegységekre; az extraszinaptikus alegységek expresszióját nem befolyásolja: mind a szinaptikus $\gamma 2$ klaszterek, mind a spontán és kiváltott gyors GABA_A áramok eltűntek az érintett sejtekből, míg az $\alpha 4$ alegységet tartalmazó receptorok expressziója nem változott. Másodsor, a módszerrel elkerülhetőek a teljes-KO állatokban tapasztalt egyedfejlődés so-

rán fellépő kompenzációs mechanizmusok, a génkiütés fiatal felnőtt korban elvégezhető. Sőt, bebizonyosodott, hogy az extraszinaptikus GABA_A receptoralegységek nem képesek a szinaptikus receptorokat helyettesíteni egyedfejlődés során sem (Peden és mtsai., 2008). Ez a tény tovább szűkíti annak a lehetőségét, hogy a fennmaradó GABA_A receptorok szerepe jelentősen megváltozott volna a vírusbeadást követően. Harmadszor, a vírusbeavatkozás a talamusz területére korlátozódott, míg a talamokortikális kör más részein (nRT, agykéreg) a szinaptikus gátlás továbbra is érintetlen maradt. Mindezzel ellentétben a korábban alkalmazott farmakológiai technikák kevésbé voltak alegység és terület specifikusak, ami az irodalmi adatok eltérő értelmezéséhez vezetett (Crunelli és mtsai., 2011). Negyedszer, konvencionális módszerekkel eddig lehetetlen volt az összetett eredetű rendelkező GABA_A áramok tanulmányozása, mivel sem $\gamma 2$ alegység specifikus drog nem létezik, sem a teljes $\gamma 2$ -KO állat nem életképes. Míg az általunk alkalmazott módszerrel kvantitatív módon lehetett az extraszinaptikus GABA_A receptorokat jellemezni, és az általuk kialakított fázisos gátlás következményeit tanulmányozni.

6.2.2. Eltérő tüzelési mód különböző gátlási móddal párosul

Eredményeink rámutattak arra, hogy jelentős különbség figyelhető meg a kiváltott IPSC-k között abban az esetben, ha a preszinaptikus sejt tónusos vagy burst tüzelési módban tüzel. A spontán és kiváltott gyors IPSC-k teljes eltűnése a szinaptikus receptorok kivágását követően arra utal, hogy tónusos tüzelés során a gyors IPSC-eket elsősorban szinaptikus receptor-ioncsatornák közvetítették. Ezzel éles ellentétben, burst tüzelési mód esetén jelentős nem-szinaptikus (feltételezhetőleg extraszinaptikus) receptor populáció is bevonásra került. Mindez azt jelenti, hogy a talamik lassú GABA_A áramok aktiválódásához az nRT sejtek burst tüzelése szükséges. A sejtek tónusosból burst módba való kapcsolása hatalmas töltés átvitel növekedést eredményezett (180-szoros). Ez a típusú fázisos, nem-szinaptikus gátlás elegendő volt ahhoz, hogy a poszt-szinaptikus sejtől visszacsapó burst tüzelést váltson ki. Mindezt az *in vitro* megfigyelést megerősítik az *in vivo* talamik egyesjt elvezetések, ahol a sejtek szinaptikus GABA_A receptorok hiányában is burst módban tüzeltek, sőt a talamokortikális oszcilláció sem módosult jelentősen.

Fontosnak tartom megjegyezni, hogy az nRT sejtek tüzelési módja szorosan korrelál a viselkedési állapottal. Míg tónusos tüzelés elsősorban az ébrenlét során keletkezik, burst tüzelés határozza meg az alvás (NREM fázis) és álmoság során tapasztalt tala-

mikus agyi aktivitást (Steriade és mtsai., 1986). Az általunk is mért lassú GABAerg jel képes a T-típusú Ca_2^+ csatornák ritmusos deinaktiválódásának időzítésére, így alvás során a talamokortikális ritmus beindítására és fenntartására. Ezzel ellentétben az ébrenlét során tapasztalt gyors tónusos tüzelés túlságosan rövid gátló áramokat eredményez, mely a szenzoros információ kontrollálására alkalmas, de a T-csatornák deinaktiválásához nem járul hozzá.

A kisülések gyors sorozatának, mint amilyenek a talamikus alacsony küszöbű burstok, egészen más hatása van az idegi hálózatokra, mint az egyszerű tüzelésnek. A burst módban tüzelő sejtek az információnak bizonyos jellegét felerősítve hordozhatják (Xu és mtsai., 2012). Az agyban a transzmitter ürülésének valószínűsége egyszeres tüzelés esetén alacsony (Borst, 2010). Egy gyors kisüléssorozattal azonban a transzmitter ürülésének valószínűsége jelentősen nő, mely megnöveli a szinaptikus transzmisszió megbízhatóságát (Lisman, 1997). Éber állapotban a talamikus burstok arány mindössze pár százalék (Guido, Weyand, 1995). Ébrenlét során ennek megfelelően a burst tüzelés alkalmas lehet éles figyelmi állapotváltozások közvetítésére (Crick, 1984; Sherman, 2001b). Így, habár a tónusos tüzelés a meghatározó a talamuszban ébrenlét során, az időnként megjelenő burstok szintén releváns információt közvetíthetnek a kéreg felé a környezetben történt változásokról (Bosch-Bouju és mtsai., 2013).

Meglepetésként tapasztaltuk, hogy a szinaptikus GABA_A receptorok kiütése a szelektiben mért tónusos áramra is hatással volt, mivel az anatómiai adatok nem utaltak az extraszinaptikus $\alpha 4$ alegység megváltozott szintjére. A csökkent tónusos gátlásra magyarázattal szolgálhat, hogy a disztális dendritszakaszokról is eltűnt a gyors fázisos gátlás, ami a sejttestből elvezetve a dendritikus szűrés miatt megkülönböztethetetlen a tónusos áramtól (Farrant, Nusser, 2005). Másrészt, nem zárható ki az sem, hogy az ambiens GABA koncentráció homeosztatisz szabályozás révén csökkent, vagy a szinaptikus GABA_A receptorok is hozzájárultak a tónusos áram kialakításához.

6.2.3. Az epilepszia hiánya a vírusfertőzött állatokban

Először is nem tapasztaltunk a gabazine indukálta epilepsziához hasonló aberráns oscilációt *in vivo* altatott állatban, ha „csak” a szinaptikus GABA_A receptorokat távolítottuk el a talamuszból. A későbbi eredményeink tükrében mindez a jelenség megmagyarázható a fennmaradó (ugyan jelentősen csökkent) burst IPSC-kkel.

Másrészt, számos tekintetben különbözik egymástól a talamikus gátló áramok farmakológiai és genetikai blokkolása. Ugyanis míg a gabazine-t nagy koncentrációban egyszerre mostuk be a talamuszba, addig a vírus által közvetített $\gamma 2$ alegység kivágódása minimum órák, ha nem napok alatt zajlott le. Mindez elősegíti a gyors kompenzációs mechanizmusok fellépését, amire a gabazine esetében nincs mód.

6.2.4. A vírusfertőzött relésejtek is burstölnek altatás során - ugyan kicsit másképp

A kísérleti felállásunk lehetőséget biztosított arra, hogy a normálisan oszcilláló neurális hálózatba ágyazott egyedi, szinaptikus gátlást nélkülöző talamokortikális sejtek tüzelési mintázatát tanulmányozzuk. Kísérleteinket két talamikus régióban végeztük, az elsőrendű VB magban és a magasabbrendű Po magban, melyekről tudjuk, hogy eltérő serkentő és gátló összeköttetésrendszerrel rendelkeznek (Hoogland és mtsai., 1991; Bartho és mtsai., 2002; Bokor és mtsai., 2005; Wanaverbecq és mtsai., 2008; Groh és mtsai., 2013).

Mivel a relésejtek rendelkeznek minden olyan konduktanciával, ami lehetővé teszi bennük a spontán, ritmusos, alacsony küszöbű burstök keletkezését, ezért az a tény, hogy szinaptikus GABA_A gátlás hiányában is képesek erre altatás során, nem meglepő. Viszont, mivel ketamine-xylazine altatás során csak az Up state-ek alatt burstöltek a $\gamma 2^{-/-}$ relésejtek, ez azt jelenti, hogy a kéreg valamiképpen összerendezi a talamikus oszcillációt az Up state-ekkel. Csoportunk nagy múltra tekint vissza a talamikus relésejtek (elsősorban az elsőrendű VB és a magasabbrendű Po) lassú oszcillációhoz való fáziskapcsoltságának vizsgálatában (Slézia és mtsai., 2011). A két vizsgált területen jelentős magok közötti különbségeket találtunk. A magasabbrendű magokban a kortikális ötödik rétegi óriásterminálisok relésejteken kifejtett szinkronizáló hatása egyértelműen látható, itt rögtön az Up state elején burstölnek a relésejtek. Az elsőrendű régiókba azonban nem érkezik csak moduláló bemenet a kéregből, ott a kéreg befolyása inkább az nRT közbeiktatásával valósul meg, ezért is kevésbé fáziskapcsoltak a sejtek az Up state elejéhez (Groh és mtsai., 2013). Esetünkben az AAV-Cre vírusfertőzött VB és Po sejtek Up state-ekhez történő fáziskapcsoltságának megállapítása nem volt cél (főleg technikai okok miatt nem tettünk rá kísérletet). Gondolat-kísérletben lefuttatva az analízist fáziseltolódásban megnyilvánuló hatást csak a VB sejteknél feltételezhetnénk, hisz az ő tüzelésük jobban függ a gátló nRT bemenetektől, mint a magasabbrendű Po tüzelése. Mivel azonban a $\gamma 2^{-/-}$ sejtekben is megmaradt (ugyan méretében jelentősen csökkent) az nRT eredetű burst IPSC, ezért a

VB sejtek fáziskapcsoltságában is mindössze minimális változást valószínűsíthetünk.

Mint ahogy az a 18. ábrán is látható, az AAV-Cre vírusfertőzött sejtek burstölése megmaradt, de maguk a burstök sok tekintetben eltérnek a kontrollban mért burstöktől. A VB esetében csökkent a relésejtek tüzelési frekvenciája (mintegy a felére a kontrollhoz képest), amit elsősorban az alacsonyabb burst frekvencia magyaráz (ami szintén kb. a felére esett vissza). Tehát ritkábban burstölnek a $\gamma 2^{-/-}$ VB sejtek.

A burstök intraburst frekvenciája is szignifikánsan kisebb lett. Mivel az intraburst frekvencia csak a T-csatornák által létrehozott depolarizációtól (és nem a beáramló Ca_2^+ által aktivált egyéb konduktanciáktól) függ (Tscherter és mtsai., 2011), ezért kijelenthetjük, hogy az AAV-Cre vírusfertőzött VB sejtjeiben kevesebb T-típusú Ca_2^+ csatorna aktiválódott. Ahhoz, hogy a csatornák aktiválódni tudjanak, azokat előbb deinaktiválni kell egy megfelelő nagyságú hiperolarizáló bemenettel. Mivel a $\gamma 2^{-/-}$ VB sejtekben szignifikánsan kisebb töltés átvitelrel rendelkező gátló burst IPSC-eket lehet csak kiváltani, ezért ezek feltehetőleg nem mindig elegendőek ahhoz, hogy a T-csatornákat deinaktiválják (ezért csökkenhet le a burst szám), illetve ha ki is váltanak alacsony küszöbű burstöt, a kinyíló T-csatornák száma kevesebb, ami kisebb depolarizációval, ezáltal lassabb intraburst frekvenciával jár. Mivel a burstön belüli akciós potenciálok száma nem változott, ezért értelemszerűen hosszabb egyedi burstöket kaptunk az AAV-Cre vírusfertőzött VB sejtjeiben.

Úgy gondoljuk, hogy a Po sejtek esetében a serkentő bemenetnek nagyobb a szerepe az alacsony küszöbű burstök kiváltásában, mint a gátló bemenetnek. A Down state végére ugyanis a relésejtek saját tulajdonságuknak megfelelően kellő mértékben hiperpolarizálódtak ahhoz, hogy elegendő számú T-csatornájuk kerüljön deinaktivált állapotba. Ekkor az Up state elején érkező kortikális ötödik rétegi driver bemenetek elegendőek ahhoz, hogy szinkron kiváltsák az alacsony küszöbű burst tüzelést a Po sejtjeiből. Mivel a depolarizáció mértéke a deinaktivált T-csatornák számától függ, azok pedig a Down state alatt kellő számban deinaktiválódtak, ezért sem az átlagos tüzelési frekvenciában, sem a burstök frekvenciájában, sem az intraburst frekvenciában nem várunk, és nem is tapasztaltunk különbséget a vírusfertőzött és a kontroll oldal sejtjei között. Egyedül a burstön belüli akciós potenciálok száma esett le szignifikánsan, ami által a burstök hossza is megrövidült. Mivel fiziológias körülmények között a T-csatornák inaktivációs fél-maximum feszültsé-

sége közel van ahhoz a feszültséghez, ahol már a csatornák deinaktiválódnak, ezért az inaktivációs feszültségfüggésben bekövetkező apró modulációknak is nagy hatása lehet a relésejtek ingerlékenységére és szinaptikus integrációjára (Tschertter és mtsai., 2011). Éppen ezért láthatjuk a burstön belüli akciós potenciálok lecsökkenését is, amit feltehetőleg a csökkent szinaptikus gátlás számlájára lehet írni.

Mivel a talamikus relésejtek burst üzemmódja tekinthető a sejtek alapállapotának, ez annyira robosztus tulajdonságuk, hogy a szinaptikus gátlás kiesése kvalitatíve nem befolyásolja a megjelenésüket.

Mindezek alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a szinaptikus gátlás hatása egy sejt tüzelési mintázatának kialakításában attól függ, hogy az adott sejt milyen neurális hálózat része.

6.2.5. Fennmarad az orsó, de lelassul

Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a talamikus orsó oszcilláció fennmaradt a funkcionális szinaptikus GABA_A receptorok hiányában is. Az orsó oszcilláció keletkezéséhez intakt T-típusú Ca₂⁺ csatornákkal rendelkező nRT-ra van szükség (Astori és mtsai., 2011). Az nRT-ban keletkező alacsony küszöbű burstök váltják ki a relésejtek visszacsapó burstjeit, hisz azok T-csatornáinak deinaktiválásához hiperpolarizáló bemenetre van szükség. A relésejtek ezt követően masszív visszacsatoló kapcsolataik révén újból serkentik az nRT sejteket a burstölésre, hisz az nRT sejtek eleve hiperpolarizáltabb nyugalmi membránpotenciálon vannak, így serkentéssel kiváltható bennük az alacsony küszöbű burst. Ezzel kialakul egy nRT-relésejt oda-vissza serkentés-gátlás, aminek a kéregbe továbbítódó megjelenési formája az orsó oszcilláció.

Tehát ezek alapján belátható, hogy az nRT-ból érkező megfelelően hiperpolarizáló burst IPSC-re van ahhoz szükség, hogy az nRT indította orsó kialakuljon. Az *in vitro* kísérletekből látszik, hogy a gyors monofázisos IPSC-k eltűnésének ellenére a burst IPSC-k spontán módon, és nRT aktivációra is kialakulnak a $\gamma 2^{-/-}$ VB sejtekben. A burst IPSC-k kinetikája minden tekintetben eltér a kontroll sejtekből mért burst IPSC-k kinetikájától. Annál lassabb felfutásúak, átlagosan kisebb az amplitúdójuk, és lassabban is csengenek le. Mindezek ellenére úgy látszik, hogy mégis elegendő hiperpolarizációt biztosítanak a relésejteknek ahhoz, hogy azok visszacsapó bursttel válaszoljanak a bemenetre (lásd 27. ábra). A relésejtek azonban addig nem tüzelnek, amíg nem regenerálódtak az nRT-tól

származó gátlásból.

Mivel a $\gamma 2^{-/-}$ VB sejtekben a burst IPSC hatására később alakul ki a maximális hiperpolarizáció, és mivel az tovább is tart, ezért a relésejtek a kontroll állapotnál később tudnak csak visszacsapó bursttal válaszolni a hiperpolarizáló ingerre. Ez alapján belátható, hogy az orsók frekvenciáját a relésejt-burstök között eltelt idő, azt pedig a relésejtre érkező nRT-ból származó burst IPSC kinetikája határozza meg (Bal és mtsai., 1995).

A kérgi EEG-n a 7 – 15 Hz-es frekvenciatartományban kimutatható sűrűségváltozások bizonyítottan kapcsolatban állnak az nRT eredetű orsókkal (Cueni és mtsai., 2008). Az orsók enyhe lassulásának a mi modellünkben nincs hatása az EEG-n a NREM/REM átmenet előtt fellépő 7 – 15 Hz-es frekvenciatartományban bekövetkező sűrűségnövekedésére.

6.2.6. A relésejtek ingerelhetősége (feltehetőleg) nő

A GABA_A receptorok tónusos aktivációjának van egy nagyon jelentős tulajdonsága: a sejt input konduktanciájának növelése. Ez befolyással van a sejtre érkező bemenetek által keltett árammozgásokhoz köthető feszültségváltozás nagyságára, időtartamára és a feszültség tovaterjedő lecsengésére. Ezáltal egy adott inger (posztzinaptikus áram) által kiváltott posztzinaptikus potenciál mérete és időtartama lecsökken, a jelintegrációra alkalmas tér- és időablak pedig leszűkül, csökkentve az akciós potenciál kialakulásának esélyét (Farrant, Nusser, 2005). Vagyis aktív tónusos konduktanciák mellett a sejtek ingerelhetősége kisebb, mint a tónusos konduktanciákkal nem rendelkező idegsejtek ingerelhetősége.

Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a tónusos áram a $\gamma 2^{-/-}$ relésejtekben lecsökkent a kontroll sejtekhez képest, illetve hogy nőtt a sejtek input rezisztenciája. Mindez azt jelenteni, hogy a $\gamma 2^{-/-}$ talamikus relésejtek hamarabb válaszolnak akciós potenciállal a rájuk érkező serkentő ingerekre, azaz az ingerlékenységük nagyobb. Mi mégsem tapasztaltunk fokozottabb relésejt-aktivitást. Feltehetőleg ez azzal magyarázható, hogy az egysejt aktivitást altatás alatt néztük, amikor is a relésejtek burst módban, és nem a kábel tulajdonságaiknak megfelelő módon tüzelnek (mint tónusos tüzeléskor, a beérkező bemenetek frekvenciájával lineáris módon növelve a kimenet frekvenciáját). Azonban ez nem zárja ki, hogy éber állatban, amikor is a tónusos üzemmód a meghatározó, a sejtek hamarabb, nagyobb pontossággal reagálnának a bemeneteikre a megnövekedett ingerlékenységük miatt. Ez is alátámasztja az éber elvezetések fontosságát.

6.2.7. A burst IPSC-k eredetének nyomában

Munkánkból kiderült, hogy az nRT sejtek burst tüzelésekor keletkező IPSC-kért kb. fele-fele arányban felelősek a szinaptikus és extraszinaptikus GABA_A receptorok. A szinaptikus receptorok kiütése után is fennmaradt ugyanis egy lassú felfutási és lecsengési idővel jellemezhető áram, ami az extraszinaptikus receptorok bevonására utal. Nemrégiben tőlünk függetlenül is sikerült bizonyítani az extraszinaptikus $\alpha 4$ alegységek szerepét az nRT-talamokortikális szinapszisokban burst tüzelés során (Herd és mtsai., 2013).

Eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy az nRT tónusos tüzelése nem elég ahhoz, hogy a kiürült GABA az extraszinaptikus receptorokat is aktiválja. Ellenben burst tüzelés esetén nem csak a szinaptikus GABA_A receptorok aktivációja történik meg. Ez alapján a burst IPSC-k nem csupán a konvencionális GABA_A receptor közvetítette IPSC-k időbeni lineáris összegződésének az eredményei, mint ahogy azt korábban gondolták (Kim és mtsai., 1997), hanem egy nagy mennyiségű GABA ürülést követő erősen szupralineáris folyamat. Tehát ezek szerint az extraszinaptikus receptorok nem csak a tónusos áram kialakításért felelősek, hanem aktívan részt vesznek a fázisos folyamatokban is.

Az nRT burst tüzelése során nagy mennyiségben kiürülő és felhalmozódó GABA az extraszinaptikus receptorokat is elérve, azokat aktiválja, melyre a repetitív tónusos tüzelés (10 – 50 Hz) nem képes (Wanaverbecq és mtsai., 2008). Mivel az nRT-talamokortikális szinapszis depresszálló, feltehetőleg a neurotranszmitter ürülést specifikusan fokozó mechanizmusok kapcsolhatnak be burst tüzelés esetén. Ennek a bizonyítására azonban még további vizsgálatok szükségesek.

A burst IPSC-k eredetén gondolkozva először is a preszinaptikus oldal vezikulaürülési sajtságait érdemes körüljárni. Mivel az alacsony-küszöbű T-csatornák indukálják a nagy frekvenciájú Na⁺ alapú akciós potenciálok keletkezését az nRT-ban, ezért kézenfekvő, hogy a megnövekedett intracelluláris Ca₂⁺ tranziensnek tulajdonítsunk fontos szerepet a tónusos tüzeléstől eltérő burst IPSC-k keletkezésekor (Neher , Sakaba, 2008). Felmerült, hogy az nRT sejtek alacsony küszöbű burstölése során, akár a megnövekedett intracelluláris Ca₂⁺ tranziens következtében, aszinkron, multivezikuláris neurotranszmitter ürülés történik. Ebben az nRT-ban is jelenlevő CaV3.2 T-típusú Ca₂⁺ csatornák játszhatnak szerepet, mely csatornákról már bebizonyosodott, hogy bizonyos preszinaptikus aktív zónában feldúsulva vezikulaürülést képesek indukálni (Carbone és mtsai., 2006). A

T-csatorna közvetítette vezikulairülést HCN csatornák szabályozhatják, mint ahogy azt az entorhinális kéreg harmadik rétegi piramissejtjeire érkező serkentő terminálisok esetében igazolták (Huang és mtsai., 2011).

6.2.8. Limitációk

A teljes génkiütött modell állatok számos esetben tanúskodtak arról, hogy mennyire plasztikus módon működik az idegrendszer: az egyedfejlődés során kompenzációs mechanizmusok egész tárháza alakult ki arra, hogy az indukált mutációkat valamilyen módon kiküszöbölje. Éppen ezért sok esetben csak a hálózati reorganizációról tudhatunk meg többet KO állatok használatával. Jó példa erre a GABA_A receptor $\alpha 3$ génkiütött egér. Az nRT-ban ugyanis felnőtt állatban az α alegységek közül csak $\alpha 3$ GABA_A alegység mutatható ki (Pirker és mtsai., 2000), így annak kiütésétől méltán várták a kutatók a talamokortikális oszcillációk felborulását, mint ahogy az $\beta 3$ génkiütött állatokban ez be is következik (Huntsman és mtsai., 1999). Az nRT gátló áramok megszűnése és epilepszia kialakulása helyett azonban, intakt alvás-ébrenléti ciklust, normális EEG-t, és mindenekelőtt intakt gátló áramokat mértek az nRT sejtjeiben (Winsky-Sommerer és mtsai., 2008). Hasonló módon nem mutatott jelentősebb viselkedési deficitet az $\alpha 1$ alegységre KO állat sem, habár mind a talamusz, mind a cerebellum területéről nagy számban tűntek el az $\alpha 1$ /gephyrin klaszterek (Kralic és mtsai., 2006). A $\gamma 2$ KO egértörzsben kevésbé hatékony a rendszer újraszerveződése, és az életbevágóan fontos GABA_A receptoralegység kiesésének meg is van a következménye: az állatok nem életképesek (Essrich és mtsai., 1998).

7. KÖVETKEZTETÉSEK

Az első tanulmányban megállapítottuk, hogy a talamusz legfőbb bemenetét jelentő driverok szerveződése igen változatos. Habár az az általánosan elfogadott nézet, hogy a talamusz legfőbb tulajdonsága a perifériás (szenzoros) információ agykéreg felé történő relézése, eredményeinkből az látszik, hogy a főemlős talamusz igen nagy hányadáról hiányoznak az ehhez szükséges szubkortikális driver bemenetek. Ezen felül eredményeinkből az látszik, hogy nem minden talamokortikális reléjezt kizárólagosan driver bemenetek irányítása alatt áll, hanem léteznek olyan régiók, ahol a serkentő és gátló afferensek együttesen határozzák meg a reléjeztek tüzelését. Mivel a reléjeztek által közvetített üzenet a driver terminálisok méretétől és eredetétől függ, és ez eredményeink alapján igen változatos, ezért úgy gondoljuk, hogy a reléjeztek jelfeldolgozása is változatos lesz. Eredményeink keretet adnak a korábbi és jövőbeni talamuszt érintő főemlős kutatásoknak, és mindemellett a talamuszt érintő humán neurológiai kórképek morfológiai leírásának.

A bemutatott második tanulmányban egy eleddig fel-nem-ismert kisülésmód-specifikus gátló mechanizmust tártunk fel egy régóta tanulmányozott szinapszisban. A vizsgált struktúra fő feladata a talamokortikális sejtek szinkronizálása oszcilláció során. Eredményeink összetett szinaptikus elrendeződésre utalnak, ahol finoman hangolt együttműködés figyelhető meg a különböző GABA_A receptorok között preszinaptikus kisülésmódnak megfelelően. A talamik GABA_A receptorok molekuláris összetevőinek megismerése elengedhetetlen ahhoz, hogy az alvás során tapasztalt talamokortikális szinkronizáció mechanizmusát megértsük, mivel köztudottan a GABA_A receptorok jelentik a nyugtató és altató drogok fő célmolekuláját (Winsky-Sommerer, 2009). Eredményeink elegáns bizonyítékkal szolgálnak a GABA_A receptorok specifikus szerepére egyes viselkedési állapotokban, és így egy új, célzott gyógyszerkutatási irányba mutatnak. Az ez alapján kifejlesztett altató egyedülálló módon csak az alvás során tapasztalható talamik gátlást fokozná, míg az ébrenlét során jelentkező fázisos gátlás nem szenvedne kárt, tehát a nem-kívánt mellékhatások száma is jelentősen csökkenne.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

Az agykéreg szerveződésének megértéséhez elengedhetetlen, hogy tisztába legyünk a külvilággal kapcsolatot tartó legfontosabb bemeneti forrásának, a talamusznak a működésével. Sem a talamuszt, sem az agykérget nem érthetjük meg, ha nem intakt egységként tekintünk a két struktúrára.

PhD munkám során a talamusz serkentő drivereit és szinaptikus gátlását tanulmányoztam majomban, illetve egérben, mint modell állatokon. Eredményeim alapján közelebb kerültünk a talamusz működésének megértéséhez.

A főemlősök talamuszát a relésejtekre legnagyobb befolyással bíró irányító serkentő bemenetei alapján részekre osztottam, ezáltal létrehozva egy funkcionális tulajdonságokról is információt adó talamusz térképet. Fény- és elektronmikroszkópos eredményeim alapján kiderült, hogy a talamusz nem osztható fel egyértelműen kortikális és szubkortikális eredetű driver bemeneteket tartalmazó régiókra. Sőt, kiderült, hogy a driver bemenetek mérete is nagy variabilitást mutat a talamikus magok között, ami további heterogenitást biztosít a talamuszban. Az általam végzett kísérletsorozat az irodalomban fellelhető első munka, mely szisztematikusan megerősítette, illetve korrigálta a „driver teória” alapján elsőrendű és magasabbrendű relékből álló talamikus felosztást.

A doktori munkám további részében az egér talamuszában a gátlással foglalkozva munkatársaimmal bebizonyítottuk, hogy altatott (illetve szabadon alvó) állatokban a talamikus gátló szinapszisokban helyet foglaló GABA_A receptorok nem esszenciálisak a normális talamokortikális folyamatokhoz. Immunohisztokémiai kísérletekkel igazoltam a GABA_A receptor $\gamma 2$ alegységének eltűnését a gátló szinapszisokból. *In vitro* kísérleteim során kiderült, hogy a talamusz rendelkezik egy olyan gátló receptor populációval, ami csak fokozott preszinaptikus aktivitás során aktiválódik, ezáltal kifejezetten a retikuláris talamusz felől érkező burst kisüléssorozatok hatékony továbbítására alkalmas. Feltehetőleg szinaptikus gátlás hiányában is ezen receptor populáció járul hozzá a közel normális talamokortikális relésejt-aktivitás, és oszcillációk fennmaradásához.

9. SUMMARY

To understand the organisation of the neocortex it is inevitable to know the thalamus, as it provides the main input source to the cortex conveying relevant information from the periphery. We cannot study either the thalamus or the neocortex in separation, only as an intact organ.

During my PhD I conducted two projects: First, I mapped the excitatory drivers of the primate thalamus and second, I examined the role of $\gamma 2$ subunit of the GABA_A receptors in the GABAergic inhibition in the mouse thalamus. The results that I presented in my thesis enabled us to understand the thalamus even better.

I divided the primate thalamus into functional parts based on the presence, origin and size of its most relevant excitatory driver inputs. I disclosed large heterogeneity in the organization of the major inputs to the thalamus. To date, this is the first project that systematically validated and corrugated the thalamic map based on the driver theory.

In the mouse, we proved that the synaptic GABA_A receptors are not essential for normal thalamocortical rhythms during natural sleep or anaesthesia. We found a GABA_A receptor population that is only activated when the presynaptic neurons fire in burst mode, which means a behavioural state dependent activation of the inhibitory receptors. Presumably without synaptic inhibition the activation of these non-synaptic receptors restores the quasi-normal relay cell activity and thalamocortical oscillation.

10. IRODALOMJEGYZÉK

HIVATKOZÁSOK

- Acuna-Goycolea C, Brenowitz SD, Regehr WG. (2008) Active dendritic conductances dynamically regulate GABA release from thalamic interneurons. *Neuron*, 57(3):420–31.
- Aihara Y, Mashima H, Onda H, Hisano S, Kasuya H, Hori T, Yamada S, Tomura H, Yamada Y, Inoue I, Kojima I, Takeda J. (2000) Molecular cloning of a novel brain-type Na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter. *J Neurochem*, 74(6):2622–5.
- Apkarian aV, Shi T. (1994) Squirrel monkey lateral thalamus. I. Somatic nociceptive neurons and their relation to spinothalamic terminals. *J Neurosci*, 14(11 Pt 2):6779–95.
- Araki T, Kiyama H, Tohyama M. (1992) GABA_A receptor subunit messenger RNAs show differential expression during cortical development in the rat brain. *Neuroscience*, 51(3):583–91.
- Astori S, Wimmer RD, Prosser HM, Corti C, Corsi M, Liaudet N, Volterra A, Franken P, Adelman JP, Lüthi A. (2011) The CaV3.3 calcium channel is the major sleep spindle pacemaker in thalamus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(33):13823–13828.
- Bal T, von Krosigk M, McCormick DA. (1995) Synaptic and membrane mechanisms underlying synchronized oscillations in the ferret lateral geniculate nucleus in vitro. *J Physiol*, 483:641–63.
- Balercia G, Kultas-Ilinsky K, Bentivoglio M, Ilinsky Ia. (1996) Neuronal and synaptic organization of the centromedian nucleus of the monkey thalamus: a quantitative ultrastructural study, with tract tracing and immunohistochemical observations. *J Neurocytol*, 25(4):267–88.
- Bartho P, Freund TF, Acsady L. (2002) Selective GABAergic innervation of thalamic nuclei from zona incerta. *Eur J Neurosci*, 16(6):999–1014.
- Barthó P, Payne Ja, Freund TF, Acsády L. (2004) Differential distribution of the KCl cotransporter KCC2 in thalamic relay and reticular nuclei. *Eur J Neurosci*, 20(4):965–75.

- Bellocchio E, Hu H, Pohorille A, Chan J, Pickel V, Edwards R. (1998) The localization of the brain-specific inorganic phosphate transporter suggests a specific presynaptic role in glutamatergic transmission *J Neurosci*, 18(21):8648–8659.
- Berod A, Hartman BK, Pujol JF. (1981) Importance of fixation in immunohistochemistry: use of formaldehyde solutions at variable pH for the localization of tyrosine hydroxylase. *J Histochem Cytochem*, 29(7):844–50.
- Best AR, Regehr WG. (2009) Inhibitory regulation of electrically coupled neurons in the inferior olive is mediated by asynchronous release of GABA. *Neuron*, 62(4):555–65.
- Bettler B, Tiao JYH. (2006) Molecular diversity, trafficking and subcellular localization of GABAB receptors. *Pharmacol Ther*, 110(3):533–43.
- Blasco B, Avendaño C, Cavada C. (1999) A stereological analysis of the lateral geniculate nucleus in adult *Macaca nemestrina* monkeys. *Vis Neurosci*, 16(5):933–41.
- Bodor AL, Giber K, Rovó Z, Ulbert I, Acsády L. (2008) Structural correlates of efficient GABAergic transmission in the basal ganglia-thalamus pathway. *J Neurosci*, 28(12):3090–102.
- Boivie J. (1979) An anatomical reinvestigation of the termination of the spinothalamic tract in the monkey. *J Comp Neurol*, 186(3):343–69.
- Bokor H, Frère SGa, Eyre MD, Slézia A, Ulbert I, Lüthi A, Acsády L. (2005) Selective GABAergic control of higher-order thalamic relays. *Neuron*, 45(6):929–40.
- Bormann J, Feigenspan A. (1995) GABAC receptors. *Trends Neurosci*, 18(12):515–9.
- Borst JGG. (2010) The low synaptic release probability in vivo. *Trends Neurosci*, 33(6):259–66.
- Bosch-Bouju C, Hyland BI, Parr-Brownlie LC. (2013) Motor thalamus integration of cortical, cerebellar and basal ganglia information: implications for normal and parkinsonian conditions. *Front Comput Neurosci*, 7:163.
- Bourassa J, Deschênes M. (1995) Corticothalamic projections from the primary visual cortex in rats: a single fiber study using biocytin as an anterograde tracer. *Neuroscience*, 66(2):253–63.

- Bourassa J, Pinault D , Deschênes M. (1995) Corticothalamic projections from the cortical barrel field to the somatosensory thalamus in rats: a single-fibre study using biocytin as an anterograde tracer. *Eur J Neurosci*, 7(1):19–30.
- Brickley SG , Mody I. (2012) Extrasynaptic GABA(A) receptors: their function in the CNS and implications for disease. *Neuron*, 73(1):23–34.
- Brünig I, Suter A, Knuesel I, Lüscher B , Fritschy JM. (2002) GABAergic terminals are required for postsynaptic clustering of dystrophin but not of GABA(A) receptors and gephyrin. *J Neurosci*, 22(12):4805–13.
- Budisantoso T, Matsui K, Kamasawa N, Fukazawa Y , Shigemoto R. (2012) Mechanisms underlying signal filtering at a multisynapse contact. *J Neurosci*, 32(7):2357–76.
- Cappe C, Morel a , Rouiller EM. (2007) Thalamocortical and the dual pattern of corticothalamic projections of the posterior parietal cortex in macaque monkeys. *Neuroscience*, 146(3):1371–87.
- Carbone E, Giannini a, Marcantoni a, Guido D , Carabelli V. (2006) A new role for T-type channels in fast "low-threshold" exocytosis. *Cell Calcium*, 40(2):147–54.
- Castaigne P, Lhermitte F, Buge A, Escourolle R, Hauw JJ , Lyon-Caen O. (1981) Paramedian thalamic and midbrain infarct: clinical and neuropathological study. *Ann Neurol*, 10(2):127–48.
- Castro-Alamancos MA , Calcagnotto ME. (2001) High-pass filtering of corticothalamic activity by neuromodulators released in the thalamus during arousal: in vitro and in vivo. *J Neurophysiol*, 85(4):1489–97.
- Cathala L, Holderith NB, Nusser Z, DiGregorio DA , Cull-Candy SG. (2005) Changes in synaptic structure underlie the developmental speeding of AMPA receptor-mediated EPSCs. *Nat Neurosci*, 8(10):1310–8.
- Chang Y, Wang R, Barot S , Weiss DS. (1996) Stoichiometry of a recombinant GABAA receptor. *J Neurosci*, 16(17):5415–24.
- Chebib M , Johnston G. (2000) GABA-activated ligand gated ion channels: medicinal chemistry and molecular biology *J Med Chem*, 43(8):1427–47.

- Chen C, Blitz DM , Regehr WG. (2002) Contributions of receptor desensitization and saturation to plasticity at the retinogeniculate synapse. *Neuron*, 33(5):779–88.
- Chen L, Wang H, Vicini S , Olsen RW. (2000) The gamma-aminobutyric acid type A (GABA) receptor-associated protein (GABARAP) promotes GABA receptor clustering and modulates the channel kinetics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(21):11557–62.
- 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.
- Colonnier M , Guillery RW. (1964) Synaptic organization in the lateral geniculate nucleus of the monkey *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 62:333–55.
- Cope DW, Hughes SW , Crunelli V. (2005) GABA receptor-mediated tonic inhibition in thalamic neurons. *J Neurosci*, 25(50):11553–63.
- Couve A, Moss SJ , Pangalos MN. (2000) GABAB receptors: a new paradigm in G protein signaling. *Mol Cell Neurosci*, 16(4):296–312.
- Cox CL, Huguenard JR , Prince DA. (1996) Heterogeneous axonal arborizations of rat thalamic reticular neurons in the ventrobasal nucleus. *J Comp Neurol*, 366(3):416–30.
- Craig AM, Blackstone CD, Haganir RL , Banker G. (1994) Selective clustering of glutamate and gamma-aminobutyric acid receptors opposite terminals releasing the corresponding neurotransmitters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(26):12373–7.
- Crandall SR, Govindaiah G , Cox CL. (2010) Low-threshold Ca²⁺ current amplifies distal dendritic signaling in thalamic reticular neurons. *J Neurosci*, 30(46):15419–29.
- Crestani F, Keist R, Fritschy JM, Benke D, Vogt K, Prut L, Blüthmann H, Möhler H , Rudolph U. (2002) Trace fear conditioning involves hippocampal alpha5 GABA(A) receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(13):8980–5.
- Crick F. (1984) Function of the thalamic reticular complex: the searchlight hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(14):4586–90.
- Crowley JJ, Fioravante D , Regehr WG. (2009) Dynamics of fast and slow inhibition from

- cerebellar Golgi cells allow flexible control of synaptic integration. *Neuron*, 63(6):843–53.
- Crunelli V, Cope DW , Terry JR. (2011) Transition to absence seizures and the role of GABA(A) receptors. *Epilepsy Res*, 97(3):283–9.
- Cueni L, Canepari M, Luján R, Emmenegger Y, Watanabe M, Bond CT, Franken P, Adelman JP , Lüthi A. (2008) T-type Ca²⁺ channels, SK2 channels and SERCAs gate sleep-related oscillations in thalamic dendrites. *Nat Neurosci*, 11(6):683–92.
- Dani A, Huang B, Bergan J, Dulac C , Zhuang X. (2010) Neurotechnique Superresolution Imaging of Chemical Synapses in the Brain *Neuron*, 68(5):843–856.
- Darian-Smith C, Tan a , Edwards S. (1999) Comparing thalamocortical and corticothalamic microstructure and spatial reciprocity in the macaque ventral posterolateral nucleus (VPLc) and medial pulvinar. *J Comp Neurol*, 410(2):211–34.
- Deleuze C , Huguenard JR. (2006) Distinct electrical and chemical connectivity maps in the thalamic reticular nucleus: potential roles in synchronization and sensation. *J Neurosci*, 26(33):8633–45.
- Deschênes M, Bourassa J , Pinault D. (1994) Corticothalamic projections from layer V cells in rat are collaterals of long-range corticofugal axons. *Brain Res*, 664(1-2):215–9.
- Deschênes M, Madariaga-Domich A , Steriade M. (1985) Dendrodendritic synapses in the cat reticularis thalami nucleus: a structural basis for thalamic spindle synchronization. *Brain Res*, 334(1):165–8.
- Deschênes M, Timofeeva E , Lavallée P. (2003) The relay of high-frequency sensory signals in the whisker-to-barreloid pathway *J Neurosci*, 23(17):6778–6787.
- Dhande OS, Hua EW, Guh E, Yeh J, Bhatt S, Zhang Y, Ruthazer ES, Feller MB , Crair MC. (2011) Development of single retinofugal axon arbors in normal and $\beta 2$ knock-out mice. *J Neurosci*, 31(9):3384–99.
- Dunning DD, Hoover CL, Soltesz I, Smith MA , O’Dowd DK. (1999) GABA(A) receptor-mediated miniature postsynaptic currents and alpha-subunit expression in developing cortical neurons. *J Neurophysiol*, 82(6):3286–97.

- Erzurumlu RS, Murakami Y , Rijli FM. (2010) Mapping the face in the somatosensory brainstem. *Nat Rev Neurosci*, 11(4):252–63.
- Essrich C, Lorez M, Benson Ja, Fritschy JM , Lüscher B. (1998) Postsynaptic clustering of major GABAA receptor subtypes requires the gamma 2 subunit and gephyrin. *Nat Neurosci*, 1(7):563–71.
- Farrant M , Nusser Z. (2005) Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat Rev Neurosci*, 6(3):215–29.
- Farrar SJ, Whiting PJ, Bonnert TP , McKernan RM. (1999) Stoichiometry of a ligand-gated ion channel determined by fluorescence energy transfer. *J Biol Chem*, 274(15):10100–4.
- Fischer F, Kneussel M, Tintrup H, Haverkamp S, Rauen T, Betz H , Wässle H. (2000) Reduced synaptic clustering of GABA and glycine receptors in the retina of the gephyrin null mutant mouse. *J Comp Neurol*, 427(4):634–48.
- Franken P, Malafosse A , Tafti M. (1998) Genetic variation in EEG activity during sleep in inbred mice. *Am J Physiol*, 275(4 Pt 2):R1127–37.
- Fritschy JM , Mohler H. (1995) GABAA-receptor heterogeneity in the adult rat brain: differential regional and cellular distribution of seven major subunits. *J Comp Neurol*, 359(1):154–94.
- García-Cabezas MA, Martínez-Sánchez P, Sánchez-González MA, Garzón M , Cavada C. (2009) Dopamine innervation in the thalamus: monkey versus rat. *Cereb Cortex*, 19(2):424–34.
- Gras C , Herzog E. (2002) A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons *J Neurosci*, 22(13):5442–5451.
- Graziano A, Liu XB, Murray KD , Jones EG. (2008) Vesicular glutamate transporters define two sets of glutamatergic afferents to the somatosensory thalamus and two thalamocortical projections in the mouse. *J Comp Neurol*, 507(2):1258–76.
- Grenningloh G, Rienitz A, Schmitt B, Methfessel C, Zensen M, Beyreuther K, Gundelfin-

- ger ED , Betz H. (1987) The strychnine-binding subunit of the glycine receptor shows homology with nicotinic acetylcholine receptors. *Nature*, 328(6127):215–20.
- Groh A, Bokor H, Mease RA, Plattner VM, Hangya B, Stroh A, Deschenes M , Acsády L. (2013) Convergence of Cortical and Sensory Driver Inputs on Single Thalamocortical Cells. *Cereb Cortex*.
- Groh A, de Kock CPJ, Wimmer VC, Sakmann B , Kuner T. (2008) Driver or coincidence detector: modal switch of a corticothalamic giant synapse controlled by spontaneous activity and short-term depression. *J Neurosci*, 28(39):9652–63.
- Guido W , Weyand T. (1995) Burst responses in thalamic relay cells of the awake behaving cat *J Neurophysiol*, 74(4):1782–86.
- Guillery RW, Feig SL , Lozsádi DA. (1998) Paying attention to the thalamic reticular nucleus. *Trends Neurosci*, 21(1):28–32.
- Hámori J, Szentágothai J. (1966) Participation of Golgi neuron processes in the cerebellar glomeruli: an electron microscope study. *Exp Brain Res*, 2(1):35–48.
- Harris RM , Hendrickson AE. (1987) Local circuit neurons in the rat ventrobasal thalamus—a GABA immunocytochemical study. *Neuroscience*, 21(1):229–36.
- Harting JK, Huerta MF, Frankfurter AJ, Strominger NL , Royce GJ. (1980) Ascending pathways from the monkey superior colliculus: an autoradiographic analysis. *J Comp Neurol*, 192(4):853–82.
- Hefft S , Jonas P. (2005) Asynchronous GABA release generates long-lasting inhibition at a hippocampal interneuron-principal neuron synapse. *Nat Neurosci*, 8(10):1319–28.
- Herd MB, Brown AR, Lambert JJ , Belelli D. (2013) Extrasynaptic GABA(A) receptors couple presynaptic activity to postsynaptic inhibition in the somatosensory thalamus. *J Neurosci*, 33(37):14850–68.
- Herzog E, Bellenchi GC, Gras C, Bernard V, Ravassard P, Bedet C, Gasnier B, Giros B , El Mestikawy S. (2001) The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. *J Neurosci*, 21(22):RC181.

- 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.
- Hollrigel GS , Soltesz I. (1997) Slow kinetics of miniature IPSCs during early postnatal development in granule cells of the dentate gyrus. *J Neurosci*, 17(13):5119–28.
- Hoogland PV, Wouterlood FG, Welker E , Van der Loos H. (1991) Ultrastructure of giant and small thalamic terminals of cortical origin: a study of the projections from the barrel cortex in mice using Phaseolus vulgaris leuco-agglutinin (PHA-L). *Exp Brain Res*, 87(1):159–72.
- Huang Z, Lujan R, Kadurin I, Uebele VN, Renger JJ, Dolphin AC , Shah MM. (2011) Presynaptic HCN1 channels regulate Cav3.2 activity and neurotransmission at select cortical synapses. *Nat Neurosci*, 14(4):478–86.
- Huguenard JR , Prince DA. (1994)a Clonazepam suppresses GABAB-mediated inhibition in thalamic relay neurons through effects in nucleus reticularis. *J Neurophysiol*, 71(6):2576–81.
- Huguenard JR , Prince DA. (1994)b Intrathalamic rhythmicity studied in vitro: nominal T-current modulation causes robust antioscillatory effects. *J Neurosci*, 14(9):5485–502.
- Huntsman MM, Porcello DM, Homanics GE, Delorey TM , Huguenard JR. (1999) Reciprocal Inhibitory Connections and Network Synchrony in the Mammalian Thalamus *Science (80-)*, 283(January):541–43.
- Ilinsky Ia, Jouandet ML , Goldman-Rakic PS. (1985) Organization of the nigrothalamo-cortical system in the rhesus monkey. *J Comp Neurol*, 236(3):315–30.
- Ilinsky Ia, Yi H , Kultas-Ilinsky K. (1997) Mode of termination of pallidal afferents to the thalamus: a light and electron microscopic study with anterograde tracers and immunocytochemistry in Macaca mulatta. *J Comp Neurol*, 386(4):601–12.
- Jacob TC, Moss SJ , Jurd R. (2008) GABA(A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nat Rev Neurosci*, 9(5):331–43.

- Jia F, Pignataro L, Schofield CM, Yue M, Harrison NL, Goldstein Pa. (2005) An extrasynaptic GABAA receptor mediates tonic inhibition in thalamic VB neurons. *J Neurophysiol*, 94(6):4491–501.
- Jones EG. (1975) Some aspects of the organization of the thalamic reticular complex. *J Comp Neurol*, 162(3):285–308.
- Jones EG. (1998) Commentary viewpoint : the core and matrix of thalamic organization *Neuroscience*, 85(2):331–345.
- Jones EG. (2002) Thalamic circuitry and thalamocortical synchrony. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 357(1428):1659–73.
- Jones EG. Individual thalamic nuclei *The Thalamus*, fejezet Part IV. Cambridge University Press, Cambridge (2007).
- Jones EG, Powell TP. (1969) An electron microscopic study of the mode of termination of cortico-thalamic fibres within the sensory relay nuclei of the thalamus. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 172(27):173–85.
- Julius D. (1991) Molecular biology of serotonin receptors. *Annu Rev Neurosci*, 14:335–60.
- Kim U, Sanchez-Vives MV, McCormick DA. (1997) Functional dynamics of GABAergic inhibition in the thalamus. *Science*, 278(5335):130–4.
- Kralic JE, Sidler C, Parpan F, Homanics GE, Morrow aL, Fritschy JM. (2006) Compensatory alteration of inhibitory synaptic circuits in cerebellum and thalamus of gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha1 subunit knockout mice. *J Comp Neurol*, 495(4):408–21.
- Krosigk MV, Bal T, McCormick D. (1993) Cellular mechanisms of a synchronized oscillation in the thalamus *Science (80-)*, 261:361–4.
- Krout KE, Belzer RE, Loewy AD. (2002) Brainstem projections to midline and intralaminar thalamic nuclei of the rat. *J Comp Neurol*, 448(1):53–101.
- Kultas-Ilinsky K, Ilinsky Ia. (1990) Fine structure of the magnocellular subdivision of the

- ventral anterior thalamic nucleus (VAmc) of *Macaca mulatta*: II. Organization of nigrothalamic afferents as revealed with EM autoradiography. *J Comp Neurol*, 294(3):479–89.
- Kultas-Ilinsky K, Reising L, Yi H , Ilinsky Ia. (1997) Pallidal afferent territory of the *Macaca mulatta* thalamus: neuronal and synaptic organization of the VAdc. *J Comp Neurol*, 386(4):573–600.
- Landisman CE , Connors BW. (2005) Long-term modulation of electrical synapses in the mammalian thalamus. *Science*, 310(5755):1809–13.
- Landisman CE, Long MA, Beierlein M, Deans MR, Paul DL , Connors BW. (2002) Electrical synapses in the thalamic reticular nucleus. *J Neurosci*, 22(3):1002–9.
- Laureys S, Faymonville ME, Luxen A, Lamy M, Franck G , Maquet P. (2000) Restoration of thalamocortical connectivity after recovery from persistent vegetative state. *Lancet*, 355(9217):1790–1.
- Laurie DJ, Wisden W , Seeburg PH. (1992) The distribution of thirteen GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. III. Embryonic and postnatal development. *J Neurosci*, 12(11):4151–72.
- Lavallée P, Urbain N, Dufresne C, Bokor H, Acsády L , Deschênes M. (2005) Feed-forward inhibitory control of sensory information in higher-order thalamic nuclei. *J Neurosci*, 25(33):7489–98.
- Lisman JE. (1997) Bursts as a unit of neural information: making unreliable synapses reliable. *Trends Neurosci*, 20(1):38–43.
- Liu XB , Jones EG. (1999) Predominance of corticothalamic synaptic inputs to thalamic reticular nucleus neurons in the rat. *J Comp Neurol*, 414(1):67–79.
- Lu T , Trussell LO. (2000) Inhibitory transmission mediated by asynchronous transmitter release. *Neuron*, 26(3):683–94.
- Lüscher C , Huber KM. (2010) Group 1 mGluR-dependent synaptic long-term depression: mechanisms and implications for circuitry and disease. *Neuron*, 65(4):445–59.

- Maricq AV, Peterson AS, Brake AJ, Myers RM, Julius D. (1991) Primary structure and functional expression of the 5HT₃ receptor, a serotonin-gated ion channel. *Science*, 254(5030):432–7.
- Masterson SP, Li J, Bickford ME. (2009) Synaptic organization of the tectorecipient zone of the rat lateral posterior nucleus. *J Comp Neurol*, 515(6):647–63.
- Mańko M, Bienvenu TCM, Dalezios Y, Capogna M. (2012) Neurogliaform cells of amygdala: a source of slow phasic inhibition in the basolateral complex. *J Physiol*, 590(Pt 22):5611–27.
- Mody I, Pearce R. (2004) Diversity of inhibitory neurotransmission through GABA_A receptors *Trends Neurosci*.
- Molinari M, Dell’Anna ME, Rausell E, Leggio MG, Hashikawa T, Jones EG. (1995) Auditory thalamocortical pathways defined in monkeys by calcium-binding protein immunoreactivity. *J Comp Neurol*, 362(2):171–94.
- Neher E, Sakaba T. (2008) Multiple roles of calcium ions in the regulation of neurotransmitter release. *Neuron*, 59(6):861–72.
- Ni B, Rosteck PR, Nadi NS, Paul SM. (1994) Cloning and expression of a cDNA encoding a brain-specific Na⁺-dependent inorganic phosphate cotransporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(12):5607–11.
- Nusser Z, Roberts JD, Baude A, Richards JG, Sieghart W, Somogyi P. (1995)a Immunocytochemical localization of the alpha 1 and beta 2/3 subunits of the GABA_A receptor in relation to specific GABAergic synapses in the dentate gyrus. *Eur J Neurosci*, 7(4):630–46.
- Nusser Z, Roberts JD, Baude A, Richards JG, Somogyi P. (1995)b Relative densities of synaptic and extrasynaptic GABA_A receptors on cerebellar granule cells as determined by a quantitative immunogold method. *J Neurosci*, 15(4):2948–60.
- Nusser Z, Sieghart W, Somogyi P. (1998) Segregation of Different GABA_A Receptors to Synaptic and Extrasynaptic Membranes of Cerebellar Granule Cells *J Neurosci*, 18(5):1693–1703.

- Oláh S, Füle M, Komlósi G, Varga C, Báldi R, Barzó P, Tamás G. (2009) Regulation of cortical microcircuits by unitary GABA-mediated volume transmission. *Nature*, 461(7268):1278–81.
- Paxinos G, Huang X, Toga A. *The rhesus monkey brain in stereotaxic coordinates* Academic, San Diego (2000).
- Peden DR, Petitjean CM, Herd MB, Durakoglugil MS, Rosahl TW, Wafford K, Homans GE, Belelli D, Fritschy JM, Lambert JJ. (2008) Developmental maturation of synaptic and extrasynaptic GABA receptors in mouse thalamic ventrobasal neurones. *J Physiol*, 586(4):965–87.
- Percheron G, François C, Talbi B, Yelnik J, Fénelon G. (1996) The primate motor thalamus. *Brain Res Brain Res Rev*, 22(2):93–181.
- Person AL, Perkel DJ. (2005) Unitary IPSPs drive precise thalamic spiking in a circuit required for learning. *Neuron*, 46(1):129–40.
- Peruzzi D, Bartlett E, Smith PH, Oliver DL. (1997) A monosynaptic GABAergic input from the inferior colliculus to the medial geniculate body in rat. *J Neurosci*, 17(10):3766–77.
- Pinault D. (1996) A novel single-cell staining procedure performed in vivo under electrophysiological control: morpho-functional features of juxtacellularly labeled thalamic cells and other central neurons with biocytin or Neurobiotin. *J Neurosci Methods*, 65(2):113–36.
- Pinault D. (2004) The thalamic reticular nucleus: structure, function and concept. *Brain Res Brain Res Rev*, 46(1):1–31.
- Pinault D, Deschênes M. (1998) Projection and innervation patterns of individual thalamic reticular axons in the thalamus of the adult rat: a three-dimensional, graphic, and morphometric analysis. *J Comp Neurol*, 391(2):180–203.
- Pinault D, Smith Y, Deschênes M. (1997) Dendrodendritic and axoaxonic synapses in the thalamic reticular nucleus of the adult rat. *J Neurosci*, 17(9):3215–33.

- Pirker S, Schwarzer C, Wieselthaler a, Sieghart W , Sperk G. (2000) GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience*, 101(4):815–50.
- Prenosil GA, Schneider Gasser EM, Rudolph U, Keist R, Fritschy JM , Vogt KE. (2006) Specific subtypes of GABAA receptors mediate phasic and tonic forms of inhibition in hippocampal pyramidal neurons. *J Neurophysiol*, 96(2):846–57.
- Price DD. (2000) Psychological and neural mechanisms of the affective dimension of pain. *Science*, 288(5472):1769–72.
- Purushothaman G, Marion R, Li K , Casagrande Va. (2012) Gating and control of primary visual cortex by pulvinar. *Nat Neurosci*, 15(6):905–12.
- Ralston HJ , Herman MM. (1969) The fine structure of neurons and synapses in ventro-basal thalamus of the cat. *Brain Res*, 14(1):77–97.
- Rausell E, Bae CS, Viñuela a, Huntley GW , Jones EG. (1992) Calbindin and parvalbumin cells in monkey VPL thalamic nucleus: distribution, laminar cortical projections, and relations to spinothalamic terminations. *J Neurosci*, 12(10):4088–111.
- Reichova I , Sherman SM. (2004) Somatosensory corticothalamic projections: distinguishing drivers from modulators. *J Neurophysiol*, 92(4):2185–97.
- Richardson BD, Ling LL, Uteshev VV , Caspary DM. (2011) Extrasynaptic GABA(A) receptors and tonic inhibition in rat auditory thalamus. *PLoS One*, 6(1):e16508.
- Rossi DJ , Hamann M. (1998) Spillover-mediated transmission at inhibitory synapses promoted by high affinity alpha6 subunit GABA(A) receptors and glomerular geometry. *Neuron*, 20(4):783–95.
- Rouiller EM, Liang F, Babalian A, Moret V , Wiesendanger M. (1994) Cerebellothalamocortical and pallidothalamocortical projections to the primary and supplementary motor cortical areas: a multiple tracing study in macaque monkeys. *J Comp Neurol*, 345(2):185–213.
- Rouiller EM , Welker E. (2000) A comparative analysis of the morphology of corticothalamic projections in mammals. *Brain Res Bull*, 53(6):727–41.

- Rudolph U , Möhler H. (2004) Analysis of GABAA receptor function and dissection of the pharmacology of benzodiazepines and general anesthetics through mouse genetics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 44:475–98.
- Sanchez-Vives MV, Bal T , McCormick DA. (1997) Inhibitory interactions between perigeniculate GABAergic neurons. *J Neurosci*, 17(22):8894–908.
- Sanchez-Vives MV , McCormick DA. (1997) Functional properties of perigeniculate inhibition of dorsal lateral geniculate nucleus thalamocortical neurons in vitro. *J Neurosci*, 17(22):8880–93.
- Schiff ND, Giacino JT, Kalmar K, Victor JD, Baker K, Gerber M, Fritz B, Eisenberg B, Biondi T, O'Connor J, Kobylarz EJ, Farris S, Machado A, McCagg C, Plum F, Fins JJ , Rezai AR. (2007) Behavioural improvements with thalamic stimulation after severe traumatic brain injury. *Nature*, 448(7153):600–3.
- Schnell SA, Staines WA , Wessendorf MW. (1999) Reduction of lipofuscin-like autofluorescence in fluorescently labeled tissue. *J Histochem Cytochem*, 47(6):719–30.
- Schofield CM , Huguenard JR. (2007) GABA affinity shapes IPSCs in thalamic nuclei. *J Neurosci*, 27(30):7954–62.
- Schofield PR, Darlison MG, Fujita N, Burt DR, Stephenson FA, Rodriguez H, Rhee LM, Ramachandran J, Reale V , Glencorse TA. (1987) Sequence and functional expression of the GABA A receptor shows a ligand-gated receptor super-family. *Nature*, 328(6127):221–7.
- 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.
- Sherman S. (2001)a Tonic and burst firing: dual modes of thalamocortical relay *Trends Neurosci*.
- Sherman S , Guillery R. *Exploring the thalamus and its role in cortical function* MIT Press, Cambridge (2006).

- Sherman SM. (2001)b Tonic and burst firing: dual modes of thalamocortical relay. *Trends Neurosci*, 24(2):122–6.
- 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.
- Sieghart W, Fuchs K, Tretter V, Ebert V, Jechlinger M, Höger H , Adamiker D. (1999) Structure and subunit composition of GABA(A) receptors. *Neurochem Int*, 34(5):379–85.
- Sieghart W , Sperk G. (2002) Subunit composition, distribution and function of GABA-A receptor subtypes *Curr Top Med Chem*, 2:795–816.
- Simon J, Wakimoto H, Fujita N, Lalande M , Barnard Ea. (2004) Analysis of the set of GABA(A) receptor genes in the human genome. *J Biol Chem*, 279(40):41422–35.
- Sincich LC, Adams DL, Economides JR , Horton JC. (2007) Transmission of spike trains at the retinogeniculate synapse. *J Neurosci*, 27(10):2683–92.
- Slézia A, Hangya B, Ulbert I , Acsády L. (2011) Phase advancement and nucleus-specific timing of thalamocortical activity during slow cortical oscillation. *J Neurosci*, 31(2):607–17.
- Sohal VS , Huguenard JR. (2003) Inhibitory interconnections control burst pattern and emergent network synchrony in reticular thalamus. *J Neurosci*, 23(26):8978–88.
- Somogyi P, Fritschy JM, Benke D, Roberts JD , Sieghart W. (1996) The gamma 2 subunit of the GABAA receptor is concentrated in synaptic junctions containing the alpha 1 and beta 2/3 subunits in hippocampus, cerebellum and globus pallidus. *Neuropharmacology*, 35(9-10):1425–44.
- Spear PD, Kim CB, Ahmad A , Tom BW. (1996) Relationship between numbers of retinal ganglion cells and lateral geniculate neurons in the rhesus monkey. *Vis Neurosci*, 13(1):199–203.
- Steriade M, Domich L , Oakson G. (1986) Reticularis thalami neurons revisited: activity changes during shifts in states of vigilance. *J Neurosci*, 6(1):68–81.

- Steriade M , Llinás RR. (1988) The functional states of the thalamus and the associated neuronal interplay. *Physiol Rev*, 68(3):649–742.
- Steriade M, Nuñez A , Amzica F. (1993)a A novel slow (< 1 Hz) oscillation of neocortical neurons in vivo: depolarizing and hyperpolarizing components. *J Neurosci*, 13(8):3252–65.
- Steriade M, Nuñez A , Amzica F. (1993)b Intracellular analysis of relations between the slow (< 1 Hz) neocortical oscillation and other sleep rhythms of the electroencephalogram. *J Neurosci*, 13(8):3266–83.
- Sun YG, Wu CS, Renger JJ, Uebele VN, Lu HC , Beierlein M. (2012) GABAergic synaptic transmission triggers action potentials in thalamic reticular nucleus neurons. *J Neurosci*, 32(23):7782–90.
- Szabadics J, Tamás G , Soltesz I. (2007) Different transmitter transients underlie presynaptic cell type specificity of GABA_A , slow and GABA_A , fast *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(37):14831–36.
- Taktakishvili O, Sivan-Loukianova E, Kultas-Ilinsky K , Ilinsky Ia. (2002) Posterior parietal cortex projections to the ventral lateral and some association thalamic nuclei in *Macaca mulatta*. *Brain Res Bull*, 59(2):135–50.
- Tarusawa E, Matsui K, Budisantoso T, Molnár E, Watanabe M, Matsui M, Fukazawa Y , Shigemoto R. (2009) Input-specific intrasynaptic arrangements of ionotropic glutamate receptors and their impact on postsynaptic responses. *J Neurosci*, 29(41):12896–908.
- Theyel BB, Llano DA , Sherman SM. (2010) The corticothalamocortical circuit drives higher-order cortex in the mouse. *Nat Neurosci*, 13(1):84–8.
- Timofeev I , Steriade M. (1996) Low-frequency rhythms in the thalamus of intact-cortex and decorticated cats. *J Neurophysiol*, 76(6):4152–68.
- Tretter V, Ehya N, Fuchs K , Sieghart W. (1997) Stoichiometry and assembly of a recombinant GABA_A receptor subtype. *J Neurosci*, 17(8):2728–37.
- Tscherter a, David F, Ivanova T, Deleuze C, Renger JJ, Uebele VN, Shin HS, Bal T,

- Leresche N , Lambert RC. (2011) Minimal alterations in T-type calcium channel gating markedly modify physiological firing dynamics. *J Physiol*, 589(7):1707–24.
- Turner JP , Salt TE. (1998) Characterization of sensory and corticothalamic excitatory inputs to rat thalamocortical neurones in vitro. *J Physiol*, 510 (Pt 3:829–43.
- Van Horn SC , Sherman SM. (2007) Fewer driver synapses in higher order than in first order thalamic relays. *Neuroscience*, 146(1):463–70.
- Vicq d’Azyr F. *Traite d’anatomie et de physiologie* Paris, didot kiadás (1786).
- Wanaverbecq N, Bodor AL, Bokor H, Slézia A, Lüthi A , Acsády L. (2008) Contrasting the functional properties of GABAergic axon terminals with single and multiple synapses in the thalamus. *J Neurosci*, 28(46):11848–61.
- Wei W, Zhang N, Peng Z, Houser CR , Mody I. (2003) Perisynaptic localization of delta subunit-containing GABA(A) receptors and their activation by GABA spillover in the mouse dentate gyrus. *J Neurosci*, 23(33):10650–61.
- Westlund KN, Zhang D, Carlton SM, Sorkin LS , Willis WD. (1991) Noradrenergic innervation of somatosensory thalamus and spinal cord. *Prog Brain Res*, 88:77–88.
- Whiting PJ, Bonnert TP, McKernan RM, Farrar S, Le Bourdellès B, Heavens RP, Smith DW, Hewson L, Rigby MR, Sirinathsinghji DJ, Thompson SA , Wafford KA. (1999) Molecular and functional diversity of the expanding GABA-A receptor gene family. *Ann N Y Acad Sci*, 868:645–53.
- Wilson JR. (1989) Synaptic organization of individual neurons in the macaque lateral geniculate nucleus. *J Neurosci*, 9(8):2931–53.
- Wimmer RD, Astori S, Bond CT, Rovó Z, Chatton JY, Adelman JP, Franken P , Lüthi A. (2012) Sustaining sleep spindles through enhanced SK2-channel activity consolidates sleep and elevates arousal threshold. *J Neurosci*, 32(40):13917–28.
- Winsky-Sommerer R. (2009) Role of GABAA receptors in the physiology and pharmacology of sleep. *Eur J Neurosci*, 29(9):1779–94.
- Winsky-Sommerer R, Knapman A, Fedele DE, Schofield CM, Vyazovskiy VV, Rudolph U, Huguenard JR, Fritschy JM , Tobler I. (2008) Normal sleep homeostasis and lack of

- epilepsy phenotype in GABA A receptor alpha3 subunit-knockout mice. *Neuroscience*, 154(2):595–605.
- Wulff P, Goetz T, Leppä E, Linden AM, Renzi M, Swinny JD, Vekovischeva OY, Sieghart W, Somogyi P, Korpi ER, Farrant M, Wisden W. (2007) From synapse to behavior: rapid modulation of defined neuronal types with engineered GABAA receptors. *Nat Neurosci*, 10(7):923–9.
- Xu W, Morishita W, Buckmaster PS, Pang ZP, Malenka RC, Südhof TC. (2012) Distinct neuronal coding schemes in memory revealed by selective erasure of fast synchronous synaptic transmission. *Neuron*, 73(5):990–1001.
- Yamamoto T, Katayama Y, Kobayashi K, Oshima H, Fukaya C, Tsubokawa T. (2010) Deep brain stimulation for the treatment of vegetative state. *Eur J Neurosci*, 32(7):1145–51.
- Zarnowska ED, Keist R, Rudolph U, Pearce RA. (2009) GABAA receptor alpha5 subunits contribute to GABAA, slow synaptic inhibition in mouse hippocampus. *J Neurophysiol*, 101(3):1179–91.
- Zhang SJ, Huguenard JR, Prince DA. (1997) GABAA receptor-mediated Cl⁻ currents in rat thalamic reticular and relay neurons. *J Neurophysiol*, 78(5):2280–6.
- Zikopoulos B, Barbas H. (2007) Parallel driving and modulatory pathways link the prefrontal cortex and thalamus. *PLoS One*, 2(9):e848.

11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK

A doktori disszertáció alapját képező publikációk

1. **Rovó Z**, Ulbert I, Acsády L (2012) Drivers of the Primate Thalamus. *J Neurosci.* 32(49):17894–17908
2. Bodor ÁL, Giber K, **Rovó Z**, Ulbert I, Acsády L (2008) Structural Correlates of Efficient GABAergic Transmission in the Basal Ganglia–Thalamus Pathway. *J Neurosci.* 28(12):3090–3102

Egyéb publikációk

1. Wimmer RD, Astori S, Bond CT, **Rovó Z**, Chatton J, Adelman JP, Franken P, Lüthi A (2012) Sustaining Sleep Spindles through Enhanced SK2-Channel Activity Consolidates Sleep and Elevates Arousal Threshold. *J Neurosci.* 32(40):13917–13928
2. Cazzin C, Piccoli L, Massagrande M, Garbati N, Michielin F, Knaus HG, Ring CJ, Morrison AD, Merlo-Pich E, **Rovó Z**, Astori S, Lüthi A, Corti C, Corsi M (2011) rKv1.2 overexpression in the central medial thalamic area decreases caffeine-induced arousal. *Genes Brain Behav.* 10(8):817-27.
3. Bíró A, **Rovó Z**, Papp D, Cervenak L, Varga L, Füst G, Thielens NM, Arlaud GJ, Prohászka Z (2007) Studies on the interactions between C-reactive protein and complement proteins. *Immunology.* 121(1):40-50

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt Acsády László témavezetőmnek szeretném megköszönni, hogy a laborjában töltött hét év során mind tudásban, mind gyakorlati ismeretekben gazdagodtam. Köszönöm, hogy biztosította számomra a doktori munkám végzéséhez, és a disszertáció megírásához a szükséges feltételeket.

Köszönettel tartozom Mátyás Ferencnek, akivel a disszertáció szerves részét képező γ 2 kondicionális talamikus KO kísérletekben szorosan együttműködve dolgoztunk. Továbbá köszönöm Slézia Andreának és Barthó Péternek az *in vivo* egérkísérletekben nyújtott fáradhatatlan munkájukat. Köszönettel tartozom Hangya Baláznak, aki az *in vivo* egysejt elvezetések elemzésében nyújtott nagy segítséget. Köszönettel tartozom Bodor Ágnesnek, Giber Kristófnak, Ulbert Istvánnak és Dávid Csabának akik szerzőtársaim a disszertáció alapját képező publikációknak.

Hálásan köszönöm Anita Lüthinek, hogy támogatta a másfél éves svájci tartózkodásomat, és befogadott a laborjába, mint cserediákot. Anita Lüthi a tudományhoz való precíz hozzáállásával lehetővé tette, hogy bonyolult celluláris folyamatokat is megértsek. Az *in vitro* munka elsajátításában nagyon nagy segítséget nyújtott nekem Simone Asotri. Továbbá szeretném megköszönni az egész lausanne-i csoportnak a számtalan segítséget, amit a kinn töltött idő alatt kaptam tőlük. Név szerint Ralf Wimmernek, Martina Perinnek, Chiara Pellegrininek és Sandro Leccinek.

Köszönöm az MTA-KOKI és az UNIL-DBCM vezetőségének és munkatársainak, hogy munkámat színvonalas tudományos közegben végezhettem. Köszönöm ezen kívül az MTA-KOKI Thalamus csoport (eddig fel nem sorolt) jelenlegi és volt munkatársának a segítőkészségét, és a munkát kísérő jó hangulatot: Bokor Hajnalkának, Hádinger Nórának, Plattner Viktornak, Faddi Krisztinának. Hálás köszönettel tartozom továbbá az MTA-KOKI Nikon center főmunkatársának, Barna Lászlónak, illetve a vele szorosan együttműködésben dolgozó Dudok Barnának a STORM mikroszkóp elsajátításában nyújtott nélkülözhetetlen segítséget. Köszönöm Papp Editnek, hogy elvállalta a doktori disszertációm intézeti bírálatát. Köszönöm értékes megjegyzéseit.

A doktori értekezésem nem valósulhatott volna Rovó Petra és Tuza Zoltán fáradhatatlan segítségnyújtása nélkül. Végül, szeretném megköszönni a családomnak, hogy a tanulmányaim teljes ideje alatt támogattak.