

Egy humán agykérgi specializált GABAerg idegsejt típus morfológiai, molekuláris és elektrofiziológiai jellemzése

Doktori értekezés

Boldog Eszter

Témavezető:

Dr. Tamás Gábor, Ph.D., D.Sc.

egyetemi tanár

Biológia Doktori Iskola

Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék

Természettudományi és Informatikai Kar

Szegedi Tudományegyetem



Szeged

2021

BEVEZETÉS

Az emberi agykéreg a legbonyolultabbnak tartott élő struktúra. A magasabb rendű kognitív funkciókat, mint például a beszéd, az asszociatív gondolkodás, a memória és az érzelmek kialakulása az agykéreg 90%-át kitevő neokortex irányítja. Az idegrendszert alkotó idegszövet fő sejtípusai a gliák és az idegsejtek. A morfológiailag és funkcionálisan erősen polarizált neuronok ingerfelvételre és idegi ingerületek vezetésére specializálódtak. Az agykérgi információfeldolgozás alapvetően két fő idegsejt típus, a piramissejtek és interneuronok térben és időben összehangolt működése révén valósul meg. A piramissejtek az agykéreg rétegeiből összegyűjtve integrálják az idegi információt és a kéreg kimeneteit adják, miközben a működésükben és szinaptikus kapcsolataikban heterogén interneuronok szabályozzák a piramissejtek aktivitását.

A lassan évszázados múltra visszatekintő neuron osztályozás kérdésköre napjainkig intenzíven kutatott terület. A neurohisztológia atyjának tekintett Ramon y Cajal különböző emlős fajokban, köztük emberben tanulmányozta a kérgi hálózat felépítését és az idegsejtek finom anatómiai szerkezetét. Számos idegsejt típust nevezett el és jellemzett morfológiailag. Rendszerezésének alapja a dendrit- és az axonfa alakja és elhelyezkedése volt, amely a mai napig az egyik legfőbb kiindulópont a neuronok osztályozása során. A tudományos módszerek fejlődésével azonban újabb megközelítések is kezdtek előtérbe kerülni. A különböző neuron típusok jellegzetes elektromos tulajdonságaik és molekuláris profiljuk alapján szintén jól definiálhatók. Az egymással átfedést mutató morfológiai, fiziológiai és molekuláris csoportok funkcionálisan is vizsgálható, jól elkülöníthető osztályokat alkotnak. Ennek következtében az egyes módszereket egyre ritkábban használják önmagukban, hiszen pontosabb képet csak a morfológiai és elektrofiziológiai tulajdonságok, illetve a molekuláris, azaz fehérje- vagy génexpressziós mintázatok kombinált vizsgálata adhat.

Az emberi agyműködés megértésének egyik alapvető mérföldköve az agykérgi idegsejt típusok és a köztük lévő hálózati kapcsolatok feltérképezése. Azonban annak ellenére, hogy egyre többet tudunk az emberi agykéreg egyedülálló felépítéséről és a sejtek közti szinaptikus kapcsolatokról, más emlős fajokhoz képest még mindig jóval kevesebb ismerettel rendelkezünk. A mai napig az emberi agy működésének tanulmányozásához leggyakrabban használt módszerek, mint például az EEG (elektroencefalográfia) nem képesek a sejt szintű felbontásra. A hisztológiai vizsgálatok pedig a legtöbb esetben post mortem mintákon történnek, amelyekben igen korlátozott a szubcelluláris struktúrák tanulmányozásának

lehetősége, azok halált követő gyors károsodása miatt. Mindezek következtében a mai napig is csak nagyon csekély információ áll rendelkezésünkre a humán agykérget alkotó egyedi idegsejtek és az általuk kialakított hálózatok működéséről. A legtöbb tanulmányban az emberi agyműködés modellezéséhez rágcsáló modellállatokat használnak annak ellenére, hogy napjainkra egyre növekvő számú tanulmány bizonyítja a két faj közti jelentős neuronális különbségeket szinaptikus, celluláris és hálózati szinten egyaránt. Ennek fényében egyre világosabbá válik, hogy az emberi tudat megértéséhez vezető út egyik kritikus lépése a humán agykérget felépítő idegsejt típusok és a köztük lévő hálózati kapcsolatok megismerése lehet.

CÉLKITŰZÉSEK

Az agykérgi idegsejt típusok és a köztük lévő hálózati kapcsolatok feltérképezése alapvető fontosságú az egyedülállóan magasszintű emberi agyműködés megértéséhez. Az agykérgi sejhálózatokról származó pontosabb ismereteink azonban túlnyomórészt rágcsálókon, macskán és főemlősökön végzett kísérletekből származnak, így a humán aspektusok napjainkig kevésbé ismertek. Doktori munkám során ezért a következő célokat tűztük ki:

- 1) Potenciálisan új humánspecifikus agykérgi neuron típusok azonosítása.
- 2) Egy esetlegesen azonosított sejtípus részletes
 - morfológiai,
 - molekuláris,
 - elektrofiziológiai és
 - funkcionális jellemzése.

MÓDSZEREK

Minden vizsgálat a Helsinki Nyilatkozat értelmében és a Szegedi Tudomány Egyetem Etikai Bizottságának engedélyével történt.

Agyszelet készítés

A humán neokortikális szeletek olyan betegek ($n=32$, kor: 47 ± 16 év) akut biopsziás szöveteiből készültek, akiknél egy szubkortikális tumor vagy aneurizma sebészeti megközelítéshez szükség szerű volt eltávolítani a bal vagy jobb oldali frontális, parietális vagy temporális kérgi területek egy részét. A sebészileg eltávolított szövetblokkokat a műtőben azonnal jéghideg ($3-8^{\circ}\text{C}$) magas szacharóz tartalmú mesterséges agy-gerincvelői folyadékba helyeztük (85 mM NaCl , $2,5\text{ mM KCl}$, $1,25\text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$, 25 mM NaHCO_3 , $0,5\text{ mM CaCl}_2$, 4 mM MgSO_4 , $25\text{ mM d}(+)\text{-glükóz}$, 75 mM szacharóz , 95% O_2 -t és 5% CO_2 -t tartalmazó gázeleggyel telítve) és a metszés végéig ebben tartottuk. A szövetblokkból vibráló pengéjű mikrotómmal az agyfelszínre merőlegesen $350\text{ }\mu\text{m}$ vastag szeleteket metszettünk. A szeleteket a metszés során használt oldatban 36°C -on inkubáltuk. 30 perc elteltével a magas szacharóz tartalmú folyadékot fokozatosan lecseréltük a következő összetételű szobahőmérsékletű alacsony kalciumtartalmú mesterséges agy-gerincvelői oldatra (130 mM NaCl , $3,5\text{ mM KCl}$, $1\text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$, 24 mM NaHCO_3 , 1 mM CaCl_2 , 3 mM MgSO_4 , $10\text{ mM d}(+)\text{-glükóz}$, 95% O_2 -t és 5% CO_2 -t tartalmazó gázeleggyel telítve).

Elektrofiziológia

Az elektrofiziológiai vizsgálatokhoz a szeleteket 36°C -os elvezető kamrába helyeztük, amelyen keresztül mesterséges agy-gerincvelői folyadékot, elvezető oldatot áramoltattunk. Az elvezető oldat annyiban különbözött a tároláshoz használt oldattól, hogy az 3 mM CaCl_2 -t és $1,5\text{ mM MgSO}_4$ -t tartalmazott. Az elektrofiziológiai elvezetéseket whole-cell patch-clamp technikával végeztük, egyszerre legfeljebb négy idegsejtből. A sejteket infravörös differenciál interferencia kontraszt (DIC) videomikroszkópia segítségével vizualizáltuk $60-130\text{ }\mu\text{m}$ -re a szelet felszínétől $40\times$ -es vízimmerziós objektívvel. A mikropipettákat ($5-7\text{ MOhm}$) alacsony kloridion tartalmú intracelluláris oldattal ($\text{pH } 7,25$, 300 mOsm) töltöttük meg. Az elvezetésekhez a következő összetételű intracelluláris oldatot használtuk: 126 mM K-glükonát , 4 mM KCl , 4 mM ATP-Mg , $0,3\text{ mM GTP-Na}_2$, 10 mM HEPES , $10\text{ mM keratin-foszfát}$ és 8 mM biocitin . Az elektrofiziológiai elvezetéseket Patchmaster szoftver segítségével áramzár

üzemmódban végeztük. A mért elektromos jeleket 8 kHz-en szűrtük, 16 kHz-en digitalizáltuk, majd Fitmaster és Origin 7.5 szoftverek segítségével elemeztük. A sejtek passzív elektromos tulajdonságait és tüzelési mintázatukat a sejtek nyugalmi membránpotenciálján mértük áramzár üzemmódban két másodpercenként 800 ms-os négyszögimpulzust injektálva a sejtbe. A négyszögimpulzusok -100 pA-tól kezdődtek és 20 pA-rel növekedtek minden egyes ismétléskor. Szinaptikus kapcsolatok vizsgálata során a preszinaptikus sejteket rövid 2-10 ms-os, 900 pA-es áraminjekcióval stimuláltuk, hogy akciós potenciált váltsunk ki bennük. A farmakológiai kísérletek során valamennyi farmakont az elvezető oldatban feloldva extracellulárisan alkalmaztunk és a farmakonmentes elvezető oldattal megegyező módon juttattunk be az elvezető kamrába. Kísérleteinkben a következő farmakonokat használtuk: 10 μ M gabazin, 5 μ M 1-(2,4-Dichlorophenyl)-5-(4-iodophenyl)-4-methyl-N-1-piperidinyl-1H-pyrazole-3-carboxamide (AM251). Az egyes kísérletekre vonatkozó adatokat 20-100 mérés értékének az átlagával és szórásával (SD) határoztuk meg.

Tüzelési mintázat csoportosító analízis

Anatómiailag azonosított csipkebogyó (n=55) és nem-csipkebogyó sejtek (n=52) tüzelési mintázatán 200 elektrofiziológiai paraméter került lemérésre. A mért paraméterek közül a tartóvektor-gép (support vector machine, SVM) alkalmazásával lett kiválasztva az a két tulajdonság, amelyek segítségével a legnagyobb mértékben szétválaszthatóvá vált egymástól a két vizsgált csoport. A kiválasztott paraméterek a maximális interspike-intervallum szórás és a hiperpolarizáció által kiváltott sag amplitúdó értékek lettek.

Impedancia profil mérés

Az impedancia profilokat az elektrofiziológiai elvezetések során exponenciálisan növekvő frekvenciájú szinuszoid (0,2-200 Hz; 10 mp) áram injekció segítségével határoztuk meg, amelyet a Patchmaster szoftverrel generáltunk. Az egyes sejtek impedancia profilját (Z) minden egyes mérésnél meghatároztuk a feszültség válaszok gyors Fourier-transzformációjának (FFT) és a hozzátartozó parancsáram FFT komponensének hányadosaként. Az elvezetett sejtek anatómiai azonosítását követően a kapott adatokat a következő három csoportba soroltuk: csipkebogyó sejtek, neurogliaform sejtek és „besorolatlan interneuronok” csoportjába. Az impedancia profilok statisztikai analíziséhez a következő négy értéket vettük figyelembe: a legalacsonyabb frekvencián mért impedancia ($Z_{0,2\text{Hz}}$); a rezonancia mértéke (Q, a maximális impedancia érték és a 0,2 Hz-hez tartozó legalacsonyabb stimuláló

frekvencián mért impedancia nagyságának a hányadosa) és a maximális impedanciához tartozó frekvencia értéke (f_{\max}).

Két-foton kalcium imaging

Az elektrofiziológiai elvezetések során a csipkebogyó sejteket 40 μM Alexa Fluor 594 fluoreszcens festékkel, a posztszinaptikus piramis sejteket pedig 100 μM Oregon Green 488 BAPTA-1 kalcium indikátorral jelöltük, hogy detektálhatóvá tegyük a piramis sejt dendritekben az intracelluláris Ca^{2+} -dinamikát. A kísérletekhez egy 40x víz immerziós objektívvel (1.0 NA, Zeiss) ellátott, módosított Zeiss LSM7 MP (Oberkochen, Germany) két-foton pásztázó mikroszkópot használtunk. A lézerforrást egy Finesse4 pumpa lézerrel ellátott FemtoRose 100 TUN titán-zafír lézer szolgáltatta, ami 80 MHz-en 820 nm hullámhosszon 100 fs pulzust bocsátott ki.

Egysejt reverz transzkripció és digitális polimeráz láncreakció (dPCR)

Az elektrofiziológiai elvezetések végén gyenge szívóerőt alkalmazva a neuronok citoplazmáját folyamatos vizuális kontroll alatt az elvezető mikropipettába gyűjtöttük. A mikropipetták tartalmát (~1,5 μl) egy 0,5 μl SingleCellProtect™ oldatot tartalmazó PCR csőbe juttattuk, hogy megakadályozzuk a nukleinsav degradációt és hogy biztosítsuk a reverz transzkripcióhoz szükséges megfelelő körülményeket. A mintákat folyékony nitrogénben fagyasztottuk és tároltuk. A reverz transzkripció elindításakor a mintákat 5 percen keresztül 65°C-on inkubáltuk a következőket tartalmazó oldatban: 4 μl SingleCellProtect, 0,45 μl TaqMan próba, 0,45 μl 10 mM dNTPs, 1,5 μl 5X first-strand puffer, 0,45 μl 0,1 mol/L DTT, 0,45 μl RNase inhibitor és 100 U reverz transzkriptáz (Superscript III). Ezt követően 1 órán keresztül 55°C-on inkubáltuk a mintákat. A reakció leállításához 15 percre 75°C-ra melegítettük a mintákat, amiket ezt követően -20°C-on tároltunk a PCR amplifikáció megkezdéséig. Ezt követően a reakcióelegyet (7,5 μl) két részre osztottuk: 6 μl -t a vizsgálni kívánt gének, 1,5 μl -t pedig a TBP háztartási gén felamplifikálására használtunk. A templát cDNS-t, TaqMan próbát, OpenArray Digital PCR Master Mix-et és nukleáz-mentes vizet tartalmazó oldatot egy 256 lyukú OpenArray lemezre vittük fel. A minták feldolgozása és az adatok kiértékelése kutatócsoportunk egy korábbi publikációjában leírtak szerint történt (Fragó és mtsai., 2013).

Hisztológia és háromdimenziós fénymikroszkópos rekonstrukció

A hisztológiai eljárás célja az elektrofiziológiai elvezetések során biocitinnel feltöltött idegsejtek fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatokra történő előkészítése volt. Az elektrofiziológiai kísérleteket követően a szeleteket legkevesebb 12 órán keresztül fixáltuk 4°C-on 4% pararformaldehidet, 1,25% glutáraldehidet és 15% pikrinsavat tartalmazó 0,1 M foszfát-pufferoldatban (pH: 7,4). A szeleteket 0,1 M foszfát-pufferrel mostuk, majd 10%-os és 20%-os szacharózt tartalmazó 0,1 M foszfát-pufferbe helyeztük. A szeleteket néhány másodpercre folyékony nitrogén segítségével fagyasztottuk, majd ezt követően 10%-os zselatinba ágyasztuk, végül jéghideg foszfát-pufferben 60 µm vastag szeletekre metszettük Leica VT 1000S mikrotómmal. A metszeteket ezt követően Tris-puffer sóoldatban oldott (TBS, pH 7,4) avidin-biotin-tormaperoxidáz komplexben (ABC, 1:100) inkubáltuk 4°C-on éjszakán át. Az enzimreakcióhoz kromogénként 0,05%-os 3'3-diaminobenzidin tetrahidrokloridot (DAB), oxidánsként pedig 0,01%-os H₂O₂-ot használtunk. A reakció végeztével a DAB sötétbarna csapadékként csapódott ki a biocitint tartalmazó sejtekben. A metszeteket 1%-os OsO₄-dal utófixáltuk, majd 1%-os uranil-acetáttal kezeltük, végül felszálló alkoholsorral dehidráltuk és epoxigyantába (Durcupan) ágyazva tárgylemezre helyeztük.

A sejt típusokat a szakirodalomban leírt dendritikus és axonális jellemzők alapján határoztuk meg. A biocitinnel feltöltött sejtek háromdimenziós rekonstrukcióját a NeuroLucida rendszer és BX-60F (Olympus) fénymikroszkóp segítségével végeztük 100x-os olajimmerziós objektívvel. A háromdimenziós rekonstrukciók kvantitatív analízisét NeuroExplorer program segítségével végeztük.

Immunhisztokémia

Az elektrofiziológiai kísérleteket követően a szeleteket 12 órán keresztül fixáltuk 4% pararformaldehidet tartalmazó 0,1 M foszfát-pufferoldatban (pH: 7,4). A szeletek 0,1 M foszfát-pufferrel történő átmosását követően 10%-os, majd 20%-os szacharózt tartalmazó 0,1 M foszfát-pufferbe kerültek, majd néhány másodpercre folyékony nitrogén segítségével fagyasztottuk. Ezt követően a szeleteket 10%-os zselatinba ágyasztuk, végül jéghideg foszfát-pufferben 50 µm-es vastagságú metszeteket készítettünk Leica VT 1000S mikrotómmal. A biocitinnel töltött idegsejteket Cy3-kapcsolt streptavidin (1:400, 2 óra) TBS oldatával tettük láthatóvá. A szómát és az axon arborizációt tartalmazó metszeteket blokkoltuk (20% normál ló szérum), majd a különböző elsődleges antitestek 0,05%-os NaN₃-t tartalmazó TBS oldatában inkubáltuk 72 órán keresztül 22°C-on. A metszetek TBS pufferrel történő átmosását követően

az immunreakciókat Alexa488- vagy Cy5-kapcsolt másodlagos antitestekkel (1:500) vizualizáltuk. Végül a szeleteket Vectashield segítségével tárgylemezre vittük. Fotókat konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal (LSM 880, Zeiss) készítettünk.

Elektronmikroszkópia

Fénymikroszkóppal és elektrofiziológiai mérésekkel azonosított csipkebogyó és neurogliaform sejtek axon szakaszait kivágtuk a metszetükből és átágyaztuk epoxigyanta blokkokba. A kivágott metszetből ultramikrotómmal (RMC MTXL, Boeckler Instruments) 70 nm vastagságú sorozatmetszeteket készítettünk, melyeket hártásított (Formvar), egylyukú rézgridekre emeltünk. Az ultravékony metszeteket 8000 és 50000-szeres nagyítás között JEOL JEM-1400Plus elektronmikroszkóppal vizsgáltuk 80 kV feszültségen, majd digitális képeket készítettünk róluk CCD JEOL Ruby kamerával (8 megapixel). Az axonterminálisokról a Reconstruct program segítségével készült háromdimenziós rekonstrukció.

Statisztikai elemzés

Eredményeinkben valamennyi értéknek az átlagát és szórását (\pm SD) adtuk meg, feltüntetve a kiértékelésbe bevett minták számát (n). A statisztikai tesztek az egyes kísérletek körülményeivel összhangban határoztuk meg (Real Statistics Data Analysis Tools, www.real-statistics.com). A normalitás tesztelését (Shapiro-Wilk teszt, Lilliefors próba) követően normál eloszlású mintáknál páros vagy páratlan t-próbát, nem normál eloszlás esetén pedig nem parametrikus tesztek (Mann-Whitney teszt, Wilcoxon Signed Ranked teszt) használtunk. Kettőnél több minta esetén varianciaanalízist (ANOVA) alkalmaztunk, Bonferroni korrekcióval. Az eredményeket $p < 0,05$ érték esetén tekintettük szignifikánsnak.

Egy új humán agykérgi interneuron típus azonosítása

Kutatócsoportunk adatbázisában megtalálható több száz humán idegsejt morfológiáját megvizsgálva, kategorizálva sikeresen azonosítottunk már ismert sejttípusokat, mint például a neurogliaform sejteket és egy eddig ismeretlen első rétegi interneuron típust is. Az új csoport sejtjeit rosehip, azaz csipkebogyó sejteknek neveztük el az axonokon látható nagyméretű, kerek, csipkebogyóra emlékeztető boutonok és a sűrű, kompakt, bokorszerű axon arborizációjuk után. Tudomásunk szerint mindeddig nem írtak le hasonló fenotípussal rendelkező első rétegi agykérgi interneuron típust. A csipkebogyó sejtek szómája, illetve teljes dendrit és axon arborizációja szinte kizárólag az első rétegre korlátozódik. A szómán és a proximális dendriteken tüskeszerű filopodiumok figyelhetők meg. A csipkebogyó sejtek axonja általában a szóma alsó oldaláról ered, majd egy nagyon sűrű axon arborizációt hoz létre a szóma körül. A kanyarult axon kollaterálisokon megjelenő kerekded boutonok mérete egyedülálló az általunk vizsgált első rétegi humán interneuronok axonterminálisai között.

A csipkebogyó sejtek kvantitatív morfológiai jellemzése

Kvantitatív összehasonlítást végeztünk háromdimenziósan rekonstruált csipkebogyó sejtek, első rétegi neurogliaform sejtek és 2/3. rétegi kosársejtek axodendritikus paraméterei között. A bouton méret és az elsőrendű dendritek száma szignifikánsan különbözött a neurogliaform sejteknél mért értékektől. A csipkebogyó sejtek axonfelhőinek maximális vertikális kiterjedése, teljes dendrit hossza és dendrit elágazódásainak gyakorisága szignifikánsan különbözött a kosársejtek adataitól. Továbbá, mindkét sejttípus értékeivel összehasonlítva szignifikáns különbséget mutatott a csipkebogyósejtek boutonok közti átlagos távolsága, teljes axon hossza és az axonok maximális horizontális kiterjedése is.

A csipkebogyó sejtek molekuláris fenotípusának meghatározása

Hogy feltérképezzük az újonnan azonosított csipkebogyó sejtek jellemző marker molekuláit, immunhisztokémiai kísérleteket végeztünk. Az elektrofiziológiai elvezetéseket követően az idegsejteket streptavidin segítségével tettük láthatóvá. A csipkebogyó sejtek kolecisztoxinin immunpozitivitást mutattak, ugyanakkor CB1 kannabinoid receptor negatívak voltak. Továbbá GABA-t és NR2F2 fehérjét expresszáltak, ellenben nem fejeztek ki szomatosztatint, kalretint, parvalbumint, NOS1-t, NPY-t, kalbindint, és kolin-

acetiltranszferázt. Kísérleteinkkel egyidőben a kutatócsoportunkkal kooperáló Allen Institute for Brain Science kutatói transzkriptom alapú sejttípus csoportosítással tíz GABAerg interneuron típust azonosítottak a humán agykéreg első rétegében. A csipkebogyó sejtek immunhisztokémiai profilját rátérképezve a transzkriptomikai osztályokra, az egyik csoporttal átfedő expressziós mintázatot mutatott: $GAD1^+ CCK^+$, de $CNR1^- SST^- CALB2^- PVALB^-$. Ezt követően, hogy még nagyobb biztonsággal összeköthessük a morfológiai és feltételezett transzkriptomikai csipkebogyó sejt csoportokat, további digitális PCR kísérleteket végeztünk. Egyedi csipkebogyó sejtek elektrofiziológiai elvezetését követően begyűjtöttük a sejtek citoplazmáját, amelyekből további potenciális marker géneket vizsgáltunk. Eredményeink visszaigazolták a transzkripciósi adatokat, amely szerint megegyeztek a két csoport sejtjeiben a vizsgált expresszált és nem expresszált gének.

Intrinzik elektrofiziológiai tulajdonságok

Az anatómiailag azonosított csipkebogyó sejtek elektrofiziológiai vizsgálata során különböző amplitúdójú áraminjekciókra kapott feszültségválaszában akciós potenciál sorozatai által kialakított tüzelési mintázata jellemzően stuttering, azaz megszakításokkal tüzelő vagy szabálytalan tüzelési mintázatú volt. Reobázikus tüzelésekre jellemző, hogy az egymást rövid idő intervallummal követő akciós potenciálokból álló sorozatokat hosszabb, csendes szakaszok választják el egymástól, melyek alatt megfigyelhető a membránpotenciál küszöb alatti oszcillációja. Mind az akciós potenciál sorozatokban, mind e küszöb alatti oszcillációkban a béta és gamma frekvencia sávok domináltak. A küszöb alatti membránpotenciál oszcillációk átlagos teljesítménysűrűség-spektruma 3,8 és 80 Hz között magasabb volt a csipkebogyó sejtekben, mint a neurogliaform sejtekben és a besorolatlan első rétegi interneuronokban. „Besorolatlan interneuronok”-nak azokat az első rétegből elvezetett idegsejteket neveztük, melyek egyértelműen sem neurogliaform, sem csipkebogyó sejt morfológiával nem rendelkeztek. A csipkebogyó sejtek interspike intervallum szórása magasabb volt mind a neurogliaform sejtek, mind pedig a besorolatlan interneuronok értékeihez hasonlítva. Az első rétegi humán interneuronok hiperpolarizáló áramimpulzusra adott feszültségválasza során jellemző sag potenciál jelenik meg. Az anatómiailag azonosított csipkebogyó sejteknél mért sag potenciál amplitúdója meghaladta a neurogliaform sejteknél és a besorolatlan interneuronoknál mért amplitúdó értékeket is. A csipkebogyó sejtek bemeneti ellenállása és időállandója szignifikánsan különbözött a besorolatlan interneuronok értékeihez hasonlítva. Az anatómiailag azonosított csipkebogyó sejtek más első rétegi interneuronokhoz képest eltérő

impedancia profillal rendelkeztek. A csipkebogyó sejtek 0,9–12,4 Hz közötti impedancia értéke magasabb volt a neurogliaform és más besorolatlan interneuronok értékeihez képest. A csipkebogyó sejtek rezonanciája szignifikánsan nagyobb volt, mint a neurogliaform sejteké és a besorolatlan interneuronoké. A maximális impedanciához tartozó frekvencia értéke a csipkebogyó sejtekben meghaladta a neurogliaform sejtekét.

Csipkebogyó sejtek a helyi mikrohálózatokban

Ezt követően a csipkebogyó sejtek helyi mikrohálózatokban betöltött szerepét kezdtük el vizsgálni. Többszörös elektrofiziológiai elvezetések végeztünk csipkebogyó sejteken és azok potenciális pre- és posztszinaptikus neuronjain. A csipkebogyó sejtekre monoszínaptikus serkentő bemenetek érkeznek 2/3. rétegi piramissejtektől és monoszínaptikus gátló posztszinaptikus potenciálok (IPSP) 1. rétegi neurogliaform és más besorolatlan interneuronoktól. Ugyanakkor nem találtunk egyetlen olyan második rétegi interneuront sem, amelyik csipkebogyó sejttel állt volna színaptikus kapcsolatban. A csipkebogyó sejtek ritkán színaptizálnak interneuronokon és 2. rétegi piramissejteken, kimeneteiket túlnyomó többségében 3. rétegi piramissejtekhez küldik. GABA_A receptor antagonistá alkalmazásával végzett farmakológiai kísérleteink bizonyítják, hogy a csipkebogyó sejtek által kiváltott IPSP-eket GABA_A receptorok közvetítik. Eredményeink szerint a csipkebogyó sejtek elsősorban azokat a piramissejteket célozzák meg, amelyek az első rétegbe küldik apikális dendritjeik terminális régióját. Elektronmikroszkópos vizsgálataink során a megfigyelt csipkebogyó sejt axon terminálisok kizárólag dendritörzseken színaptizáltak. A posztszinaptikus dendritek további ultrastrukturális vizsgálata a legtöbb esetben piramissejt dendritekre jellemző dendritüskék és elszórt szimmetrikus színapszisok jelenlétét mutatta ki. A csipkebogyó sejtek egy-sejt-aktiválta hálózati eseményekben is részt vesznek. Második és harmadik rétegi piramissejtek által kiváltott diszínaptikus IPSP-eket és egy axo-axonikus sejt által kiváltott poliszínaptikus EPSP-eket regisztráltunk posztszinaptikus csipkebogyó sejtekben. Továbbá, a csipkebogyó sejtek egymás között homológ, más típusú interneuronokkal heterológ elektromos színapszisokat is kialakítanak.

Az első réteget elérő piramissejtek disztális dendritjeit célzó csipkebogyó sejtek feltehetően a dendritikus jelfeldolgozás szabályozásában vehetnek részt. Színaptikusan kapcsolt csipkebogyó sejt-piramissejt pároknál a csipkebogyó sejteket Alexa Fluor 594 fluoreszcens festékkel, a posztszinaptikus piramissejteket pedig Oregon Green BAPTA-1 kalcium indikátorral töltöttük. A vizsgált posztszinaptikus harmadik rétegi piramissejtek

disztális dendritjein szomatikusan kiváltott akciós potenciál sorozatokat követően detektálható Ca^{2+} válaszokat mértünk. Az apikális dendritágak számos pontján következetesen mérhető volt a fluoreszcencia intenzitás változás, ami alátámasztja az akciós potenciál visszaterjedését a disztális dendrit szakaszokba. Méréseink során váltakozva váltottunk ki akciós potenciál sorozatokat kizárólag a piramissejtekben, majd egyidejűleg a sejt pár mindkét tagjában. A visszaterjedő akciós potenciálokkal egyidőben aktivált csipkebogyó sejt bemenetek képesek voltak lecsökkenteni a Ca^{2+} jelek amplitúdóját a kontroll értékekhez képest a posztszinaptikus sejt dendritjeinek egy vagy két mérési pontján. A csipkebogyó sejt bemenetek aktiválása csak ott volt képes lecsökkenteni a Ca^{2+} jelek amplitúdóját, ahol a posztszinaptikus dendritek közeli szakaszára feltételezett szinapszisok érkeztek a csipkebogyó sejtektől. Az eredmények alapján feltételezhetjük, hogy a csipkebogyó sejtek szegmens-specifikus gátlással szabályozhatják a humán piramissejtek dendritikus Ca^{2+} elektrogenezisét, hozzájárulva a dendritikus jelfeldolgozás folyamatához.

EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

Kutatócsoportunk egy eddig ismeretlen idegsejt típust azonosított az emberi agykéreg első rétegében. A csipkebogyó sejtnek nevezett új sejttípust jellegzetes morfológiai, elektrofiziológiai és molekuláris tulajdonságai alapján definiáltuk. Az egyes jellemzők erős összhangban állnak egymással, így a csipkebogyó sejtek egy olyan határozottan elkülönülő sejtcsoportot alkothatnak, mint például a nagymértékben specializált kandeláber sejtek. Munkánk során az Allen Institute kutatóival kombináltuk a humán *post mortem* és műtétekből származó szövetmintákon végzett vizsgálatokat, amely hatékony technikai megoldásnak bizonyult. Az egysejt transzkriptomikai eredmények a sejtcsoportosításhoz szükséges molekuláris adatokat, az elektrofiziológiai vizsgálatok pedig a csoportok funkcionális jellemzését biztosítják. Ezen technikai párosítással kimagasló hatékonysággal azonosíthatók, jellemezhetők különböző fajok ismert és eddig nem azonosított sejttípusai, illetve feltárható azok evolúciós konzerváltságának mértéke.

A rágcsáló kéregből hiányzó vagy nagymértékben specializálódott humán neuron típusok feltehetően olyan szinten módosítják a humán agykérgi hálózati működéseket, hogy azok nem modellezhetők rágcsálókban. A csipkebogyó sejtek feltételezhetően különös jelentőséggel bírnak a visszaterjedő akciós potenciálok szabályzásának folyamatában és a beérkező serkentő bemenetek párosításában. Modulálhatják az első rétegbe érkező serkentő bemenetek és a visszaterjedő akciós potenciálok közti kölcsönhatásokat, ami azt a feltételezést erősíti, hogy a csipkebogyó sejtek részt vehetnek az agyféltekén belüli hálózati működések finomhangolásában. Az egyedi csipkebogyó sejtekben mért küszöb alatti membrán potenciál oszcillációk legnagyobb csúcsa a θ tartományban mérhető, amely aktivitás feltételezhetően szétterjed az elektromos szinapszisokon keresztül kapcsolt csipkebogyó sejt hálózatokban. Mindez potenciálisan hozzájárulhat ahhoz, hogy a csipkebogyó sejtek fázis-szelektíven kölcsönhatásba lépjenek más agyi területekről érkező bemenetekkel. A humánspecifikus neuron típusok szerepe a hálózati funkciók kóros elváltozásainak megértésében is nagy jelentőséggel bírhat. Például számos csipkebogyó sejt szelektív marker kockázati tényezőként jelenik meg különböző neuropszichiátriai betegségek esetén. Számos ígéretes kutatási eredményt ismerünk rágcsálóban modellezett neuropszichiátriai kórképek kezeléséről, azonban ezeknek az ismereteknek a humán klinikumba történő átültetéséhez elengedhetetlen az emberi idegsejtek és az általuk alkotott hálózatok szerveződésének jobb megismerése.

Értekezés eredményeit tartalmazó közlemény:

TRANSCRIPTOMIC AND MORPHOPHYSIOLOGICAL EVIDENCE FOR A SPECIALIZED HUMAN CORTICAL GABAERGIC CELL TYPE

E. Boldog, T. E. Bakken, R. D. Hodge, M. Novotny, B. D. Aevermann, J. Baka, S. Bordé, J. L. Close, F. Diez-Fuertes, S.-L. Ding, N. Faragó, Á. K. Kocsis, B. Kovács, Z. Maltzer, J. M. McCorrison, J. A. Miller, G. Molnár, G. Oláh, A. Ozsvár, M. Rózsa, S. I. Shehata, K. A. Smith, S. M. Sunkin, D. N. Tran, P. Venepally, A. Wall, L. G. Puskás, P. Barzó, F. J. Steemers, N. J. Schork, R. H. Scheuermann, R. S. Lasken, E. S. Lein & G. Tamás

Nature Neuroscience | VOL 21 | SEPTEMBER 2018 | 1185–1195

DOI: 10.1038/s41593-018-0205-2

IF: 21,126

Egyéb közlemények:

GABAERGIC NEUROGLIAFORM CELLS REPRESENT LOCAL SOURCES OF INSULIN IN THE CEREBRAL CORTEX

G. Molnár, N. Faragó, Á.K. Kocsis, M. Rózsa, S. Lovas, **E. Boldog**, R. Báldi, É. Csajbók, J. Gardi, L.G. Puskás & G. Tamás

The Journal of Neuroscience, 2014 Jan 22; 34(4):1133–1137

DOI:10.1523/JNEUROSCI.4082-13.2014, PMID: 24453306

IF: 6,747

DIGITAL PCR TO DETERMINE THE NUMBER OF TRANSCRIPTS FROM SINGLE NEURONS AFTER PATCH-CLAMP RECORDING

N. Faragó, Á.K. Kocsis, S. Lovas, G. Molnár, **E. Boldog**, M. Rózsa, L.I. Nagy, G. Tamás & L.G. Puskás

Biotechniques, 2013 Jun; 54(6):327-36

DOI: 10.2144/000114029, PMID: 23750542

IF: 2,948

Poszter prezentációk:

ROSEHIP CELLS: AN EMERGING NEURON TYPE IN THE HUMAN CEREBRAL CORTEX; **E. Boldog**, G. Oláh, G. Molnár, M. Rózsa, A. Ozsvár, B. Kovács, J. Baka, S. Bordé, N. Faragó, Á. K. Kocsis, L. G. Puskás, P. Barzó, G. Tamás

ROSEHIP CELLS: A NOVEL NEURON TYPE IN THE HUMAN CEREBRAL CORTEX; **E. Boldog**, G. Molnár, G. Oláh, M. Rózsa, A. Ozsvár, B. Kovács, J. Baka, S. Bordé, N. Faragó, Á.K. Kocsis, P. Barzó, G. Tamás; FENS Regional Meeting, Pécs, 2017.

SYNTHESIS AND RELEASE OF INSULIN BY INTERNEURONS OF THE CEREBRAL CORTEX; G. Molnár, N. Faragó, Á.K. Kocsis, M. Rózsa, S. Lovas, **E. Boldog**, É. Csajbók, J. Gardi, A. Patócs, L.G. Puskás & Gábor Tamás; Inhibition in the CNS, Gordon Research Conference, Les Diablerets, 2013.

DIGITAL PCR TO DETERMINE THE NUMBER OF TRANSCRIPTS FROM SINGLE NEURONS AFTER PATCH-CLAMP RECORDING; N. Faragó, Á.K. Kocsis, S. Lovas, G. Molnár, **E. Boldog**, L.I. Nagy, G. Tamás and L.G. Puskás; qPCR and Digital PCR Congress, Lyon, 2013.

IDENTIFIED SOURCES OF INSULIN IN THE CEREBRAL CORTEX; G. Molnár, N. Faragó, Á.K. Kocsis, M. Rózsa, S. Lovas, **E. Boldog**, É. Csajbók, J. Gardi, G. Tamás; Society for Neuroscience, New Orleans, 2012.

IDENTIFIED SOURCES OF INSULIN IN THE CEREBRAL CORTEX; G. Molnár, N. Faragó, Á.K. Kocsis, M. Rózsa, S. Lovas, **E. Boldog**, É. Csajbók, J. Gardi, L.G. Puskás & G. Tamás; 8th FENS Forum of Neuroscience, Barcelona, 2012.

DIGITAL PCR TO DETERMINE THE NUMBER OF TRANSCRIPTS FROM SINGLE NEURONS AFTER PATCH-CLAMP RECORDING; Á.K. Kocsis, N. Faragó, S. Lovas, G. Molnár, **E. Boldog**, M. Rózsa, L.I. Nagy, L.G. Puskás & G. Tamás; 8th FENS Forum of Neuroscience, Barcelona, 2012.

IDENTIFIED SOURCES OF INSULIN IN THE CEREBRAL CORTEX; G. Molnár, N. Faragó, Á.K. Kocsis, M. Rózsa, S. Lovas, **E. Boldog**, É. Csajbók, J. Gardi, L. G. Puskás & G. Tamás; IBRO - International Workshop, Szeged, 2012.

DIGITAL PCR TO DETERMINE THE NUMBER OF TRANSCRIPTS FROM SINGLE NEURONS AFTER PATCH-CLAMP RECORDING; N. Faragó, Á.K. Kocsis, S. Lovas, G. Molnár, **E. Boldog**, M. Rózsa, L.I. Nagy, G. Tamás & L.G. Puskás; IBRO - International Workshop, Szeged, 2012.

DIGITAL PCR TO DETERMINE THE NUMBER OF TRANSCRIPTS FROM SINGLE NEURONS AFTER PATCH-CLAMP RECORDING; N. Faragó, Á.K. Kocsis, S. Lovas, G. Molnár, **E. Boldog**, M. Rózsa, L.I. Nagy, G. Tamás and L.G. Puskás; 3rd RNAi Research & Therapeutics Conference, Boston, 2012.

DIGITAL PCR TO DETERMINE THE NUMBER OF TRANSCRIPTS FROM SINGLE NEURONS AFTER PATCH-CLAMP RECORDING; N. Faragó, Á.K. Kocsis, S. Lovas, G. Molnár, **E. Boldog**, M. Rózsa, L.I. Nagy, G. Tamás & L.G. Puskás; FEBS (Federation of European Biochemical Societies) 3+Meeting, Opatija, 2012.

GLOBAL GENE EXPRESSION PROFILE OF IDENTIFIED NEUROGLIAFORM INTERNEURONS IN THE NEOCORTEX; **E. Boldog**, N. Faragó, M. Rózsa, E. Vámos, Sz. Oláh, V. Szemenyei, S. Lovas, L.G. Puskás & G. Tamás; Magyar Idegtudományi Társaság XIII. Konferencia, Budapest, 2011.

GLOBAL GENE EXPRESSION PROFILE OF IDENTIFIED NEUROGLIAFORM INTERNEURONS IN THE NEOCORTEX; **E. Boldog**, N. Faragó, M. Rózsa, E. Vámos, Sz. Oláh, V. Szemenyei, S. Lovas, L.G. Puskás & G. Tamás; X. International Congress of Medical Sciences, Sofia, 2011.

GLOBAL GENE EXPRESSION PROFILE OF IDENTIFIED NEUROGLIAFORM INTERNEURONS IN THE NEOCORTEX; **E. Boldog**, N. Faragó, M. Rózsa, E. Vámos, Sz. Oláh, V. Szemenyei, S. Lovas, L.G. Puskás & G. Tamás; 8th IBRO, World Congress of Neuroscience, Florence, 2011.

OPTIMIZATION OF GLOBAL GENE EXPRESSION METHOD FOR PROFILING OF 10-30 CELLS; N. Faragó, **E. Boldog**, G. Tamás & L.G. Puskás; Straub-Napok, Szeged, 2009.