

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
Természettudományi és Informatikai Tanszék

DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Diverz szinaptikus mechanizmusok az ember és rágcsáló agykéregben

Szerző:
RÓZSA Márton

Témavezető:
Prof. TAMÁS Gábor

MTA-SZTE Agykérgi Neuronhálózatok Kutatócsoport
Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék



2018
Szeged

1 Bevezetés

Az agykéreg a sejtjes szerveződés legkomplexebb struktúrája. Összetettségére bonyolult funkciói utalnak, melyek közül legfontosabbak az érzékelési és a mozgási funkciók, valamint a különböző kognitív folyamatok szervezése. Ezek az emberi fajra jellemző kognitív képességek megértése iránti vágy hajtja az agykutatókat munkájuk során, és ugyanezek a kognitív képességek teszik őket alkalmassá az ambíciózus feladatra. Bár a végső cél az emberi gondolkodás és tudat megértése, a kutatások jelenleg az egyszerűbb modellorganizmusok, mint például a rágcsálók idegrendszerének megértésére fókuszálnak. Az utóbbi évtizedek kutatásai azt mutatják, hogy az egyszerűbb idegrendszerek vizsgálata is komoly kihívásokat tartogat. A rágcsálókban végzett kutatások továbbá jó kiindulópontot jelentenek az emberi agykéreg megértését célzó kísérletek tervezésében. Doktori munkám során részt vehettem mind a rágcsáló, mind az emberi agykéreg működésének kutatásában. A rágcsáló agykéregben leírtunk egy új kommunikációs útvonalat egy GABAerg interneuron és egy glia sejt között, majd megvizsgáltunk egy sztereotíp serkentő szinaptikus kapcsolatot mind a patkány, mind az ember agykérgében, és kimutattuk, hogy milyen biofizikai mechanizmusok felelősek a köztük lévő fajspecifikus különbségekért.

Az agyban található két fő sejtípus, a neuron és a glia közül a glia sejtek fordulnak elő nagyobb számban. A glia sejtek közül is a leggyakoribbak az asztrociták, melyek az egyedfejlődés során részt vesznek az idegrendszer kialakulásának egy

fontos lépésében, a szinaptogenezisben. A szinaptogenezis időszakára jellemző, hogy az agykérgi szinapszisok száma drámai módon megnő. A szinaptogenezis lezáródásával az asztrociták is elnyerik végső anatómiai és molekuláris biológiai tulajdonságaikat és funkciójukat. A kifejlett asztrociták fő funkciói a felnőtt agykéregben az ionikus és metabolikus homeosztázis fenntartása.

Az agykéreg leginkább kutatott idegsejtjei a projekciós, serkentő piramis sejtek, melyek az agykérgi idegsejtek viszonylag homogén, döntő többségét alkotják. Bár projekciójuk és génexpressziós mintázatuk alapján elkülöníthetők, morfológiájukra jellemző a dendritjeiken található sűrű tüskézetség, a vastag, felsőbb rétegek felé irányuló apikális dendrit, a sejt alapi részén eredő bazális dendritek, valamint a fehérállomány irányába projektáló axon. Az agykéreg gátló sejtjei képezik az idegsejtek jóval diverzebb kisebbségét, melyek funkcionálisan is heterogénebbek, de minden esetben a serkentő többség működését szabályozzák. Kutatócsoportunk a humán és a rágcsáló agykéregben található gátló idegsejt altípusok felépítését és működését vizsgálja. Disszertációmban három gátló idegsejt típus szinaptikus ki- és bemeneteit vizsgáltuk.

Munkám egyik felében az agykérgi kosársejtek és axo-axonikus sejtek helyi serkentő bemeneteit vettük górcső alá. A kosársejt az agykéreg leggyakoribb gátló interneuron típusa. A kosársejt kifejezést először Ramón y Cajal használta a kisagyban lévő neuronokra, melyek axonjai a Purkinje sejtek szómáit mintegy kosarat képezve vették körül. Ez az elnevezés az agykéregben azonban heterogén sejtpopulációt jelöl, tagjait különböző neurokémiai tulajdonságok és eltérő eloszlású axonfelhő jellemzi, de közös bennük, hogy a piramissejtek szomatikus régióját idegzik be. A kosársejtekkel ellentétben az axo-axonikus sejtek egy homogén, specifikus csoportot alkotnak. Legszembetűnőbb tulajdonságuk, hogy GABAerg szinaptikus kimeneteik kizárólag a helyi serkentő piramissejtek axonjának kezdeti szakaszára

érkeznek, ami egyben az akciós potenciálok kialakulásának a helye is. Mind a kórsapsejtekre, mind az axo-axonikus sejtekre jellemző, hogy dendritjeikre kifejezetten nagy számú serkentő bemenet érkezik a környező piramissejtek felől. A legszélesebb körben alkalmazott rágcsáló-modellállatokon már több tanulmány is készült ezen kapcsolatok működéséről. Ezek a szinaptikus kapcsolatok átlagosan 1-4 mV amplitúdójúak, melyek általában egyedül nem képesek a posztszinaptikus interneuronon akciós potenciált kiváltani. Ezzel ellentétben, az emberi agykéregben ugyan ezen szinapszisok jóval hatékonyabbak: egy piramissejt egyetlen akciós potenciálja képes lehet a környező gyorsan tüzelő interneuronokat nyugalmi membránpotenciáljukról küszöb fölé depolarizálni és akciós potenciálba vinni. A hatékony serkentés hatására poliszinaptikus hálózatok aktiválódnak, amelyek a Hebb-féle hálózatok alapjául szolgálhatnak. Hogy milyen biofizikai mechanizmus állhat a fajspecifikus különbség hátterében, az máig ismeretlen.

Disszertációm másik felében az agykérgi neurogliaform sejtek szinaptikus kimenetét vizsgáltuk. Ezeket a sejteket szintén Ramon y Cajal írta le először. Alakjuk után pókháló, illetve törpe sejteknek nevezte őket, hiszen axonarborizációjuk rendkívül sűrű, nagyon vékony nyúlványokból áll, sejttestük viszonylag kicsi, kerekded. Kutatócsoportunk kimutatta, hogy ezen sejtekben keltett egyetlen akciós potenciál képes lassú gátló posztszinaptikus potenciált (IPSP) kiváltani a környező piramissejtekben. Ez a válasz lassabb lefutású más interneuronok által kiváltott IPSP-khez képest, aminek hátterében az összetett GABA_A és GABA_B receptor-mediált ionáramok állnak. A neurogliaform sejtek mindezidáig az agykérgi hálózatok lassú gátlásának egyetlen ismert képviselője. Ezek mellett egy újabb publikációnk beszámol arról, hogy e sejtek képesek nemszinaptikus, térfogati transzmisszióval aktiválni az axonfelhőjükbe eső GABA receptorok nagy részét. Egyetlen neurogliaform sejt

által felszabadított GABA képes elérni a posztszinaptikus GABA_B, a preszinaptikus GABA_B és az extraszinaptikus delta alegységet tartalmazó GABA_A receptorokat egyaránt, amelyen keresztül erőteljesen képes modulálni a kérgi hálózatok aktivitását. Tekintve a neurogliaform sejt széleskődű hatását a környező idegsejtekre, feltételezhető, hogy a térfogati transzmisszió során felszabaduló GABA eléri a környező nem-neuronális sejteket is és hatást fejt ki rajtuk, azonban ezidáig ezt még senki sem vizsgálta.

2 Célkitűzések

Disszertációmnak két egymástól független célja van. Egyrészt az agykérgi mikrohá-
lózatok jobb megértése érdekében azt vizsgáljuk, hogy patkány modellállatokban
a GABAerg térfogati transzmisszó milyen hatással van a környező asztrocitákra.
Másképpen egy sztereotíp szinaptikus kapcsolatot vizsgálunk meg mind a széles kör-
ben használt rágcsáló modellállatok agykérgében, mind pedig az emberi agykéreg-
ben. A főbb kérdéseink a következők:

1. Milyen hatása van a térfogati transzmisszióval felszabadított GABA-nak a kör-
nyező érett asztrocitákra?
2. Mi az anatómiai háttere ennek a kapcsolatnak, és milyen receptorokon / transz-
portereken keresztül valósul meg?
3. Megváltozik-e az érett asztrociták intracelluláris kalcium dinamikája a térfo-
gati transzmisszióval felszabadított GABA hatására?
4. Mely biofizikai tulajdonságok különböztetik meg az ember illetve a rágcsáló
agykérgében fellelhető piramissejt - kosársejt serkentő szinaptikus kapcsolato-
kat?

3 Anyagok és módszerek

3.1 Agyszelet készítése

Minden vizsgálat a Helsinkii Nyilatkozat értelmében és a Szegedi Tudományegyetem Etikai Bizottságának engedélyével történt. Az emberi agykérgi szeletek olyan, szubkortikális tumorban szenvedő betegek akut biopsziás szöveteiből készültek, akiknél a tumor sebészeti megközelítéshez szükségszerű volt eltávolítani a bal vagy jobb oldali frontális, parietális vagy temporális kérgi területek egy részét. A betegek (53 ± 13 év) a műtét előtt a szövetminták ilyen jellegű kutatásra való felhasználását írásban engedélyezték. A műtétek a Szegedi Tudományegyetem Idegsebészeti Klinikáján történtek. A sebészileg eltávolított szövetblokkokat a műtőben azonnal jéghideg (3°C – 6°C) magas szacharóz tartalmú mesterséges agy-gerincvelő folyadékba helyeztük. Az oldat összetétele mM-ban kifejezve a következő volt: 85 NaCl, 2,5 KCl, 1,25 NaH_2PO_4 , 25 NaHCO_3 , 0,5 CaCl_2 , 4 MgSO_4 , 25 D(+)-glükóz, 75 szacharóz, 95% O_2 -t és 5% CO_2 -t tartalmazó gázeleggyel telítve. A patkány agyszeletek készítésénél Wistar törzset használtunk (P 18–56; hím és nőstény egyaránt). Mind ember, mind patkány esetében a szövetblokkból vibráló pengéjű mikrotómmal (Microm HM 650 V) $320\ \mu\text{m}$ vastag szeleteket metszettünk. A szeleteket a metszés során használt mesterséges agy-gerincvelői folyadékba helyeztük majd 1 órán keresztül 30°C -on inkubáltuk.

3.2 Elektrofiziológia

Az elektrofiziológiai vizsgálatokhoz a szeleteket 36 °C-os elvezető kamrába helyeztük, amelyen keresztül mesterséges agy-gerincvelői folyadékot áramoltattunk. Ez a folyadék mindössze annyiban különbözött a tároláshoz használt oldattól, hogy 3 mM CaCl_2 -ot és 1,5 mM MgSO_4 -ot tartalmazott. Az elektrofiziológiai elvezetéseket whole cell patch clamp technikával végeztük piramissejt-interneuron, vagy interneuron-asztrocita párokból. A sejteket infravörös differenciál interferencia kontraszt (DIC) videomikroszkópia (Zeiss Axioskop FS mikroszkóp, Hamamatsu C2400 CCD kamera, Luigs & Neumann Infrapatch SM1 manipulátor rendszer illetve Olympus BX61WI mikroszkóp, PCO CCD kamera, Luigs & Neumann Infrapatch SM5 manipulátor rendszer) segítségével vizualizáltuk 60 μm –160 μm -re a szelet felszínétől 40 \times -es vízimmerziós objektívvel. A mikropipettákat (4 $\text{M}\Omega$ –6 $\text{M}\Omega$) alacsony kloridion tartalmú intracelluláris oldattal töltöttük meg (pH 7,25, 300 mOsm) hogy a GABAerg és glutamaterg események könnyen elkülöníthetők legyenek. Az elvezetésekhez a következő összetételű intracelluláris oldatot használtuk: 126 mM K-glükonát, 4 mM KCl, 4 mM ATP-Mg, 0,3 mM GTP- Na_2 , 10 mM HEPES, 10 mM keratin-foszfát és 8 mM biocitin. A preszinaptikus piramissejtek esetében az intracelluláris oldatba 10 mM L-glutamátot is tettünk, hogy megelőzzük a hosszú kísérlet alatt a szinaptikus transzmisszió kimerülését. Az elektrofiziológiai elvezetéseket feszültségzár üzemmódban végeztük (HEKA EPC 10 patch-clamp erősítők), a mért elektromos jeleket 8 kHz-en szűrtük, 16 kHz-en digitalizáltuk, PatchMaster szoftverek (HEKA, Lambrech/Pfalz, Németország) segítségével mértük és saját kezűleg írt MATLAB és IGOR scriptekkel analizáltuk. Szinaptikus kapcsolatok vizsgálata során a preszinaptikus sejteket rövid 2 ms–8 ms-os, 900 pA-es áraminjekcióval stimuláltuk, hogy akciós potenciált váltsunk ki bennük. A serkentő posztzinaptikus

áramok (EPSC) vizsgálata során a posztszinaptikus sejtet -70 mV membránpotenciál értéken tartottuk, a glia sejt áramai esetében pedig a glia sejt nyugalmi membránpotenciálján. Gátló posztszinaptikus potenciálokat (IPSP) is tartalmazó kapcsolat esetén a posztszinaptikus sejt membránpotenciálját -40 mV és -50 mV közötti értéken tartottuk.

3.3 Fénymikroszkópos vizsgálatok

Az elektrofiziológiai kísérleteket követően a szeleteket 12 órán keresztül fixáltuk 4% pararformaldehidet, 1,25% glutáraldehidet és 15% pikrinsavat tartalmazó 0,1 M foszfátpufferoldatban (pH: 7,4). Egy hisztológiai eljárás során az elvezetett és biocitinnel feltöltött sejteket további fény és elektronmikroszkópos vizsgálatok számára láthatóvá tettük. A piramissejtek azonosítása vastag apikális dendritjük és tüskézett apikális és bazális dendritjeik, továbbá az axonnak a szóma bazális részéről történő eredése alapján történt. Az axoaxonikus sejtek egyértelmű azonosítását a vertikális sorokban, füzérszerűen elhelyezkedő axonterminálisai tették lehetővé. Kosársejteknek tekintettük azokat az interneuronokat, melyek axonterminálisai a fénymikroszkópos megbízhatóság szintjén szinaptikus kapcsolat jelenlétét lehetővé tevő közelségbe kerültek más sejtek vagy autaptikus módon önmaguk szómájával, illetve periszomatikus régióival. A sejtek háromdimenziós rekonstrukcióját a Neulucida rendszer (MicroBrightField, Colchester, USA) és BX-60F (Olympus, Tokyo, Japan) fénymikroszkóp segítségével végeztük $100\times$ -os olajimmerziós objektívvel. Az eljárás során rekonstruáltuk a sejtek sejttestét, dendritfáját és axonját továbbá a sejtek teljes terjedelmében meghatároztuk a lehetséges szinapszisok helyét.

4 Eredmények és megbeszélés

4.1 GABAerg térfogati transzmisszió interneuronok és asztrociták között a rágcsáló agykéregben

Hipotézisünk szerint az agykérgi neurogliaform sejtek által térfogati transzmisszióval felszabadított GABA hatással lehet a nem-neuronális sejtekre is. Hogy ezt leteszteljük, whole-cell patch clamp technikával egymáshoz közel lévő (<130 μm) interneuron-asztrocita párokat vezettünk el ($n = 209$) a rágcsáló szomatoszenzoros kérgének 1. rétegében. Az összes elvezetett gliasejt az érett asztrocitákra jellemző elektrofiziológiai és anatómiai tulajdonságokat mutatta, az interneuronokat pedig anatómiai és elektrofiziológiai tulajdonságaik alapján két csoportba osztottuk: neurogliaform sejtek illetve nem neurogliaform sejtek.

Az elvezetett interneuronon percenként egyetlen akciós potenciált váltottuk ki, és megvizsgáltuk, hogy ez milyen hatást vált ki a szomszédos asztrocitán. A nem neurogliaform sejtek esetében nem láttunk hatást a glia sejten, azonban a neurogliaform sejtek egyetlen akciós potenciálja a szomszédos asztrociták 63.1%-ában ($n = 82/130$ pár) detektálható bemenő áramot generált, melynek átlagos amplitúdója 2.48 ± 1.78 pA volt. A neurogliaform sejt által kiváltott áram két fázisból állt: a gyors komponens 1.6 ms-os, illetve a lassú komponens 35 ms-os latenciával. Ezután megvizsgáltuk, hogy a neurogliaform sejtekre jellemző sűrű axonarborizáció minősége

kapcsolatban áll-e az asztrocitán mérhető szinaptikus áram tulajdonságaival. E célból háromdimenziós rekonstrukciót készítettünk hat darab funkcionálisan kapcsolt neurogliaform sejt - asztrocita párról, majd megszámláltuk az asztrocita által elfoglalt térrészen átmenő axonkollaterálisok számát. Az asztrocita által elfoglalt területen keresztülmenő axonkollaterálisok száma és az asztrocitán mérhető bemenő áram amplitúdója között szignifikáns lineáris korrelációt találtunk ($r = 0.818$, $p = 0.046$, $n = 6$).

Mivel az asztrociták köztudottan részt vesznek az extracelluláris kálium ion homeosztázis fenntartásában, extracelluláris BaCl_2 alkalmazásával, egy GIRK és KIR kálium csatorna blokkolóval vizsgáltuk az asztrocitán mérhető áram kálium komponensét. A BaCl_2 hatékonyan blokkolta a kétfázisú áram lassú komponensét, azonban a gyors komponensre nem volt specifikus hatással. Ezután a GABA_A receptorok részvételét vizsgáltuk a GABA_A receptor blokkoló gabazine-nal. A blokkoló hatására érdekes módon mind a gyors, mind a lassú komponens szignifikánsan lecsökkent. Ez az eredmény arról árulkodik, hogy az asztrocitákon mérhető bemenő áram gyors komponense részben egy GABA_A receptoron keresztüli klorid áram, a lassú komponens pedig részben a klorid transzporterek által generált kálium áram. Mivel az asztrociták egyik fő ismérve a különböző neurotranszmitter receptorok expressziója, ezután az NO711 nevű GAT1 blokkolóval vizsgáltuk tovább a kapcsolatot. A GABA transzporter blokkolásának hatására szignifikánsan lecsökkent a gyors komponens, és megnövekedett a lassú komponens. A gyors komponens lecsökkenésének hátterében a direkt módon a GABA transzporterek blokkolása áll, mivel ezek a fehérjék a GABA-t az extracelluláris térből nátrium ion kotranszport segítségével veszik fel. A lassú komponens indirekt megnövekedése mögött az áll, hogy a GAT1 transzporterek hiányában a GABA hosszabb ideig volt az extracelluláris térben, így nagyobb kálium áramokat alakított ki az asztrocitán. Ismert, hogy

a neurogliaform sejtek által felszabadított GABA hatékonyan éri el az extraszinaptikus GABA_B receptorokat. Ezeket a receptorokat a szelektív GABA_B receptor antagonistá CGP35348 extracelluláris adagolásával értük el. A GABA_B receptor antagonistá hatására a lassú komponens szelektíven lecsökkent, azonban ez a hatás az asztrocitán lehet direkt és indirekt is. Hogy ezt megvizsgáljuk, a GABA_B receptorokat intracellulárisan próbáltuk blokkolni az elvezetett asztrocitákban GDP-β-S adagolásával, azonban erre a blokkolóra az asztrocitán mérhető áram nem volt érzékeny. Ez az eredmény arra utal, hogy az aktivált GABA_B receptorok a környező neuronok membránjában találhatóak, és a rajtuk keresztüli kálium áram mérhető ki az asztrocitán.

Az utóbbi évtizedekben egyre több közlemény foglalkozik az asztrociták intracelluláris kalcium dinamikájával. Egyes publikációk szerint az asztrociták által kifejezett GABA_A receptorok aktivációja membránpotenciál depolarizációhoz, majd feszültségfüggő kalcium ion csatorna aktivációhoz vezet, mely megnöveli az intracelluláris kalcium ion koncentrációt. Más közlemények szerint a GABA_B receptorok aktivációja vezet intracelluláris kalcium hullámok kialakulásához. Hogy ezeket az eredményeket megismételjük, újra elvégeztük a páros elvezetéseinket ezzel a különbséggel, hogy az elvezető elektródán keresztül egy kalcium indikátort (OGB-1 120 μM) juttattunk az asztrocita intracelluláris terébe. Ez a módszer lehetővé tette, hogy megmérjük az intracelluláris kalcium ion koncentráció változását a funkcionálisan kapcsolt neurogliaform sejt aktiválását követően. Bár az asztrociták nyúlványain képesek voltunk detektálni spontán kalcium hullámokat, a térfogati transzmisszió során felszabadított GABA nem volt képes detektálható módon változtatni az asztrociták intracelluláris kalcium dinamikáján. Ez az eredmény arra

mutat rá, hogy a GABA_A receptorok aktiválása nem depolarizálja eléggé az asztrocitákat ahhoz, hogy a feszültségfüggő kalcium ioncsatornák aktiválódjanak, továbbá ahogy korábbi elektrofiziológiai kísérleteink rámutattak, az érett asztrociták nem expresszálnak GABA_B receptorokat membránjukon.

Az eddigi publikációkból tudhatjuk, hogy a neurogliaform sejt egyetlen akciós potenciálja alkalmával felszabaduló GABA a térfogati transzmisszió során eljut a környező neuronok szinaptikus és extraszinaptikus felszíneire is. A mi eredményeink ezt azzal egészítik ki, hogy a GABA eljut a neurogliaform sejt axonfelhőjében lévő asztrocitákhoz is, és bifázikus, több fronton végbemenő hatást fejt ki azokon. Az asztrocitán mérhető áram gyors komponense egy direkt hatás az asztrociták membránján, mely a GABA_A receptorok és a GABA transzporterek aktivációját tükrözi. Az áram lassú komponense egy indirekt GABAerg útvonal, mely a klorid ion transzporterek és a neuronális GABA_B receptorok aktivitása következtében létrejövő megnövekedett extracelluláris kálium ion koncentráció következménye. Összességében tehát a GABAerg térfogati transzmisszió során a kálium ionok a neuronokból az extracelluláris téren keresztül az asztrocitákba, míg a klorid ionok az asztrocitákból az extracelluláris térbe jutnak. Mindkét ionáram a GABAerg térfogati transzmisszió stabilitásához járul hozzá, az extracelluláris kálium és klorid homeosztázis, és így a gátló szinaptikus áramok reverz potenciáljának fenntartásával.

4.2 Gyorsan tüzelő interneuronokra érkező serkentő szinapszisok összehasonlító vizsgálata humán és patkány agykéregben

Páros whole cell patch clamp elvezetésekkel végeztünk a legszélesebb körben használt modellállat, a patkány illetve az ember agykérgéből készített túlélő agyszelet preparátumokban, hogy összehasonlítsuk a két fajban a piramis sejtekről gyorsan tüzelő interneuronokra érkező serkentő szinaptikus bemeneteket. Mindkét elvezetett idegsejtet biocytint tartalmazó intracelluláris oldattal vezettük el, mely lehetővé tette az elvezetett sejtek anatómiai azonosítását. A preszinaptikus sejtek minden esetben piramis sejtek voltak, míg a posztszinaptikus sejtek kosársejtek vagy axo-axonikus sejtek. A sejtek közötti szinaptikus kapcsolatokat fluktuációs analízissel vizsgáltuk, mely során az extracelluláris Ca^{2+} és Mg^{2+} ion koncentráció szisztematikus változtatásával módosítottuk a preszinaptikus vezikulák felszabadulási valószínűségét, így a serkentő posztszinaptikus áramok (EPSC) amplitúdóját is. A transzmissziós hibák száma rágcsálók esetében mindig magasabb volt, mint az emberi kapcsolatok esetén. A fluktuációs analízis során a különböző extracelluláris ionkoncentrációk alkalmazásánál rögzített posztszinaptikus áramok varianciáját ábrázoljuk az átlaguk függvényében, és az így kapott eredményre egy parabolát illesztünk. Az így kapott parabola függvény paraméterei becslésként szolgálnak egy-egy vezikula felszabadulása által kialakított posztszinaptikus áram nagyságára (q), egy-egy vezikulának a felszabadulási valószínűségére (Pr), valamint a funkcionális felszabadulási helyek számára (N_{FRS}). Az egy-egy vezikula által kialakított posztszinaptikus áramok nagyságában nem találtunk szignifikáns különbséget a két faj között. Azonban az emberi serkentő szinaptikus kapcsolatokat 4,4-szer több funkcionális felszabadulási hely jellemzi, mint ugyanezen szinaptikus kapcsolatokat a rágcsáló

agykéregben.

Annak eldöntésére, hogy a humán mintákban előforduló nagy amplitúdójú EPSC-k összefüggésben állnak-e a szinapszisok számával, fénymikroszkóp segítségével meghatároztuk mindkét fajban a piramis sejtek axonjai és a kosársejtek dendritjei között létesített potenciális szinaptikus kapcsolatok számát. Az emberi piramis sejtek átlagosan $3,3 \pm 1,5$ fénymikroszkóposan azonosított szinapszist létesítettek a velük szinaptikusan kapcsolt kosársejtek dendritjeire, ami nem különbözött szignifikánsan a patkány piramis sejtek esetében mért értékektől ($2,9 \pm 1,5$). A szinapszisok számának hasonlósága a két fajban arra utal, hogy az elektrofiziológiai mérésekben tapasztalt fajspecifikus különbség a szinapszisokon belül keresendő, ezért a kosársejtekre érkező serkentő bemeneteket elektronmikroszkópos technikákkal tovább vizsgáltuk.

A 20 nm vastagságú sorozatmetszetekből készített háromdimenziós rekonstrukciók alapján először a serkentő bemenetek aktív zóna területét, majd az egyes aktív zónákra eső dokkolt vezikulák számát határoztuk meg. Az aktív zónák a preszinaptikus axonterminális membránjának azon része, ahol a szinaptikus rés jellegzetesen kiszélesedik. Az eredmények mindkét faj esetén nagy szórást mutattak, azonban elmondható, hogy a humán mintákban mért aktív zónák szignifikánsan nagyobbak, mint a patkány mintákban mértek. Míg az aktív zóna területek esetében kétszeres különbséget találtunk, addig a dokkolt vezikulák számában négyszeres különbséget állapítottunk meg a két faj összehasonlításánál. A humán aktív zónákban számlált dokkolt vezikulák mennyisége $4,2 \pm 2,2$, míg a patkány esetében ez $1,3 \pm 0,8$. Az aktív zónák területe és a hozzájuk tartozó dokkolt vezikulák száma között pozitív korrelációt találtunk mindkét faj esetén.

Az elektrofiziológiai és elektronmikroszkópos vizsgálatok kiértékelése alapján elmondhatjuk, hogy fajspecifikus különbséget találtunk a serkentő preszinaptikus

bemenetekben. A különbség megmutatkozik mind a funkcionális felszabadulási helyek számában, mind az aktív zóna méretében, mind a jelátvitelben részt vevő dokkolt vezikulák számában. Az aktív zónák átlagos mérete humán mintákban kétszer nagyobb, mint a patkány mintákban mértéke. Továbbá a dokkolt vezikulák sűrűségében is kétszeres különbség látható a két faj között, így összességében szinapszisonként átlagosan négyszer több dokkolt vezikula található egy kosársejtre érkező serkentő boutonban emberben, mint ugyanez patkányban. Az aktív zóna mérete és a hozzájuk tartozó dokkolt vezikulák mennyisége pozitívan korrelálnak egymással mindkét fajban. Továbbá a humán mintákban mért boutonok térfogata is nagyobb (háromszor), mint a patkány mintákban mért serkentő axonterminálisoké. A kapott eredményekből az derült ki, hogy amíg egy patkány kosársejtre érkező serkentő szinapszisában átlagosan csak egy dokkolt vezikula vesz részt, addig a humán mintákban mért serkentő szinapszisokban a dokkolt vezikulák átlagos száma négy.

5 Társszerzői nyilatkozat

Alulírott nyilatkozom, hogy a Jelölt, mint társszerző hozzájárulása a disszertációjában taglalt elektrofiziológiai eredményekhez jelentős volt. Kijelentem, hogy ezeket az eredményeket tudományos fokozat megszerzéséhez nem használtam fel, és a jövőben sem fogom felhasználni.