

# Feszültség- és ligandfüggő ioncsatornák komplex sejtfelszíni eloszlása kérgi piramissejteken

Doktori tézisek

**Dr. Szigeti Katalin**

Semmelweis Egyetem  
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Nusser Zoltán, az MTA tagja, tudományos tanácsadó

Hivatalos bírálók: Dr. Altdorfer Károly, Ph.D., egyetemi docens  
Dr. Rácz Bence, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Hunyadi László, az MTA tagja, egyetemi tanár  
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Halasy Katalin, az MTA doktora, egyetemi tanár  
Dr. Dobolyi Árpád, az MTA doktora, tudományos tanácsadó

Budapest  
2015

## BEVEZETÉS

A kérgi fősejtek alapvető feladata az információ felfogása, feldolgozása és továbbítása távoli kérgi területekre. Az idegsejtek aktivitását a plazmamembránjukban elhelyezkedő ioncsatornák komplex szabályozó mechanizmusa biztosítja. A feszültségfüggő ioncsatornákon átfolyó ionáramok felelősek az akciós potenciál kialakításáért és továbbításáért a plazmamembránban. Ezzel szemben, a neurotranszmitter felszabadulás során aktiválódó ligandfüggő ioncsatornák helyi ionáram változást idéznek elő az idegsejtek membránjában.

Az utóbbi évtizedben a feszültségfüggő ioncsatornák közül a kálium csatornák igen nagy figyelmet kaptak, molekuláris és funkcionális sokszínűségük miatt. Ismert, hogy a különböző kálium csatorna alegységek különböző sejtfelszíni eloszlást mutatnak, amely arra utal, hogy az idegsejt serkenthetőségét különbözőképpen szabályozhatják. A kálium csatornák négy csoportba sorolhatók, amelyek közül a legnagyobb csoportot a feszültségfüggő kálium csatornák képezik (Kv). A Kv csatornák egy különleges alegysége, az úgy nevezett „A-típusú” káliumáramért (gyorsan aktiválódó és inaktiválódó) felelős Kv4 alegységek, amelyek tetramereket képeznek. A hippocampális CA1 piramissejteken korábbi elektrofiziológiai kísérletek a sejttesthez képest mintegy hatszoros káliumáram sűrűség növekedést mértek a disztális apikális dendriten. Fénymikroszkópos immunhisztokémiai módszerekkel kimutatták a Kv4.2 alegység jelenlétét a CA1 régióban, azonban, hogy mi okozza az ionáram bedúsulását a CA1 piramissejtek disztális dendritfáján még nem tisztázott.

A befelé egyenirányító kálium csatornák (Kir) egy kis részét képezik a kálium csatornák családjának, mégis elektrofiziológiai tulajdonságaik révén nagyban hozzájárulnak az idegsejtek serkenthetőségének szabályozásához. A Kir csatornák tetramereket képeznek a plazmamembránban és egy különleges alegysége a Kir3 alegység, G-fehérje kapcsolt receptorokkal képez funkcionális makromolekuláris egységet. Fénymikroszkópos immunhisztokémiai tanulmányok kimutatták, hogy a Kir3.1, Kir3.2 és Kir3.3 alegységek nem egyenletes immunjelölést mutatnak a hippocampális CA1 régióban. Továbbá, dendritikus *patch-clamp* elvezetések során kiderült, hogy a Kir3 csatornák nagyobb spontán aktivitást mutatnak a CA1 piramissejtek apikális dendritjén mint a sejttesten. Habár korábbi elektronmikroszkópos tanulmányok kimutatták a Kir3 alegységek jelenlétét a piramissejtek különböző szubcelluláris kompartmentumaiban, a csatorna alegységek pontos sűrűsége és távolság-függő eloszlása ismeretlen.

Számos tanulmány foglalkozik a periszomatikus gátlással, mivel fontos szerepe van az idegsejtek kimenetének a szabályozásában. A gyors gátlásért a szinaptikus GABA<sub>A</sub>

receptorok (GABA<sub>A</sub>R) aktivációja felelős. Ezek heteropentamer ligandfüggő ioncsatornák, amelyeket két  $\alpha$ , két  $\beta$  és egy  $\gamma 2$  alegység alkot. Bizonyos sejtekben a  $\gamma 2$  alegység helyett a  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma 1$  vagy  $\gamma 3$  alegységek lehetnek jelen. A  $\gamma 2$  alegységet tartalmazó receptorok képesek bedúsulni a gátló szinapszisokba és felelősek a gyors, úgy nevezett „fázikus gátlásért”. A  $\gamma 2$  alegység különleges szerepét tovább hangsúlyozza az a tény, hogy a  $\gamma 2$  gén kiütése letális. Ezzel szemben viszont az  $\alpha$  és  $\beta$  gének kiütése nem. Néhány tanulmány kimutatta a  $\gamma 2$  alegység szerepét a GABA<sub>A</sub> receptorok szinaptikus bedúsulásában, ugyanis gén-kiütéses vizsgálatok során a GABA<sub>A</sub> receptorok és a gephyrin csökkent klasztereződést mutattak. Ezzel szemben, egy a laborunkból származó korábbi munka kimutatott GABA<sub>A</sub> receptor által közvetített gátló miniatűr posztszinaptikus áramot (mIPSC)  $\gamma 2$  gén-kiütött idegsejt tenyészetekben. Viszont, a szinaptikus áram-szerű ionáram nem bizonyítja, hogy a receptorok valóban a szinapszisban vannak bedúsulva.

## CÉLKITŰZÉSEK

A disszertációm első részében az volt a célom, hogy feltárjam két különböző kálium csatorna szubcelluláris sejt felszíni eloszlását a patkány hippocampusz CA1 régiójában, felhasználva a nagyfelbontású nátrium dodecil szulfát (SDS)-maratott fagyasztva-tört replika jelölés (SDS-FRL) módszerét.

A második részben a  $\gamma 2$  alegység szerepét vizsgáltam a GABA<sub>A</sub> receptorok szinaptikus bedúsulásában az egér szomatoszenzoros kérgi idegsejtjein. Kérdéseim megválaszolására Cre-dependens vírus-mediált gén-kiütési eljárást, fénymikroszkópos immunfluoreszcens technikát és elektronmikroszkópos SDS-FRL módszert használtam. Ezt a munkát kollaborációban végeztem Dr. Mark D. Eyre kollégámmal. En végeztem a fény és elektronmikroszkópos immunhisztokémiai jelöléseket, Mark Eyre pedig a *whole cell patch-clamp* elvezetésekét végezte, amelyeket nem fogok bemutatni a téziseimben.

Munkám első részében a következő kérdésekre kerestem a választ:

1. Milyen szubcelluláris eloszlást mutat a Kv4.2 és Kir3.2 alegység a CA1 piramissejtek axo-szomato-dendritikus kompartmentumaiban?
2. A Kv4.2 alegység sejt felszíni eloszlása követi-e a funkcionálisan mért káliumáram távolság-függő sűrűség eloszlását a CA1 piramissejteken?
3. Mi okozza a megnövekedett Kir3 csatorna aktivitást a piramissejtek disztális dendritfáján?

Munkám második részében a következő kérdéseket tettem fel:

1. Szükséges-e a  $\gamma 2$  alegység a GABA<sub>A</sub> receptorok szinaptikus bedúsulásához *GABA<sub>A</sub>R $\gamma$ 2<sup>771</sup>lox* egér szomatoszenzoros kérgében?
2. Milyen szubcelluláris elrendeződést mutatnak a mIPSC-t létrehozó GABA<sub>A</sub> receptorok a 2/3 rétegi kérgi  $\gamma 2$  alegység hiányos idegsejteken?
3. Milyen a szinaptikus GABA<sub>A</sub> receptorok alegység összetétele és sűrűsége a  $\gamma 2$  alegység hiányos idegsejteken?

## MÓDSZEREK

### *Vírus injektálás*

Az altatott felnőtt (P 22–40) hím és nőstény *GABA<sub>A</sub>R $\gamma$ 2<sup>771</sup>lox* egerek szomatoszenzoros kérgét 0,6  $\mu$ l Cre-GFP fúziós fehérjét tartalmazó adeno asszociált vírussal injektáltam (sebesség 0,1  $\mu$ l min<sup>-1</sup>). Az injektálás után az egereket 2 vagy 6 hét után használtam fel.

### *Szövetek előkészítése*

Az anatómiai kísérletekhez felnőtt hím *Wistar* patkányokat (P 25–52; n = 17), hím vad típusú egereket (n = 3) és *Kv4.2<sup>-/-</sup>* egereket (P 68–217; Prof. Daniel Johnston adománya; n = 3), valamint hím és nőstény *GABA<sub>A</sub>R $\gamma$ 2<sup>771</sup>lox* egereket (P 36–80; n = 22) használtam fel, amelyeket elaltattam majd az aortán keresztül perfundáltam. A fénymikroszkópos immunfluoreszcens reakciókhoz az állatokat 0,1 M foszfát pufferben (PB) oldott 2 vagy 4 % paraformaldehid (PFA) és 15v/v % pikrinsav (PA) keverékét tartalmazó oldattal perfundáltam 15–20 percig vagy 0,1 M nátrium acetátban oldott 2 % PFA tartalmazó oldattal perfundáltam 15 percig. Az állatok egy része jéghideg oxigénnel átáramoltatott mesterséges agygerincvelői (ACSF) folyadékkal volt 4 percig átmosva, majd az állat agyát kipreparáltam és 0,1 M PB-ben oldott 4% PFA és 15v/v % PA keverékét tartalmazó oldatban utófixáltam. Ezt követően 60 vagy 70  $\mu$ m vastagságú koronális metszeteket készítettem. Az SDS-FRL-hez az állatokat 0,1M PB-ben oldott 2% PFA és 15v/v % PA keverékét tartalmazó oldattal perfundáltam 15 vagy 16 percig, ezt követően 80  $\mu$ m vastagságú koronális metszeteket készítettem. A fagyasztáshoz kis szövet darabokat metszettem ki a dorzális hippocampusból illetve az injektált szomatoszenzoros kéregből (ez utóbbit a natív GFP jel alapján metszettem ki). A szövet darabokat 30 % glicerol oldattal kezeltem.

A tónusos GABA áram elvezetéséhez Mark Eyre kollégám 2 héttel az injektálás után az elaltatott egereket dekapitálta, majd az agyat kipreparálta és jéghideg ACSF-be helyezte. Ezt követően 250  $\mu$ m vastagságú metszeteket készített, amelyet 95 % O<sub>2</sub>-el és 5 % CO<sub>2</sub>-el

átáramoltatott ACSF-be helyezett. A szeleteket 33 °C-on 30 percig inkubálta, majd a felhasználásig szobahőmérsékleten tárolta.

### ***Fluoreszcens immunhisztokémia***

A szabadon úszó metszeteket többször mostam 0,1 m PB-ben majd Tris-pufferelt sóoldatban (TBS), ezt követően 10% normál kecske szérummal (NGS) blokkoltam 1 órán át, majd az elsődleges ellenanyagokat tartalmazó oldatban inkubáltam egy éjszakán át. Másnap a szeleteket 2 órán át a másodlagos ellenanyagokat tartalmazó oldatban inkubáltam. A fénymikroszkópos képeket konfokális pásztázó lézer mikroszkóppal (FV1000; Olympus, Tokyo, Japan) készítettem.

### ***SDS-FRL***

A szövet darabokat magas-nyomású fagyasztó készülékkel lefagyasztottam, majd fagyasztva-törő készülékben eltörtem. Az elhasított szövet felszínét szén (5 nm), platina (2 nm) és szén (20 nm) réteggel gőzöltettem. Az így nyert replikát 80 °C-on 18 órát emésztettem 2.5 % SDS és 20 % szukróz keverékét tartalmazó TBS-ben. Mosást (TBS) követően a replikákat 0,1 %-5 % marha szérum fehérjét (BSA) tartalmazó TBS oldatban blokkoltam 1 órán át, majd a blokkoló oldatban hígított elsődleges ellenanyagokkal inkubáltam egy éjszakán át. Másnap a replikákat 2 órán át 5, 10 vagy 15 nm méretű aranszemcséhez kötött másodlagos ellenanyagot és 1 % vagy 5 % BSA-t tartalmazó TBS oldatban inkubáltam. A GABA<sub>A</sub> receptorok jelölését a kéregben szekvenciálisan végeztem. Végül a replikákat transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltam (JEM-1011, JEOL Ltd., Tokyo, Japan).

### ***A Kv4.2 és a Kir3.2 alegységeket és a különböző GABA<sub>A</sub> receptor alegységeket jelölő immunaranszemcsék kvantitatív elemzése***

A Kv4.2 és a Kir3.2 alegységet jelölő aranszemcséket a CA1 piramisisejtek sejttestén, az axon kezdeti szakaszán, 11 különböző dendritikus kompartmentumon és axonvégződésen kvantifikáltam a *stratum radiatum*-ban (SR) és a *stratum lacunosum-molekulareban* (SLM; n = 5 patkány alegységenként). A szubcelluláris kompartmentumok csoportosításánál a következőképp osztottam fel a CA1 régió rétegeit: 0-120 µm: proximális SR; 120-240 µm: középső SR; 240-360 µm: disztális SR és 360 µm fölött: SLM. A tüskéket egyrészt ultrastruktúra alapján azonosítottam, másrészt pedig a serkentő posztzinaptikus denzitásban jelen lévő PSD-95 immunarany jelölés alapján. Az axonvégződéseket a SNAP-25 immunarany jelölés alapján azonosítottam vagy az aktívzóna jelenléte alapján, amellyel szemben megfigyelhető volt egy tüske vagy dendrit exoplazmatikus oldala (E oldal). Az axon

kezdeti szakaszát a pan-Neurofascin immunarany jelölés alapján azonosítottam. A GABA<sub>A</sub>Rβ3 alegységet a GABAerg szinapszisok beazonosítására használtam a piramis sejteken. Mivel a Kv4.2 és a Kir3.2 alegységek elleni ellenanyagok intracelluláris epitópokat ismertek fel, ezért a specifikus immunarany jelölés a protoplazmatikus oldalon (P oldal) volt látható. A nem specifikus háttér jelölést az E oldalon kvantifikáltam, amelyet minden esetben levontam az átlag arany sűrűség értékekből.

A különböző GABA<sub>A</sub> receptor alegységeket jelölő immunarany szemcsék kvantifikálásához az úgy nevezett „tükör replika” módszert alkalmaztam. A replika egyik oldalán Neurologin-2-t (NL-2) jelöltem, vagy egyes kísérletekben kettősjelöltem a GABA<sub>A</sub>Rβ3-al. A replika szemközti oldalát nyúlban termeltetett GABA<sub>A</sub>Rγ2 alegység elleni ellenanyaggal, vagy tengeri malacban termeltetett GABA<sub>A</sub>Rγ2 alegység és nyúlban termeltetett GABA<sub>A</sub>Rα1 alegység elleni ellenanyaggal jelöltem. A 2/3 kérgi rétegben alacsony nagyításon random kiválasztottam sejtesteket majd 15000X–25000X nagyításon lefényképeztem az összes NL-2 tartalmazó szinapszist. Ezt követően a replika kiegészítő oldalán beazonosítottam a szinapszisok tükörképeit. A szinaptikus területet a P oldalon az intramembran partikulomok (IMP) klasztere és a NL-2 jelölés alapján rajzoltam meg, majd erre vetítettem Photoshopban az E oldalt. A NL-2, γ2, α1 és β3 alegységeket jelölő immunarany szemcséket ezen a területen belül, valamint 30 nm-re a szélétől számoltam. Az extraszinaptikus GABA<sub>A</sub> receptorok immunarany jelölését ugyanezekben a képeken számoltam. A nem specifikus háttérjelölést az E vagy a P oldalon számoltam, attól függően, hogy hol volt az ellenanyag epitópja, majd az átlag arany szemcse sűrűségéből levontam.

A méréseket az iTEM szoftver segítségével végeztem. Az arany szemcse sűrűség értékek átlag ± szórás vannak feltüntetve. A statisztikai elemzést a STATISTICA szoftverrel végeztem, szignifikancia szintnek pedig a  $p < 0,05$  értéket tekintettem.

### ***A tónusos GABA áram mérése***

A tónusos GABA áram mérést Dr. Mark D. Eyre kollégám végezte. A szómából *whole cell voltage-clamp* elvezetéseket végzett (-70 mV), K-glukonát és KCl tartalmú intracelluláris oldattal. Az ionotrop glutamát receptorok blokkolására kinurén savat használt. A kezdeti alapvonal elvezetés után (6 perc) 1 μM THIP-t mosott be (18 perc) majd 20 μM SR95531-t és nézte a tartóáram változását a drog bemosását követően. A sejteket morfológiájuk valamint a 2/3 rétegben való elhelyezkedésük alapján azonosította IR-DIC optikát használva. Továbbá a sejtek tüzelési mintázatnak meghatározására hyper- és depolarizáló áramot injektált a sejtbe. Az interneuronokból spontán IPSC-et vezetett el majd EVAN1.5 szoftverrel elemezte. Az elvezetést követően a sejteket fixálta 0,1M PB-ben oldott

2% PFA és 15v/v % PA keverékét tartalmazó oldattal, majd *post-hoc* ellenőrizte a byocitinnel feltöltött sejtek Cre és GFP expresszióját.

## EREDMÉNYEK

### ***A Kv4.2 alegység egyedi szomato-dendritikus eloszlása hippocampális CA1 piramis sejteken***

A fénymikroszkópos immunfluoreszcens reakciók homogén Kv4.2 alegység eloszlást mutattak a patkány hippocampusz CA1 régiójában a *stratum oriens* (SO) és az SR-ben. A fluoreszcens jel intenzitása lecsökkent az SLM-ben. Az immunreakció specificitásának bizonyítására a jelölést megismételtem vad típusú és Kv4.2<sup>-/-</sup> egérben. A kontrol egérben a jelölés hasonló volt a patkányban lévőhöz, viszont teljesen hiányzott a Kv4.2<sup>-/-</sup> egérből, amely igazolja, hogy az immunjelölés fénymikroszkópos szinten specifikus antitest-antigén kölcsönhatás eredménye.

A replika elektronmikroszkópos tanulmányozása során a Kv4.2 alegységet jelölő aranszemcsék random eloszlását mutattak a CA1 piramis sejtek szomatikus plazmamembránjában valamint az apikális dendriten. A kvantitatív elemzés során enyhe távolság-függő aranszemcse sűrűség növekedést figyeltem meg az apikális dendrit proximális-disztális tengelyén a SR-ben, mely lecsökkent az SLM-ben levő dendriteken. Az SR-ben az apikális dendriteken a távolság-függő relatív növekedés mintegy  $69 \pm 50$  % volt. Az SR-ben és SLM-ben levő járulékos dendriteken és tüskéken a Kv4.2 alegységet jelölő aranszemcsék sűrűsége hasonló növekvő-csökkenő mintázatot mutatott, mint az apikális dendriteken. Az SR három alrégiójában az aranszemcsék sűrűsége csak mintegy  $26 \pm 16$  %-al volt nagyobb, mint az apikális dendriteken, ami arra utal, hogy a Kv4.2 alegység sűrűségében nincs számottevő különbség az egyes sejt-kompartimentumok között. A sűrűség értékek statisztikai elemzése nem mutatott szignifikáns különbséget az egyes szubcelluláris kompartmentek között ( $p = 0,08$ , One-way ANOVA).

A replika immunarany jelölés specificitásának tesztelésére a reakciókat megismételtem vad típusú és Kv4.2<sup>-/-</sup> egérben. A vad típusú egérben a reakció erőssége megegyezett a patkányban lévővel, viszont a Kv4.2<sup>-/-</sup> egérben az átlag aranszemcse sűrűség a P-oldalon nem volt szignifikánsan eltérő az E-oldalon lévő, háttér aranszemcse sűrűségtől ( $p = 0,94$ , One-way ANOVA,  $n = 3$  egér).

Érdekes módon, azt találtam, hogy a Kv4.2 alegységet jelölő aranszemcsék nemcsak a szomato-dendritikus plazmamembránban voltak jelen, hanem kis mennyiségben az axonterminálisokon is ( $2,4 \pm 0,6$  aranszemcse/ $\mu\text{m}^2$ ), mely sűrűség szignifikánsan eltért a háttér jelöléstől ( $0,5 \pm 0,4$  aranszemcse/ $\mu\text{m}^2$ ;  $p < 0,01$  páratlan Student-féle  $t$ -teszt). Mivel a

Kv4.2 alegység ismerten szomato-dendritikus elhelyezkedésű csatorna, ezért ez az eredmény meglepő. Az axonális jelölés specificitásának vizsgálatakor azt találtam, hogy a Kv4.2<sup>-/-</sup> és kontrol egérben a Kv4.2 alegységet jelölő aranszemcsék sűrűsége nagyon hasonló volt ( $2,6 \pm 1,6$  aranszemcse/ $\mu\text{m}^2$  and  $2,2 \pm 0,4$  aranszemcse/ $\mu\text{m}^2$ ;  $n = 3$  egér;  $p = 0,69$ , páratlan Student-féle  $t$ -teszt). Összegezve, ezek az eredmények arra utalnak, hogy az immunarany jelölés a szomato-dendritikus régióban specifikus ellenanyag-Kv4.2 alegység kölcsönhatás következménye, viszont ugyanaz az ellenanyag ugyanabban a kísérletben eredményezhet gyenge nem specifikus jelölést az axonvégződéseken.

Végül azt vizsgáltam, hogy a Kv4.2 alegység jel van-e glutamaterg és GABAerg szinapszisokban. Azt találtam, hogy a PSD-95-el jelölt serkentő szinapszisokban, valamint a GABA<sub>A</sub>R $\beta$ 3 alegységgel jelölt gátló szinapszisokban nincs jelen a Kv4.2.

### ***A Kir3.2 alegység sűrűségének távolság-függő növekedése a CA1 piramissejtek apikális dendritjén***

A Kir3.1, Kir3.2 és Kir3.3 alegységek fluoreszcens jelölése hasonló mintázatot mutatott a CA1 régióban. Az SO, SP és az SR proximális része gyengén jelölt, míg a jelölés intenzitása fokozatosan növekedett a disztális SR és SLM irányába. A három alegység közül a legerősebb jelintenzitást a Kir3.2 alegység adta, a leggyengébbet pedig a Kir3.3. Ezek a megfigyelések megegyeznek a korábbi eredményekkel. Mivel a Kir3.2 alegység nélkülözhetetlen alegysége a Kir3 csatornának, a továbbiakban ezt az alegységet kvantifikáltam.

A Kir3.2 alegységet jelölő aranszemcsék csak kis számban voltak jelen a sejttest és a proximális apikális dendrit plazmamembránjának P-oldalán, viszont jóval több aranszemcse volt jelen a disztális apikális dendriteken és az SLM-ben levő dendriteken. A járulékos dendriteken és tüskéken viszonylag kevés Kir3.2 jelölő aranszemcse volt jelen. A kvantitatív eredményeim azt mutatják, hogy az aranszemcsék sűrűsége a sejttesttől való távolság függvényében közel egyenletesen nőtt a CA1 piramissejtek apikális dendritjén az SR-ben és SLM-ben. Hasonlóan nőtt a Kir3.2 jelölő aranszemcsék száma a járulékos dendriteken és tüskéken egyaránt. Az aranszemcsék sűrűsége az SR-ben és az SLM-ben lévő szubcelluláris kompartmenteken szignifikánsan nagyobb volt, mint a szómán (One-way ANOVA, Dunnett's *post hoc* teszt,  $p < 0,05$ ).

Végül a Kir3.2 jelölő aranszemcsék eloszlását vizsgáltam az axon kezdeti szakaszán és az axonvégződéseken a CA1 régióban. A pan-Neurfacinnal jelzett axon kezdeti szakaszán az aranszemcsék sűrűsége nem különbözött az E-oldalon levő háttér jelöléstől ( $p < 0,001$ ; One-way ANOVA, Dunnett's *post-hoc* teszt:  $p = 0,95$ ;  $n = 3$  patkány). Hasonlóan, az



axonvégződéseken lévő arany szemcsék sűrűsége sem különbözött a háttértől ( $p < 0,001$ ; One-way ANOVA, Dunnett's *post-hoc* teszt:  $p > 0,05$ ;  $n = 3$  patkány).

### ***A GABA<sub>A</sub> receptorok klasztereződése a $\gamma 2$ alegység hiányában a kérgi periszomatikus szinapszisokban***

Dr. Mark D. Eyre *whole cell* elvezetéssel gátló szinaptikus áramok jelenlétét tárta fel a 2/3 kérgi rétegi Cre<sup>+</sup>,  $\gamma 2$  alegység-hiányos piramis sejteken. A Cre<sup>+</sup> sejtekben a mIPSC-k lecsengési időállandója lassúbb, mint a Cre<sup>-</sup> sejtekben. Habár ez az eredmény azt sugallja, hogy szinaptikus eredetre utaló mIPSC-k létrejöhetnek a  $\gamma 2$  alegység nélkül is, a szinaptikus áram jelenléte viszont mégsem bizonyítja, hogy a receptorok valóban a GABA<sub>A</sub> szinapszisok posztszinaptikus specializációiban vannak. Ahhoz, hogy feltárjam a gátló szinaptikus áramot létrehozó GABA<sub>A</sub> receptorok elhelyezkedését a plazmamembránban, alegység-összetételét és sűrűségét, fénymikroszkópos valamint elektronmikroszkópos SDS-FRL technikákat alkalmaztam

A GABA<sub>A</sub>R $\gamma 2^{771}lox$  egerek injektált kérgében erős Cre-rekombináz elleni immunfluoreszcens jelölést láttam, amely területen a GABA<sub>A</sub>R  $\gamma 2$  jelölés jelentősen lecsökkent. Ezzel szemben, a GABA<sub>A</sub>R  $\alpha 1$  és  $\beta 3$  alegységek jelölése nem változott az injektált zónán belül. Nagy nagyításon vizsgálva, az immunjelölés pöttyözött volt és hasonló intenzitású mind a Cre<sup>+</sup> mind Cre<sup>-</sup> 2/3 rétegi sejtekben. Mivel a  $\gamma 2$  alegység-hiányos Cre<sup>+</sup> sejteken nem volt változás az  $\alpha 1$  és  $\beta 3$  alegységek pöttyözött fluoreszcens jelölődésében, ez arra utal, hogy a GABA<sub>A</sub> receptorok valószínűleg bedúsulnak a szinapszisokba. Elképzelhető, hogy a maradék  $\alpha$  és  $\beta$  alegységek önmagukban alkotnak funkcionális heteropentamer csatornát. A kis koncentrációban alkalmazott Zn<sup>2+</sup> (Mark Eyre által végzett farmakológiai kísérletek) nem blokkolta a Cre<sup>+</sup> sejtekben a mIPSC-et, így kizárható a csak  $\alpha\beta$  alegységekből álló receptorok jelenléte a fertőzött sejteken. Tehát valószínűleg egy másik alegység vette át a helyét a  $\gamma 2$  alegységnek a pentamer ioncsatornában. Potenciálisan a  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma 1$  és  $\gamma 3$  alegységek lehetnek.

Először fluoreszcens immunjelöléssel vizsgáltam, hogy a  $\delta$  alegység helyettesíthette-e a  $\gamma 2$  alegységet a vírus-injektált kérgi régióban. Meglepetésemre, azt találtam, hogy a  $\delta$  alegység elleni immunfluoreszcens jel intenzitása megnőtt a Cre-immunpozitív injektált zónán belül. Néhány Cre<sup>+</sup> kérgi interneuron erős  $\delta$  expressziót mutatott a plazmamembránjában. Megfigyeltem, hogy a Cre<sup>+</sup> parvalbumin-tartalmú interneuronok a szomato-dendritikus plazmamembránjukban erős  $\delta$  expressziót mutattak, ezzel szemben az injektált zónán kívüli parvalbuminos sejtek citoplazmatikus  $\delta$  jelölést mutattak. Ezek az

eredmények arra utalnak, hogy a  $\gamma 2$  alegység hiányában a  $Cre^+$  parvalbumin-tartalmú gyorsan-tüzelő interneuronok plazmamembránjában upregulálódik a  $\delta$  alegység.

Mivel az  $\epsilon$ ,  $\gamma 1$  és  $\gamma 3$  alegységek ellen nem találtam specifikus ellenanyagokat, ezért az ő potenciális jelenlétüket nem tudtam vizsgálni a  $Cre^+$  sejtek szinapszisaiban.

A továbbiakban a  $GABA_A$  receptorok alegység-összetételét vizsgáltam a  $\delta$  alegységet-expresszáló  $Cre^+$  gyorsan-tüzelő interneuronokban fluoreszcens immunhisztokémiával. Az  $\alpha 1$  alegység-immunjelölés jelen volt a  $\delta$  alegységet-expresszáló  $Cre^+$  sejtek plazmamembránjában, míg a  $\alpha 4$  alegység-immunjelölés teljesen hiányzott ezeknek a sejteknek a plazmamembránjából. Összehasonlítva az  $\alpha 1$  alegység-immunjelölést a  $Cre^+$  és  $Cre^-$   $\delta$  alegységet-expresszáló sejtek plazmamembránjában, nem találtam kvalitatív eltérést a fluoreszcens jel intenzitásában. A következőkben  $\alpha 1$ ,  $\delta$  és gephyrin hármass-jelöléssel azt vizsgáltam, hogy a  $\delta$  alegység helyettesítheti-e a  $\gamma 2$  alegységet a  $GABA_{erg}$  posztszinaptikus specializációkban. A gephyrin klaszterek hiányoztak a  $\delta$  alegységet-expresszáló  $Cre^+$  interneuronok plazmamembránjából, viszont jelen voltak a  $Cre^-$   $\delta$  alegységet-expresszáló interneuronokéban, ahol az  $\alpha 1$  kolokalizáltak, de nem a  $\delta$  alegységgel. Annak ellenére, hogy a gátló szinapszisok fő sejtadhéziós molekulája (gephyrin) hiányzott a  $Cre^+$  gyorsan-tüzelő interneuronokban, a spontán IPSC-k jelen voltak ezeken a sejteken (Mark Eyre által végzett kísérletek). A spontán IPSC-k jelenléte a  $\gamma 2$  alegység hiányában szinaptikus eredetre utaló GABA áramok jelenlétére utal a  $Cre^+$   $\delta$  alegységet-expresszáló interneuronokban. Habár ezekből a kísérletekből nem lehet egyértelműen következtetni arra, hogy a  $\delta$  alegység hiányzik a  $Cre^+$  gyorsan-tüzelő interneuronok gátló szinapszisaiból, meg kell jegyeznem, hogy a THDOC és a DS2 (mindkét drog a  $\delta$  alegység-tartamú receptorokon hat) drogok nem voltak hatással a mIPSC-k amplitúdójára és lecsengési időállandójára. Tehát a  $\delta$  alegység ezekben a  $Cre^+$  gyorsan-tüzelő sejtekben valószínűleg az extraszinaptikus plazmamembránban van jelen. Valóban a tónusos GABA áram elevezetésekből kiderült, hogy SR95531 hatására a  $Cre^+$  gyorsan-tüzelő sejtekben, a tartóáramban nagyobb kifele-irányuló eltolódás van, mint más sejtekben. Továbbá a THIP, amely szelektív  $\delta$  alegység-tartalmú receptorokon ható drog, potenciórozta a tónusos áramot a  $Cre^+$  gyorsan-tüzelő sejtekben, habár a hatás statisztikailag nem volt szignifikáns ( $p = 0,26$  SR95531,  $n = 9$ ;  $p = 0,36$  THIP,  $n = 8$ ; Factorial ANOVA, Tukey's Unequal n HSD *post-hoc* teszt).

Ahhoz, hogy bebizonyítsam a  $GABA_A$  receptorok valóban bedúsulnak a szinapszisokba a  $\gamma 2$  alegység hiányában, az SDS-FRL módszert alkalmaztam a  $GABA_{AR}$  jelölésre. A kvantifikálást a periszomatikus  $GABA_{erg}$  szinapszisokon végeztem, mivel páros-elvezetéssel Mark Eyre kimutatta, hogy az IPSC-k a periszomatikus szinapszisokból erednek.

Először az injektált kéregből készített replikán random kiválasztottam sejtesteket a 2/3 kérgi rétegből és a NL-2-t jelölő aranyszemcsék alapján beazonosítottam a gátló szinapszisokat a P-oldalon. A replika tükör oldalán, az E-oldalon, a sejtek  $\gamma 2$  alegység tartalmát kvantifikáltam, amely alapján két sejtpopulációt tudtam elkülöníteni:  $\gamma 2^-$  és  $\gamma 2^+$  sejtek, amelyek megfeleltethetőek a  $Cre^+$  és  $Cre^-$  sejteknek. Miután a sejteket kategorizáltam, vizsgáltam a NL-2, GABA<sub>A</sub>R  $\alpha 1$  és  $\beta 3$  alegységek szinaptikus sűrűségét és a szinapszisok területének nagyságát a  $\gamma 2^-$  vagy  $\gamma 2^+$  sejteken. A NL-2,  $\alpha 1$  és  $\beta 3$  alegységeket jelölő aranyszemcsék szinaptikus sűrűsége szignifikánsan nem különbözött a  $\gamma 2^-$  vagy  $\gamma 2^+$  sejteken ( $p > 0,05$ ; One-way ANOVA), annak ellenére, hogy az átlag szinaptikus sűrűség értékek enyhén lecsökkentek a  $\gamma 2^-$  sejteken. A periszomatikus szinapszisok területének mérete szignifikánsan kisebb volt ( $p < 0,03$ ; Tukey's *post-hoc* teszt) a  $\gamma 2^-$  sejteken ( $0,018 \pm 0,008 \mu m^2$ ;  $n = 113$  szinapszis, 21 sejt, két egér,  $\alpha 1$  and  $\beta 3$  reakciók összevonva), mint  $\gamma 2^+$  sejteken ( $0,025 \pm 0,014 \mu m^2$ ;  $n = 239$  szinapszis, 18 sejt, két egér  $\alpha 1$  and  $\beta 3$  reakciók összevonva). Ez arra utal, hogy a szinaptikus NL-2, GABA<sub>A</sub>R  $\alpha 1$  és  $\beta 3$  össz-receptor szám enyhén lecsökkent a  $\gamma 2^-$  sejtekben.

Végül, kvantifikáltam az extraszinaptikus GABA<sub>A</sub>R  $\alpha 1$  és  $\beta 3$  alegységek sűrűségét. Az extraszinaptikus  $\alpha 1$ -t jelölő aranyszemcsék sűrűsége szignifikánsan kisebb volt a  $\gamma 2^-$  sejtekben a  $\gamma 2^+$  sejtekhez képest ( $p = 0,03$ ; One-way ANOVA), míg az extraszinaptikus  $\beta 3$ -t jelölő aranyszemcsék sűrűsége nem változott ( $p = 0,75$ ; One-way ANOVA).

## KÖVETKEZTETÉSEK

A disszertációm első részében a következő következtetéseket vontam le:

1. A Kv4.2 alegységet jelölő aranyszemcsék eloszlása a patkány CA1 piramissejtek apikális dendritjén homogén eloszlást mutat.
2. Az  $I_A$  sűrűségének növekedése nem magyarázható növekvő sejtfelszíni ioncsatorna sűrűséggel.
3. Valószínűleg valamilyen más szabályozó mechanizmusok felelősek az  $I_A$  gradiensért úgy, mint járulékos alegységek jelenléte (KChIP, DPP6) és foszforiláció.
4. A Kir3.2 alegységet jelölő aranyszemcsék sűrűsége lineárisan nő a sejtesttől való távolság függvényében a CA1 piramissejtek apikális dendritjén.
5. A sejtesttől ugyanolyan távolságra levő apikális és járulékos dendriteken valamint tüskéken a Kir3.2-t jelölő aranyszemcsék sűrűsége szignifikánsan nem különbözik egymástól.

A disszertációm első részében feltártam két funkcionálisan különböző kálium csatorna egyedi szubcelluláris és kompartment-függő eloszlását és sűrűségét a patkány hippocampusz CA1 piramissejtjein. Eredményeim arra utalnak, hogy a különböző kálium csatornák kompartment-függő módon képesek szabályozni az idegsejtek ingerelhetőségét.

A disszertációm második részében a következő következtetéseket vontam le:

1. A  $\gamma 2$  alegység-hiányos sejtek gátló szinapszisaiban az  $\alpha$  és  $\beta$  alegységek megtalálhatóak.
2. Az  $\alpha 1$  és  $\beta 3$  alegységeket jelölő aranyszemcsék szinaptikus sűrűsége nem változik a  $\gamma 2$  alegység-hiányos sejteken.
3. A Dr. Mark D. Eyre kollégám által végzett farmakológiai kísérletek azt bizonyítják, hogy a  $\gamma 2$  alegységet a  $Cre^+$  sejtekben a  $\gamma 3$  alegység helyettesíti.
4. A  $GABA_A$  receptor  $\delta$  alegység upregulálódik a  $Cre^+$  parvalbumin tartalmú interneuronok szomato-dendritikus plazmamembránjában.

A disszertációm második részében kimutattam, hogy az egér kérgi 2/3 rétegi idegsejteken a  $GABA_A$  receptorok szinaptikus bedúsulást mutatnak vírus által közvetített  $\gamma 2$  gén-kiütést követően.

## SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

A disszertáció témájához kapcsolódó közlemények:

**Kerti-Szigeti K.**, Nusser Z., Eyre M.D. (2014) Synaptic clustering without the  $\gamma 2$  subunit. *J. Neurosci.*, 34: 10219-10233.

Kirizs T., **Kerti-Szigeti K.**, Lorincz A., Nusser Z. (2014) Distinct axo-somato-dendritic distributions of three potassium channels in CA1 hippocampal pyramidal cells. *Eur. J. Neurosci.*, 39: 1771-1783.

**Kerti K.**, Lorincz A, Nusser Z. (2012) Unique somato-dendritic distribution pattern of  $K_v4.2$  channels on hippocampal CA1 pyramidal cells. *Eur. J. Neurosci.*, 35: 66-75.

Egyéb közlemények:

Eyre MD, **Kerti K.**, Nusser Z.s (2009) Molecular diversity of deep short-axon cells of the rat main olfactory bulb. *Eur. J. Neurosci.*, 29: 1397-1407.