

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

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke.....	2
1. Bevezetés.....	3
Az emlős agykéreg	3
Az idegsejtek általános felépítése és szinaptikus kapcsolataik	4
A neuronok csoportosítása	5
Agykérgi neuron típusok	7
A humán agykéreg	10
2. Célkitűzések	14
3. Közreműködések	15
4. Anyagok és módszerek.....	16
Agyszelet készítés	16
Elektrofiziológia.....	16
Tüzelési mintázat csoportosító analízis.....	18
Impedancia profil mérés.....	18
Két-foton kalcium imaging	19
Egysejt reverz transzkripció és digitális polimeráz láncreakció (PCR).....	19
Hisztológia	20
Sejt azonosítás és háromdimenziós fénymikroszkópos rekonstrukció	21
Immunhisztokémia	21
Elektronmikroszkópia	22
Statisztikai elemzés	23
5. Eredmények.....	24
Egy új humán agykérgi interneuron típus azonosítása.....	24
A csipkebogyó sejtek kvantitatív morfológiai jellemzése.....	26
A csipkebogyó sejtek molekuláris fenotípusának meghatározása	30
Intrinzik elektrofiziológiai tulajdonságok	33
Csipkebogyó sejtek a helyi mikrohálózatokban.....	35
6. Diskusszió.....	44
7. Összefoglaló	49
8. Summary	54
9. Köszönetnyilvánítás	58
10. Irodalomjegyzék.....	59

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AM251	1-(2,4-Diklórfenil)-5-(4-jódnfenil)-4-metil-N-1-piperidinil-1H-pirazol-3-karboxamid
CALB1	Kalbindin
CALB2	Kalretinin
CCK	Kolecisztokinin
CHAT	Kolin-acetiltranszferáz
CNR1	CB1 kannabinoid receptor
CSB	Csipkebogyó sejt
DAB	3'3-diaminobenzidin tetrahidroklorid
dPCR	Digitális polimeráz lánreakció
EPSP	Serkentő posztszinaptikus potenciál
FFT	Gyors Fourier-transzformáció
FISH	Fluoreszcens in situ hibridizáció
GABA	Gamma-amino-vajsav
GAPDH	Glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz
IPSP	Gátló posztszinaptikus potenciál
NGF	Neurogliaform sejt
NOS1	Neuronális nitrogén monoxid szintetáz
NPY	Neuropeptid Y
NR2F2	Chicken ovalbumin upstream promoter transzkripció faktor 2
PCR	Polimeráz lánreakció
PPR	Páros pulzus arány
PVALB	Parvalbumin
Q	Rezonancia mértéke
SD	Standard deviáció
SST	Szomatosztatin
TBP	TATA-Box Binding Protein
SVM	Support Vector Machine
TBS	Tris-puffer sóoldat
Z	Impedancia profil

1. BEVEZETÉS

Az emlős agykéreg

A sejtes szerveződés legösszetettebb struktúrája az emlős agykéreg, amely az agy legmagasabb rendű tevékenységét ellátó része. Az agykéreg az alapvető motoros és érző funkciók mellett számos magasabb rendű kognitív folyamatért is felel, mint amilyen a beszéd, a tudat, az asszociatív gondolkodás, a memória és az érzelmek kialakulása (Kandel és mtsai., 2013). Az agykéregben belül a magasabb rendű kognitív funkciókat a neokortex irányítja, amely az agykéreg evolúció során legkésőbb kialakult része. Az agykéreg 90%-át kitevő neokortex felépítésében is elkülönül az ősből kérgi területektől, melyeket allokortexnek nevezünk.

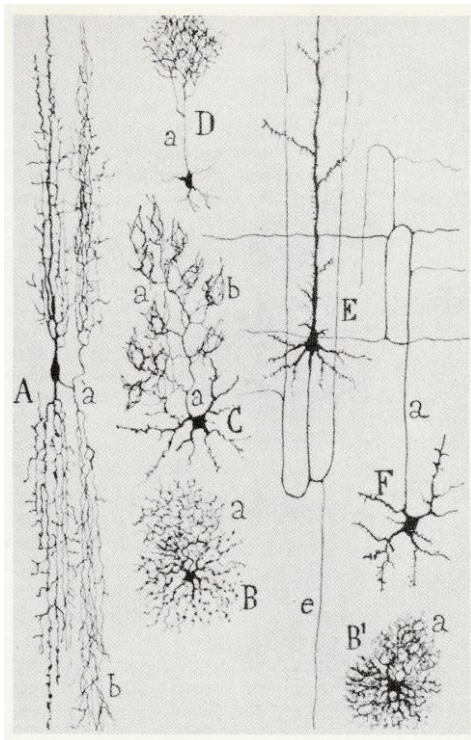
Az ember és más emlősfajok agykéregében az idegsejtek (neuronok) rétegesen szerveződnek, a neokortex területén hat, míg az ősből allokortex esetében összesen három-négy réteget alkotnak (Ramon y Cajal, 1904, 1911). Már az 1900-as évek elején kialakult az a nézet, hogy a különféle agyi funkciókért különböző agyi területek felelnek, amit olyan fejsérülést szenvedő betegek esetei alapján térképeztek fel, ahol egy adott agyterület károsodását funkcióvesztés követte (Shepherd, 2004). Ezt követően Brodmann volt az, aki megfigyelte, hogy az emlősök agykérgét felépítő idegsejtek réteges szerveződése fajspecifikus módon területi különbségeket mutat. Ez alapján Brodmann az agykérget több, mint 40 citoarchitektonikai területre osztotta fel, amelyekről a későbbiekben a legtöbb esetben kimutatták, hogy azok funkcionálisan is jól körülírható régiókat alkotnak (Brodmann K., 1909; Shepherd, 2004). A horizontális lefutású sejtrétegek mellett a neokortex sejtsínei a kéreg felszínére merőleges, vertikális irányú kérgi oszlopokba is rendeződnek. Egy kérgi oszlopon belül található neuronok a réteghatárokat átlépve szinaptikus kapcsolatok hálózatán keresztül kommunikálnak egymással, miközben a feltételezések szerint funkcionális egységként működhetnek együtt (Hubel és Wiesel, 1969; Rakic, 2008; Lui és mtsai., 2011).

Az agyunkat alkotó idegsejtek 90%-a az agykéregben található, ami 10^{10} számú neuront jelent (Braitenberg, V. és Schuz, 1991; Pakkenberg és Gundersen, 1997), melyek 10^{12} - 10^{14} számú szinapszissal kapcsolódnak egymáshoz nemtől, kortól és egészségi állapottól függően (Mountcastle V. B., 1997; Tang és mtsai., 2001). Az agykéreg a kéreg alatti területekkel szorosán együttműködve teszi lehetővé, hogy agyunk betöltse funkcióját. Az agyunkat felépítő hatalmas mennyiségű idegsejt és a köztük lévő milliárdnyi szinaptikus kapcsolat változatossága és plaszticitása biztosítja agyunk számára, hogy a külső és belső környezetből érkező,

folyamatosan változó és hatalmas mennyiségű információt feldolgozza, tárolja és arra a megfelelő választ adja.

Az idegsejtek általános felépítése és szinaptikus kapcsolataik

Az idegrendszert alkotó idegszövet fő sejtípusai a gliák és az idegsejtek. A morfológiailag és funkcionálisan erősen polarizált idegsejtek ingerfelvételre és idegi ingerületek vezetésére specializálódtak. A neurohisztológia atyjának tekintett Ramon y Cajal volt az első, aki felismerte, hogy a neuron az idegszövet morfológiailag független, funkcionális és citokémiai egysége (Ramon y Cajal, 1899), nem pedig egy folytonos, szinciciális hálózat része, ahogy azt kezdetben gondolták (Remak, 1838). Ezt követően vált széleskörűen elfogadottá, hogy valamennyi neuron morfológiailag három fő részre osztható: a sejttestre, a sejttestből eredő, változó számú dendritekre és a sejttestből vagy ritkábban dendritekből kiinduló egyetlen axonra. Az idegsejtek közötti kommunikáció, leggyakrabban szinapszisok segítségével valósul meg, amely során az ingerületeket döntően a sejttest és a dendritek fogadják, majd dolgozzák fel, az axon pedig továbbítja azokat a célsejtekhez (Kandel és mtsai., 2013).



1. ábra. Ramon y Cajal lenyűgöző idegsejt illusztrációi. Az idegtudós által azonosított különböző humán agykéregi neuron típusok.

Minden egyes agykérgi idegsejt több száz vagy akár több ezer kérgi és kérgen kívüli idegsejttel állhat közvetlen szinaptikus kapcsolatban. Egy agykérgi neuron átlagosan 5000-30000 szinaptikus bemenetet is fogadhat, azonban némely faj egyes agyterületein ez a szám akár a 60000-et is elérheti (Cragg, 1967; DeFelipe és mtsai., 2002; Binzegger és mtsai., 2004; Lübke és Feldmeyer, 2007). Az idegsejtek közötti kapcsolatokat elsőként Sherrington nevezte szinapszisoknak, és olyan idegsejtek közötti struktúráknak írta le őket, amelyeken keresztül az idegimpluzusok az egyik sejtről a másikra terjedhetnek (Sherrington, 1907). Az axon mint az idegsejtek kimeneti egysége felelős a beérkezett információ továbbításáért. A szinaptikus transzmisszió során a preszinaptikus axonterminálisok (boutonok) vezikulumaiból felszabaduló neurotranszmitter a szinaptikus résbe ürülve a posztzinaptikus sejten fejt ki hatását.

Az idegsejtek a szinapszisok másik nagy csoportjával, az elektromos szinapszisokkal is képesek egymás között kapcsolatokat teremteni. Az egymástól morfológiailag és funkcionálisan is elkülönülő kémiai és elektromos szinapszis típusok számos további alosztályba sorolhatók, amelyek együttes működése az idegsejtek közti irányított információáramlást szolgálja (Kandel és mtsai., 2013).

A neuronok csoportosítása

Cajal különböző emlős fajokban, köztük emberben tanulmányozta a kérgi hálózat felépítését és az idegsejtek finom anatómiai szerkezetét. Munkája során Camillo Golgi ezüst impregnációs technikája segítségével számos idegsejt típust nevezett el és jellemzett morfológiailag. Cajal rendszerezésének alapja a dendrit- és az axonfa alakja és elhelyezkedése volt, amely a mai napig az egyik legfőbb kiindulópont a neuronok osztályozása során. A számos vizsgálható strukturális paraméter közül minden esetben az axon morfológiája a legmeghatározóbb. Az axon arborizáció orientációja, sűrűsége, kanyarulatossága, az elágazódási szög, az axonterminálisok alakja, a boutonok mérete, elhelyezkedése mind kritikus szempontok az osztályozás során. Ugyanakkor a dendrit arborizáció polaritása, a dendritek finom struktúrája, hossza, illetve a szóma alakja és mérete is informatív lehet (Ascoli és mtsai., 2008).

A morfológia alapú osztályozás mellett a tudományos módszerek fejlődésével újabb lehetőségek is kezdtek előtérbe kerülni. A neuronok elektrofiziológiai vizsgálatai során kiderült, hogy a különböző interneuron típusok jellegzetes elektromos tulajdonságaik alapján szintén jól definiálhatók (McCormick és mtsai., 1985; Kawaguchi és Kubota, 1997; Gupta,

2000; Jiang és mtsai., 2015). Az egyes fiziológiai osztályokba az idegsejtek elsősorban eltérő tüzelési mintázataik szerint sorolhatók, amelyeket a sejtbe injektált áramimpulzus segítségével vizsgálhatunk. A tüzelési mintázatok számos paramétere közül az egyik legmarkánsabb jellemző a kiváltott akciós potenciálok frekvenciája. Az úgynevezett gyorsan tüzelő interneuronok a beinjektált áramlépcső hatására magas frekvencián, akár 200-300 Hz-en is képesek akciós potenciálokot generálni, míg más neuron csoportokban sokkal lassabb, adaptálódó frekvenciájú akciós potenciálokot lehet csak kiváltani. Az aktív membrán biofizikai jellemzők mellett a passzív membrán tulajdonságok is jellegzetesek lehetnek. Ilyen jellemző például a hiperpolarizáló áramimpulzusra adott feszültségválasz során megjelenő ún. sag potenciál, mely jellegzetes hullámformát a hiperpolarizáció aktiválta kation áram hozza létre. Az egyes interneuron csoportok karakterisztikus elektrofiziológiai tulajdonságai háttérben a csoportokra specifikusan jellemző, egyedi összetételű membrán ioncsatorna kompozíció áll.

Az egymással jól korreláló morfológiai és elektrofiziológiai osztályok között jelentős molekuláris különbségek is megfigyelhetők (Kawaguchi és Kubota, 1997, 1998; Cauli és mtsai., 2000; Markram és mtsai., 2004). A neuronok morfológiai, fiziológiai és funkcionális tulajdonságait meghatározó marker molekulák lehetnek strukturális proteinek, ioncsatornák, membrántranszporterek, transzkripciós faktorok, receptorok, neuropeptidok, Ca^{2+} -kötő fehérjék, neurotranszmitterek vagy az azokat szintetizáló enzimek. Ezen molekulák fehérjeszintű kimutatása immunhisztokémiai módszerekkel történik. Az immunhisztokémia során immunológiai módszerekkel (antigén-antitest kötés alkalmazásával) specifikus szöveti antigéneket mutatnak ki. Az antigének kimutatása *in situ* történik, azaz megtartott szöveti környezetben belül vizsgálható egy adott antigén jelenléte.

Napjainkban a neuronok csoportosításának leggyorsabban fejlődő területe azonban a molekuláris markerek egy másik szinten történő vizsgálata. A fehérje szintű feltérképezés mellett a molekuláris biológiai módszerek fejlődésével egyre inkább előtérbe kerül a marker molekulák génexpressziós szintű feltérképezése (Zeisel és mtsai., 2015; Lake és mtsai., 2016; Tasic és mtsai., 2016, 2018). Az egysejt RNS szekvenáláson alapuló technika segítségével egyedi idegsejtek teljes molekuláris profilja meghatározható, majd ezt követően az egyes sejtek csoportokba rendezhetők. A módszer egyik nagy előnye, hogy egy agyterületen belül akár több ezer sejt is vizsgálható, így egészen pontos képet alkothatunk az ott található idegsejt csoportok számáról, molekuláris profiljáról, az egészen ritka sejtípusokat is beleértve. Néhány éve kutatócsoportunk közreműködésével kidolgozásra került technika segítségével pedig még pontosabb információt kaphatunk az egyedi idegsejtekben vizsgált gének mRNS szintű kifejeződéséről (Faragó és mtsai., 2013). A neuronok whole-cell patch-clamp elektrofiziológiai

elvezetését követően a sejtek citoplazmájából digitális polimeráz láncreakció (dPCR) segítségével az expresszált mRNS-ek precíz kópia száma határozható meg. Ily módon az egyedileg vizsgált idegsejtekről egyidejűleg nyerhető elektrofiziológiai, anatómiai és nagy pontosságú molekuláris információ.

A lassan évszázados múltra visszatekintő neuron osztályozás kérdésköre napjainkig intenzíven kutatott terület. Az egymással jól átfedő morfológiai, fiziológiai és molekuláris csoportok funkcionálisan is vizsgálható, jól elkülöníthető osztályokat alkotnak (Kawaguchi és Kubota, 1997; Markram és mtsai., 2004). 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 (DeFelipe és mtsai., 2013; Markram és mtsai., 2015; Tasic és mtsai., 2016; Tremblay és mtsai., 2016).

Agykérgi neuron típusok

Az agykéreg rendkívül bonyolult finoman összehangolt rendszerét számos változatos morfológiájú és funkciójú idegsejt hálózata építi fel. A kérgi idegsejtek két fő csoportját különböztetjük meg: a serkentő, glutaminsavat felszabadító piramissejteket (McCormick és mtsai., 1985; DeFelipe és Fariñas, 1992) és a túlnyomó többségében gátló, gamma-aminovajsavat (GABA) felszabadító interneuronokat (Jones és Peters, 1984).

A kéreg principális sejtjei a piramissejtek, amelyek az itt található idegsejtek 75-85%-át teszik ki és a sejtsejtszegény első réteg kivételével a kéreg valamennyi rétegében megtalálhatóak. Ugyan rétegenként mutatnak eltérő specifikus morfológiai jegyeket, azonban felépítésük alapján véve megegyezik. Sejttestük rendszerint piramis alakú, amelynek három csúcsáról tüskézett dendritfájuk, bazális oldaláról pedig axonjuk ered. Apikális dendritjük az agykéreg felszíne felé, arra merőlegesen irányul és a terminális régióban sűrűbb elágazódásokat képez, míg bazális dendritjeik a sejttest alapi részéről erednek és többnyire a sejttestet is tartalmazó rétegen belül maradnak. Az axon fő ága a kéreg alatt elhelyezkedő fehérállomány felé veszi útját, oldalágakat adva a sejttest környezetében lévő kérgi régióba is (DeFelipe és Fariñas, 1992). Posztszinaptikus célsejtjeiken a piramissejtek serkentő posztszinaptikus potenciált (EPSP) képesek kiváltani preszinaptikus terminálisaikból felszabaduló glutamát útján. Serkentő természetükből adódóan a piramissejtek feladata, hogy biztosítsák a jel terjedését az információfeldolgozás különböző állomásain. Az egyes rétegek piramissejtjei eltérő kérgi és kéreg alatti területekről fogadnak szinaptikus bemeneteket, illetve ezekre a területekre küldik

saját kimeneteiket is, ezáltal a kérgi információ feldolgozás különböző fázisaiban vesznek részt (Binzegger és mtsai., 2004).

A GABA-t felszabadító (GABAerg) interneuronok annak ellenére, hogy a kérgi idegsejtállomány mindössze 10-15%-át teszik ki, igen heterogén csoportot alkotnak. Az interneuronok axonja jellemzően ugyanazon a kérgi területen belül szinaptizál, amelyben a sejttest és a dendrit is találhatóak. Dendrit és axon arborizációjukat tekintve azonban nagyfokú morfológiai diverzitást mutatnak (Ramon y Cajal, 1911; Freund és Buzsáki, 1996; Somogyi és mtsai., 1998). Jellegzetes axon morfológiájuk határozza meg, hogy az egyes célsejteknek mely szubcelluláris alegységét célozzák meg. Eszerint léteznek axo-szomatikus interneuronok, amelyek a posztszinaptikus sejtek szómáját, axo-dendritikus neuronok, melyek a dendritjeit, dendrittüskéit és axo-axonikus sejtek, melyek pedig az axon kezdeti szakaszát idegzik be (Buhl és mtsai., 1994; Somogyi és mtsai., 1998; Tamás és mtsai., 1998). A GABAerg interneuronok hatással lehetnek posztszinaptikus sejtjeik akciós potenciáljainak keletkezésére, időzítésére és dendritikus visszaterjedésére (Tamás és mtsai., 2004), ezáltal szerepet játszanak a populációs aktivitás sejtszintű szinkronizálásában (Cobb és mtsai., 1995). Azzal, hogy a piramissejtek eltérő szubcelluláris alegységét idegzik be, felosztják egymás között a piramissejtekben történő szinaptikus integrációs folyamatok egyes fázisainak szabályozását. A különböző osztályokba tartozó interneuronokra eltérő dinamikájú serkentő bemenetek érkeznek, amelynek következtében a preszinaptikus aktivitás különböző aspektusainak detektálására lehetnek alkalmasak (Pouille és Scanziani, 2004) és a kérgi információfeldolgozás eltérő fázisaiban vehetnek részt (Klausberger és mtsai., 2003; Somogyi és Klausberger, 2005).

A kosársejtek, amelyeket Ramon y Cajal találóan nevezett el, axonterminálisaikkal szinte kosárszerűen fonják körül a piramissejtek sejttestét és proximális dendritjeit. Sima, tüskézetlen dendritjeik jellemzően multipolárisak. A GABAerg neuronok 50%-át alkotják, azonban a csoporton belül további altípusokat különböztethetünk meg az axonfelhők eloszlása, és az expresszált fehérjék alapján. Molekuláris jellemzőiket tekintve az egyes alcsoportok jellemzően parvalbumint (PVALB) vagy kolecisztoxinint (CCK) expresszálnak (Freund és Buzsáki, 1996). Közös fiziológiai jellemzőjük a gyorsan tüzelő aktivitás, amellyel posztszinaptikus sejtjeiken a GABA_A receptorok aktiválásán keresztül gyors, nagy amplitúdójú gátló posztszinaptikus potenciált (IPSP) képesek kiváltani (Somogyi és mtsai., 1983; Kisvárdy és mtsai., 1993; Buhl és mtsai., 1994). Gyors membrán időállandójuknak köszönhetően a rájuk érkező serkentő bemenetek gyorsan és viszonylag nagy precizitással kelhetnek akciós potenciált bennük (Fricker és Miles, 2000; Galarreta és Hestrin, 2001). Egymással kölcsönös elektromos és kémiai szinapszisokat alkotva, a kosársejtek hatékonyan szinkronizálják egymás

és posztszinaptikus sejtjeik működését (Galarreta és Hestrin, 1999, 2001; Tamás és mtsai., 2004), valamint szerepet játszanak a gamma frekvenciájú hálózati oszcillációk kialakításában (Cardin és mtsai., 2009; Sohal és mtsai., 2009).

Az axo-axonikus sejtek egyedülálló módon a piramissejteken az akciós potenciál keletkezésének helyét, az axon iniciális szegmentumot idegzik be (Somogyi, 1977). Ennek a különleges pozíciónak köszönhetően a kérgi GABAerg sejtek közül egyedülként képesek posztszinaptikus sejtjeik serkentésére (Szabadics és mtsai., 2006). Egyetlen axo-axonikus sejt mintegy 300 piramissejthez küldi axonterminálisait (Somogyi, 1977; Somogyi és mtsai., 1982), amelynek következtében a kéregre merőleges piramissejt axon iniciálisok mellett haladó axo-axonikus terminálisok sokágú gyertyatartóra emlékeztetnek. Innen ered ezen sejtek Szentágothai János által adott elnevezése, a kandeláber sejt (Szentágothai és Arbib, 1974). Az axo-axonikus sejtek gyorsan tüzelő aktivitást és parvalbumin immunpozitivitást mutatnak (Buhl és mtsai., 1994; DeFelipe, 1999; Tamás és Szabadics, 2004). Jellemzően ritkán tüzelnek *in vivo* (Zhu, 2004), azonban ez az agyi ritmusok jól meghatározott idejéhez köthető (Klausberger és mtsai., 2003).

Az axo-dendritikus neuronok között az eltérő morfológiai, fiziológiai és molekuláris jellemzők alapján több interneuron típust is megkülönböztetünk (Kawaguchi és Kubota, 1998). A dendritcélzó neuronok nagy része, köztük a Martinotti sejtek is a posztszinaptikus neuronok dendrittörzséhez küldik axonterminálisait, azonban vannak olyan interneuronok, amelyek többnyire a dendrittüskéken szinaptizálnak, ilyenek a kettős csokor sejtek (Tamás és mtsai., 1997). Az agykérgi dendritcélzó neuronok fontos szerepet játszanak a dendritikus gátlás kialakításában, ezáltal a disztális dendritszakaszok szinaptikus integrációs folyamatainak szabályozásában (Silberberg és Markram, 2007; Murayama és mtsai., 2009). Ennek következtében pedig képesek befolyásolni posztszinaptikus sejtjeik szomatikus akciós potenciáljainak időzítését (Szabadics és mtsai., 2001; Tamás és mtsai., 2004).

A neurogliaform sejteket szintén Ramon y Cajal írta le először, pókháló sejteknek nevezve őket a rendkívül sűrű, nagyon vékony ágakból álló axon arborizációjuk után (Ramon y Cajal, 1911). Különösen sűrű axonfelhőjükben a preszinaptikus bouton sűrűség a legmagasabb az interneuronok között (Oláh és mtsai., 2009). A kérgi interneurok megközelítőleg 20%-át alkotó neurogliaform sejtek szómája kerekded, viszonylag kisméretű, amelyből igen sok rövidebb dendrit ered (Wozny és Williams, 2011; Schuman és mtsai., 2019). Molekuláris jellemzőit tekintve α -aktinin-2, neuropeptid y (NPY), reelin, 5-HT_{3A} receptor és nitrogén-monoxid szintáz (NOS1) immunpozitivitást mutatnak (Uematsu és mtsai., 2008; Karagiannis és mtsai., 2009; Rudy és mtsai., 2011; De Marco García és mtsai., 2015; Schuman

és mtsai., 2019). Kutatócsoportunk mutatta ki, hogy a neurogliaform sejtek mindeddig az agykérgi hálózatok lassú gátlásának egyetlen ismert forrása. A neurogliaform sejtekben keltett egyetlen akciós potenciál képes lassú gátló posztszinaptikus potenciált kiváltani a posztszinaptikus sejtekben, aminek háttérében az összetett GABA_A és GABA_B receptor-mediált ionáramok állnak (Tamas, 2003). Mindemellett egy újabb kutatásunk beszámolt arról, hogy az agykéregben a neurogliaform sejt az első olyan ismert sejtípus, amely képes nemszinaptikus, térfogati transzmisszióval kommunikálni posztszinaptikus sejtjeivel (Oláh és mtsai., 2009). Ezen egyedülálló tulajdonságok teszik lehetővé a neurogliaform sejtek számára, hogy más interneuronokhoz képest hosszabb ideig aktiválhassák az axonfelhőjükbe eső GABA receptorok jó részét, amelynek következtében erőteljesen képesek modulálni a kérgi hálózatok aktivitását.

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 humán agykéreg

A szárazföldi állatok között a főemlősök rendelkeznek a legnagyobb aggyal, az emberi agy pedig még a főemlősökön belül is a legnagyobb méretű a testtömegükhöz viszonyítva (Herculano-Houzel, 2009; DeFelipe, 2011). A tekervényezett agyfelszín a magasabb rendű emlősöknél jelent meg, így például a legtöbb rágcsáló fajnál nem figyelhető meg. A patkányok agykérge a makakóééhoz képest százszor, az emberéhez képest, pedig ezerszer kisebb méretű (Uylings és van Eden, 1991). Ennek háttérében elsősorban az evolúció során megnövekedett asszociációs és prefrontális területek relatív súlya áll, amelyek az agykérgi magasabb rendű kognitív funkciók működésében játszanak szerepet (Shepherd, 2004). A humán és nem humán fajok kognitív képességei között tapasztalt különbségeket leginkább az emberi neokortex, azon belül is főként a prefrontális kéreg fejlettségének, egyediségének tulajdoníthatjuk. A homloklebenyen belül található prefrontális kéreg az érzelmi folyamatok szabályozása mellett alapvető szerepet játszik a személyiség kialakításában, illetve olyan magas rendű kognitív tevékenységekben, mint a döntéshozás vagy új ötletek, gondolatok kialakítása (Quirk és Beer, 2006).

A magasabb rendű kognitív funkciók kivitelezéséhez a neokortikális hálózat összetett működésére van szükség. Az agykéreg felépítésére vonatkozó különbségek a humán és nem humán fajok között nemcsak az eltérő funkciójú területek relatív súlyában mutatkoznak meg, hanem az agykérget alkotó neuronok sűrűségében és a köztük lévő kapcsolatok számában is megfigyelhetők. Az emberi agykéreg egységnyi térfogatában kevesebb idegsejt található, mint az alacsonyabb rendű emlős fajokéban, azonban az egy idegsejtre érkező átlagos szinapszisszám különösen a kognitív funkciókban szerepet játszó területeken a legmagasabb más emlős fajokhoz viszonyítva (Cragg, 1967; DeFelipe és mtsai., 2002; Elston, 2003). Ugyanakkor a humán szinapszisok nem csak számukban, de működésükben is különbözhetnek az alacsonyabb rendű emlősökhöz képest. Kutatócsoportunk jelentős különbségeket talált a humán és rágcsáló agykéreg serkentő glutamáterg szinapszisainak hatékonyságában (Molnár és mtsai., 2008). Rágcsálókban az agykérgi glutamáterg piramis sejtek átlagosan 1-4 mV amplitúdójú szinaptikus kapcsolatokon keresztül serkentik a helyi interneuronokat (Ali és mtsai., 1998; Holmgren és mtsai., 2003; Brecht, 2012). Egy ilyen nagyságú szinaptikus kapcsolat önmagában fiziológiás körülmények között a legtöbb esetben csak küszöb alatti depolarizációt eredményez, következésképp akciós potenciált nem képes kiváltani a poszt-szinaptikus interneuronokban. Azonban ugyanezen szinapszisok a humán agykéregben jóval hatékonyabbak is lehetnek: egy piramis sejt egyetlen akciós potenciálja képes lehet a poszt-szinaptikus gyorsan tüzelő interneuronokat nyugalmi membránpotenciáljukról küszöb fölé depolarizálni és akciós potenciálba vinni (Molnár és mtsai., 2008). A rendkívül hatékony serkentés következtében a humán agykéregben poliszinaptikus hálózatok aktiválódnak, amelyek a Hebb-féle hálózatok alapjául szolgálhatnak (Hebb, 1949; Molnár és mtsai., 2008). A megfigyelt jelenség anatómiai háttéréről kutatócsoportunk egy újabb tanulmányban számolt be (Molnár és mtsai., 2016). Az emberi agykéreg nagyhatékonyságú szinaptikus serkentéséért a periszinaptikus axonterminálisokban található nagyobb számú dokkolt, azaz felszabadulásra váró vezikula a felelős. A rágcsálókhoz képest ugyanis az emberi agykéregben kétszer akkora mind a vezikulák sűrűsége, mind a preszinaptikus aktív zónák területe.

A már ismert és a legtöbb vizsgált fajban megtalálható neuron típusok fajok közti összehasonlítása is régebb óta tanulmányozott terület. Ezek az evolúciósan konzervált neuron csoportok a legtöbb esetben főbb anatómiai és elektrofiziológiai jellegzetességeikben megegyeznek, így különböző fajokban is jól beazonosíthatóak. A hasonlóságok mellett azonban a különböző neuron csoportok számos kisebb fajspecifikus tulajdonságot is mutathatnak (Ascoli és mtsai., 2008). A legtöbb ilyen összehasonlítás rágcsáló, majom és humán agykérgi neuron típusok között született. Egyes interneuronok, mint például a

neurogliaform sejtek a rágcsálókhoz képest a főemlősökben nagyobb sejttesttel, több dendrittel és még kompaktabb axonfelhővel rendelkeznek. A humán agykéreg 3. rétegi piramissejtjeinek nemcsak mérete, hanem dendrittüskéinek sűrűsége és felülete is nagyobb az egérben leírt értékekhez hasonlítva (DeFelipe, 2011). Mindemellett a humán agykéreg 2-3. rétegi piramissejtjeinek dendritjei sűrűbben ágaznak el és hosszuk háromszorosa az egérben és makákóban mért értékekhez képest, aminek nagy valószínűséggel szerepe lehet a sejtre érkező bemenetek hatékonyabb feldolgozásában (Mohan és mtsai., 2015). Egy újabb kutatás eredményei kimutatták, hogy az emberi intelligencia szint egyenesen arányos a temporális kéreg vastagságával és az itt megtalálható piramissejtek dendrit komplexitásával (Goriounova és mtsai., 2018). Ugyanakkor összefüggést találtak a magasabb intelligencia hányados (IQ) és a vizsgált piramissejtek akciós potenciál kinetikája között is.

A jelentős szubcelluláris különbségek mellett egyre több kutatási eredmény bizonyítja, hogy az ember és rágcsálók agykérgét felépítő neuronális hálózatok celluláris szinten is különböznek egymástól. A humán agy evolúciója szempontjából nagy jelentőséget tulajdonítanak a Von Economo és fork, azaz villa projekciós neuronoknak, amelyeket az agykérgen belül a cinguláris kéregben és az insula területén írtak le (Economo és Koskinas, 1925; Allman és mtsai., 2005; Butti és mtsai., 2009; Hakeem és mtsai., 2009; Evrard és mtsai., 2012). Ezeket a sejteket az ember mellett csak olyan nagyméretű aggyal és összetett szociális kapcsolatokkal rendelkező emlősöknél találták meg, mint például a nagy emberszabású majmok, az elefántok és a cetfélék (Butti és mtsai., 2009; Hakeem és mtsai., 2009; Evrard és mtsai., 2012), azonban ezekben a fajokban számuk nagyságrendekkel alacsonyabb az emberben leírt sűrűséghez képest. Mindemellett neuropatológiai vizsgálatok is megerősítik, hogy ezen két sejtípusnak alapvető szerepük lehet olyan magasabb rendű kognitív funkciók kialakításában, mint az öntudat és a szociális viselkedés. A projekciós neuronok mellett az agykérgi interneuronok között is írtak már le olyan sejtípust, amelyet rágcsálókban nem, csak főemlősökben sikerült kimutatni. Egy 2015-ben megjelent tanulmányban olyan humán agykérgi gátló interneuron csoportról számoltak be, amelyben már egyetlen kiváltott akciós potenciál is folyamatos tüzelést eredményezett (Wang és mtsai., 2015). A vertikális dendrit és axon morfológiával rendelkező neuronok az összes kérgi interneuron 9%-át teszik ki, így viszonylag magas arányuk miatt feltételezhető, hogy fontos szerepet tölthetnek be a magasabb rendű kérgi funkciókban.

A molekuláris technikák gyors fejlődésének köszönhetően évről évre egyre több olyan tanulmány jelenik meg, ahol egysejt RNS szekvenálás segítségével határozzák meg egy adott agykérgi terület sejtípusainak számát, összetételét (Zeisel és mtsai., 2015; Lake és mtsai., 2016;

Tasic és mtsai., 2016, 2018). A több ezer sejt molekuláris profilját meghatározó, rendszerező és csoportosító tanulmányokat rágcsálók mellett (Zeisel és mtsai., 2015; Tasic és mtsai., 2016, 2018), már humán agykéregben is sikerült megismételni (Lake és mtsai., 2016; Hodge és mtsai., 2019). Az eredmények itt is jelentős különbségeket tártak fel a rágcsáló és humán agykéreg sejtszintű felépítésében.

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. Jóllehet számos korai anatómiai megfigyelést humán agykérgen végeztek, azonban az agykérgi sejhálózatok felépítésére és működésére vonatkozó pontosabb ismereteink túlnyomórészt rágcsálókon, macskán és főemlősökön végzett kísérletekből származnak. A mai napig az emberi agy működésének tanulmányozásához leggyakrabban használt módszerek, mint az EEG (elektroencefalográfia), MEG (magnetoencefalográfia) és az MRI (mágnesesrezonancia-képzéskészítés) nem képesek a sejtszintű 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 (Mohan és mtsai., 2015). Mindezek következtében a mai napig is csak nagyon csekély információ áll rendelkezésünkre a humán agykérget alkotó egyedi idegsejtek és a köztük lévő idegsejt 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.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Az emberi agyműködés megértésének egyik alapvető mérföldköve az agykérgi idegsejt típusok és a köztük lévő hálózati kapcsolatok feltérképezése. 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.

3. KÖZREMŰKÖDÉSEK

Az emberi agyszövet műtéti eltávolítását Dr. Barzó Pál végezte.

A morfológiai és immunhisztokémiai vizsgálatokat Dr. Tamás Gábor és én terveztük. A hisztológiai munkát én, Mezei Leona és Tóth Éva végeztük. A sejtek részletes fénymikroszkópos morfológiai vizsgálatát és csoportosítását én végeztem.

A háromdimenziós fénymikroszkópos rekonstrukciókat én és Ábrahám-Tóth Nelli készítettük. A rekonstrukciókból származó kvantitatív morfológiai adatokat én értékeltem ki.

Az elektronmikroszkópos sorozatmetszeteket Dr. Baka Judith és én készítettük. Az elektronmikroszkópos tomogramok készítését és kiértékelését Dr. Baka Judith végezte.

Az immunhisztokémiai festések kivitelezését és kiértékelését én végeztem.

A dPCR kísérletek tervezését Dr. Tamás Gábor, Dr. Kocsis Ágnes Katalin és Dr. Faragó Nóra, majd kivitelezését Dr. Kocsis Ágnes Katalin és Dr. Faragó Nóra végezték.

Az elektrofiziológiai kísérletek tervezését és kivitelezését Dr. Tamás Gábor, Dr. Molnár Gábor, Dr. Rózsa Márton, Oláh Gáspár, Dr. Ozsvár Attila és Kovács Balázs végezték. Az elektrofiziológiai adatok kiértékelését én és a kísérleteket kivitelező munkatársak végeztük. Az impedancia profil méréseket Oláh Gáspár végezte és értékelte ki. Az SVM-alapú tüzelési mintázat csoportosító analízist Bordé Sándor dolgozta ki, amelynek hatékonyságát közösen optimalizáltunk. Az algoritmus segítségével a további elemzéseket én végeztem.

4. ANYAGOK ÉS 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, nők: n=18, férfiak: n=14, kor: 47 ± 16 év) akut biopsziás szöveteiből készültek, akiknél egy szubkortikális tumor (n=25) vagy aneurizma (n=7) sebészeti megközelítéshez szükséges volt eltávolítani a bal vagy jobb oldali frontális (n=16), parietális (n=10) vagy temporális (n=6) kérgi területek egy részét. A betegek a műtét előtt a szövetminták ilyen jellegű kutatásra való felhasználását írásban engedélyezték. A műtétek a Szegedi Tudományegyetem Idegsebészeti Klinikáján történtek. Az altatás midazolam (0,03 mg/kg) és fentanil (1-2 μ g/kg) intravénás adásával, valamint intravénás bolusban adott propofollal (1-2 mg/kg) történt. Az endotracheális intubáció könnyítésére a páciensek rocuronimot (0,5 mg/kg) kaptak. Az intubáció 120 másodperccel ezt követően történt és a páciens O_2 és N_2O 1:2 arányú elegyével lélegeztették. Az altatás megfelelő szinten tartása szevofluránnal történt. A sebészileg eltávolított szövetblokkokat a műtőben azonnal jéghideg (3-8°C) magas szacharóz tartalmú mesterséges agy-gerincvelői folyadékba helyeztük (85 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1,25 mM NaH_2PO_4 , 25 mM $NaHCO_3$, 0,5 mM $CaCl_2$, 4 mM $MgSO_4$, 25 mM d(+)-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 (Microm HM 650 V) az agyfelszínre merőlegesen 350 μ 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 mM KCl, 1 mM NaH_2PO_4 , 24 mM $NaHCO_3$, 1 mM $CaCl_2$, 3 mM $MgSO_4$, 10 mM d(+)-glükóz, 95% O_2 -t és 5% CO_2 -t tartalmazó gázeleggyel telítve). Újabb 30 perc után a hőmérsékletet lecsökkentettük 16°C-ra. A szeleteket további felhasználásukig ebben az oldatban tároltuk.

Elektrofiziológia

Az elektrofiziológiai vizsgálatokhoz a szeleteket 36°C-os elvezető kamrába helyeztük, amelyen keresztül mesterséges agy-gerincvelői folyadékot, elvezető oldatot áramoltattunk 2-3 ml/perc sebességgel. Az elvezető oldat annyiban különbözött a tároláshoz használt oldattól,

hogy az 3 mM CaCl_2 -t és 1,5 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 (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 60-130 μm -re a szelet felszínétől 40x-es vízimmerziós objektívvel. A piramissejtekből történő elvezetéshez háromszög/piramis alakú sejteket kerestünk, melyek vastag apikális dendritje jól kivehető volt a szeletben. Interneuronok célzott keresésekor az előbbiektől különböző, főként kisebb kerek, hosszúkás sejteket kerestünk, melyeknél nem volt apikális dendrit jelenlétére utaló jel.

A mikropipettákat (5-7 M Ω) alacsony kloridion tartalmú intracelluláris oldattal (pH 7,25, 300 mOsm) töltöttük meg, hogy a GABAerg és glutamaterg események könnyen elkülöníthetőek 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. Az elektrofiziológiai elvezetéseket Patchmaster (HEKA) szoftver segítségével áramzár üzemmódban végeztük (HEKA EPC 9/2, HEKA EPC 10 patch-clamp erősítők). A mért elektromos jeleket 8 kHz-en szűrtük, 16 kHz-en digitalizáltuk, majd Fitmaster (HEKA) és Origin 7.5 (OriginLab) szoftverek segítségével elemeztük.

A sejtek passzív elektromos tulajdonságait és tüzelési mintázatukat a bevett gyakorlat szerint 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 kapcsolatok rövid távú szinaptikus plaszticitásának jellemzésre a legtöbb esetben páros pulzus protokollt alkalmaztunk, melynek során a preszinaptikus sejtben 7-15 másodpercenként két akciós potenciált váltottunk ki egymástól 60 ms távolságra. EPSP-k vizsgálata során a posztszinaptikus sejtet nyugalmi membránpotenciál értéken tartottuk. IPSP-ket is tartalmazó kapcsolat esetén a posztszinaptikus sejt membránpotenciálját -40 mV és -50 mV közötti értéken tartottuk. A monoszinaptikus EPSP-k és IPSP-k amplitúdóját a posztszinaptikus válasz maximuma és az áraminjekció előtt mért membránpotenciál érték különbségével adtuk meg. A páros pulzus arány (PPR) a páros pulzus protokoll során kiváltott második (EPSP2) és első EPSP amplitúdók (EPSP1) átlagainak a hányadosa: $\text{PPR} = \text{EPSP2} / \text{EPSP1}$.

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 μM gabazin, 5 μM 1-(2,4-Dichlorophenyl)-5-(4-iodophenyl)-4-methyl-N-1-piperidinyl-1H-pyrazole-3-carboxamide (AM251) (Sigma-Aldrich). A farmakonokat közvetlenül a kísérletek előtt készítettük el. Az AM251-et 0,0002% végkoncentrációjú dimetil-szulfoxiddal (DMSO) vittük vizes oldatba. A farmakonokat tartalmazó elvezető oldatot 10-15 percig áramoltattuk az elvezető kamrán át a kísérletek során, hatásuk kiértékelése pedig az 5. perc utáni időszakra korlátozódott.

Az egyes kísérletekre vonatkozó adatokat 20-100 mérés értékének az átlagával és szórásával (SD) határoztuk meg.

Tüzelési mintázat csoportosító analízis

Az analízis első lépéséhez 2 anatómiailag azonosított neuron csoportot, a csipkebogyó (n=55) és nem-csipkebogyó sejtek (n=52) csoportját használtuk. A sejteket az axon arborizációk fénymikroszkópos vizsgálata alapján különítettük el, ami során a nem-csipkebogyó csoportba az összes olyan első rétegi interneuront soroltuk, amelyek egyértelműen nem csipkebogyó sejt morfológiával rendelkeztek. Az összes kiválasztott neuron tüzelési mintázatán 200 elektrofiziológiai paraméter került lemérésre. Ezt követően 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 csipkebogyó és nem-csipkebogyó sejtek csoportja. A kiválasztott két paraméter a maximális interspike-intervallum szórás és a hiperpolarizáció által kiváltott sag amplitúdó értékek lettek. A maximális interspike-intervallum szórás értékeknél azokat a 20 pA-enként növekvő depolarizáló áramlépcsőkre adott sejtválaszokat vettük figyelembe, ahol a sejtől minimum 5 akciós potenciált sikerült kiváltani. Ezt követően az akciós potenciálok csúcsai közt eltelt időnek vettük a szórását, majd egy sejt növekvő depolarizáló áramlépcsőkre adott válaszai közül, azt vettük figyelembe, ahol a legnagyobb volt az akciós potenciálok közti szórás értéke. A sag értékeket a legelső hiperpolarizáló áramlépcsőnél (-100 pA) mértük, a maximális feszültség változás és a steady state potenciál hányadosaként.

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 (HEKA) szoftverrel generáltunk. A stimuláló áram erősségét úgy állítottuk be, hogy a sejteknek csak a küszöbpotenciál alatti válaszait mérjük. Regisztrációink során az ingerlő áram hullám amplitúdója így 40-100 pA közé esett nyugalmi membránpotenciálról indítva. Az egyes sejtek impedancia profilját (Z) minden egyes mérésnél meghatároztuk a feszültség válaszok gyors Fourier-transzformációjának (FFT) és a hozzátartozó parancsáram FFT komponensének hányadosaként. A kapott impedancia profilokat a 200 Hz-en mért ellenállás értékre normalizáltuk. Az elvezetett sejtek anatómiai azonosítását követően a kapott adatokat a következő három csoportba soroltuk: csipkebogyó sejtek, neurogliaform sejtek és az előző két csoportba anatómiailag nem besorolható „besorolatlan interneuronok” csoportjába. Az átlagos impedancia értékeket a stimuláló áram frekvenciájának függvényében ábrázoltuk. 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 (Molecular Probes) fluoreszcens festékkel, a poszt-szinaptikus piramissejteket pedig 100 μM Oregon Green 488 BAPTA-1 (Molecular Probes) kalcium indikátorral jelöltük, hogy detektálhatóvá tegyük a piramissejt 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 (Laser Quantum, UK) ellátott FemtoRose 100 TUN (R&D Ultrafast Lasers, Hungary) titán-zafir lézer szolgáltatta, ami 80 MHz-en 820 nm hullámhosszon 100 fs pulzust bocsátott ki.

Egysejt reverz transzkripció és digitális polimeráz lánreakció (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™ (Avidin Kft.) 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 elindításáig, amit két lépésben kiviteleztünk. Az első lépés során 5 percen keresztül 65°C-on inkubáltuk a mintákat a következőket tartalmazó oldatban: 4 µl SingleCellProtect (Avidin Kft.), 0,45 µl TaqMan próba (Thermo Fisher), 0,45 µl 10 mM dNTPs (Thermo Fisher), 1,5 µl 5X first-strand puffer, 0,45 µl 0,1 mol/L DTT, 0,45 µl RNase inhibitor (Thermo Fisher) és 100 U reverz transzkriptáz (Superscript III, Thermo Fisher). A reverz transzkripció második lépéseként 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 (Thermo Fisher), OpenArray Digital PCR Master Mix-et (Thermo Fisher) és nukleázmentes vizet tartalmazó oldatot egy 256 lyukú OpenArray lemezre vittük fel. A minták feldolgozása és az adatok kiértékelése kutatócsoportunk egy korábbi publikációjában leírtak szerint történt (Faragó és mtsai., 2013). Az amplifikáció során a 23 CT értéknél kisebb vagy 33 CT értéknél nagyobb reakciókat primer dimereknek vagy háttérjelnek tekintettük és kizártuk őket az adatok közül.

Hisztológia

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 fixáló-oldatot 0,1 M foszfát-pufferrel történő többszöri átmosással eltávolítottuk a szeletekről, ezt követően a szeleteket 10%-os, majd 20%-os szacharózt tartalmazó 0,1 M foszfát-pufferbe helyeztük, hogy védjük az ezt következő fagyasztás során a membránok szerkezetét. A szeleteket zárt eppendorf csőben néhány másodpercre folyékony nitrogénbe helyezve 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, Vector Labs) 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 0,1 M-os foszfát-

pufferben feloldott 1%-os OsO_4 -dal utófixáltuk, majd desztillált vizes mosás után 1%-os uranil-acetáttal kezeltük, hogy későbbi esetleges elektronmikroszkópos vizsgálatokra is alkalmasak legyenek. Ezt követően a szeleteket felszálló alkoholsorral dehidráltuk, végül epoxigyantába (Durcupan, Fluka) ágyasztuk, majd tárgylemezre helyezve 48 órán át 56°C -on polimerizáltattuk (Buhl és mtsai., 1994; Tamás és mtsai., 1997, 2000).

Sejt azonosítás és háromdimenziós fénymikroszkópos rekonstrukció

A hisztológiai eljárás során láthatóvá vált sejteket az elektrofiziológiai elvezetés során a sejtek egymáshoz viszonyított elhelyezkedéséről készített sematikus diagram alapján azonosítottuk. A sejtípusokat a szakirodalomban leírt dendritikus és axonális jellemzők alapján határoztuk meg (lásd Bevezető). A biocitinnel feltöltött sejtek háromdimenziós rekonstrukcióját a NeuroLucida rendszer (MicroBrightField) és BX-60F (Olympus) fénymikroszkóp segítségével végeztük 100x-os olajimmersion objektívvel. Rekonstruáltuk a sejtek sejttestét, dendritfáját és axonját, továbbá a sejtek teljes terjedelmében meghatároztuk a lehetséges szinapszisok helyét. Két sejt között akkor feltételeztünk szinapszist, ha az egyik sejt axonterminálisa a másik sejt dendritjével vagy sejttestével érintkezett és fénymikroszkóppal a két struktúrát elkülöníteni nem lehetett. A háromdimenziós rekonstrukciók kvantitatív analizisét és a szinapszisok poszt-szinaptikus szómától való távolságának lemérését NeuroExplorer (MicroBrightField) program segítségével végeztük. Az axon kanyarulatosság a szomszédos axon elágazódások között mért tényleges axonális út hossza és a lineáris távolság hányadosaként került kiszámításra.

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 többszöri átmosását követően 10%-os, majd 20%-os szacharózt tartalmazó 0,1 M foszfát-pufferbe kerültek, majd zárt eppendorf csőben néhány másodpercre folyékony nitrogénbe merítve fagyasztottuk őket. Ezt követően a szeleteket 10%-os zselatinba ágyasztuk, végül jéghideg foszfát-pufferben 50 μm -es vastagságú metszeteket készítettünk Leica VT 1000S mikrotómmal. Az elektrofiziológiai elvezetések során biocitinnel töltött idegsejteket Cy3-kapcsolt streptavidin (1:400, 2 óra, Jackson Immunoresearch) TBS oldatával tettük láthatóvá. Epifluoreszcens mikroszkóp segítségével választottuk ki a szómát és az axon arborizációt tartalmazó metszeteket, amelyeket 20% normál ló szérum TBS oldatában

blokkoltunk 2 órán át. A szabadon úszó metszeteket ezt követően különböző elsődleges antitestek 0,05%-os NaN_3 -t tartalmazó TBS oldatában inkubáltuk 72 órán keresztül 22°C -on. Kísérleteinkhez a következő antitesteket használtuk: nyúl-anti-pro-kolecisztikonin (CCK, 1:2000, Andrea Varro, Liverpool University); egér-anti-CB1 kannabinoid receptor (CNR1, 1:4000, ImmunoGenes); nyúl-anti-gamma-amino-vajsav (GABA, 1:1000, Sigma-Aldrich); egér-anti-chicken ovalbumin upstream promoter transzkripció faktor 2 (NR2F2, 1:700, Abcam); egér-anti-parvalbumin (PVALB, 1:1500, Swant); nyúl-anti-neuronális nitrogén monoxid szintetáz (NOS1, 1:1000, Cayman Chemical); nyúl-anti-neuropeptid Y (NPY, 1:300, Peninsula Laboratories); patkány-anti-szomatostatin (SST, 1:50, Merck Millipore); nyúl-anti-kalbindin (CALB1, 1:2000, Swant); kecske-anti-kalretinin (CALB2, 1:700, Swant) és kecske-anti-kolin-acetiltransferáz (CHAT, 1:100, Merck Millipore). A metszetek TBS pufferrel történő többszöri átmosását követően az immunreakciókat Alexa488- vagy Cy5-kapcsolt másodlagos antitestekkel (1:500, Jackson ImmunoResearch) vizualizáltuk. Végül a szeleteket Vectashield (Vector Laboratories) segítségével tárgylemezre vittük. Fotókat konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal (LSM 880, Zeiss) készítettünk 40x olaj immerziós objektív (1.4 NA) segítségével. A „z-stack” képek 3-10 fotóból épülnek fel, amelyek egymás után 0,3-0,8 μm -enként készültek.

Az immunhisztokémiai reakciók kvantifikálásához az ImageJ szoftver segítségével lemértük a biocitinnel töltött csipkebogyó sejtek szómájában vagy axonterminálisaiban az immunreakciók átlagos fluoreszcencia intenzitását. Minden egyes képen mért fluoreszcencia intenzitás értéket az adott képen mért háttér értékkel korrigáltunk (Jensen, 2013). Egy immunhisztokémiai festést abban az esetben tekintettünk negatívnak, amennyiben a mért fluoreszcencia intenzitás nem érte el a 2 AU értéket. Ezzel a módszerrel pozitívnak vagy negatívnak ítélt sejtek fluoreszcencia intenzitás értékei szignifikánsan különböztek egymástól ($p < 0,01$, Mann-Whitney teszt).

Elektronmikroszkópia

Fénymikroszkóppal és elektrofiziológiai mérésekkel azonosított csipkebogyó ($n=6$, hat különböző betegből) és neurogliaform sejtek ($n=2$, két különböző betegből) axon szakaszait kivágtuk a metszetükből és átágyasztuk epoxigyanta blokkokba. A kivágott metszetből ultramikrotómmal (RMC MTXL, Boeckler Instruments) 70 nm vastagságú sorozatmetszeteket készítettünk, melyeket hártásított (Formvar, TAAB), 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). A szinapszisokat a következő két feltétel együttes teljesülése esetén identifikáltuk: (1) szinaptikus vezikulák felhalmozódása a preszinaptikus terminálisban és (2) párhuzamos lefutású pre- és posztszinaptikus membránfelszínnek a szinapszis területén. Az axonterminálisokról (csipkebogyó sejt: n=31, neurogliaform sejt: n=24) a Reconstruct program (<http://synapses.clm.utexas.edu/>) segítségével készült háromdimenziós rekonstrukció. A csipkebogyó sejtek aktív zónáinak (n=11) méretét olyan merőlegesen vágott szinapszisokban mértük, ahol a pre- és a posztszinaptikus membránok láthatóak voltak.

Statisztikai elemzés

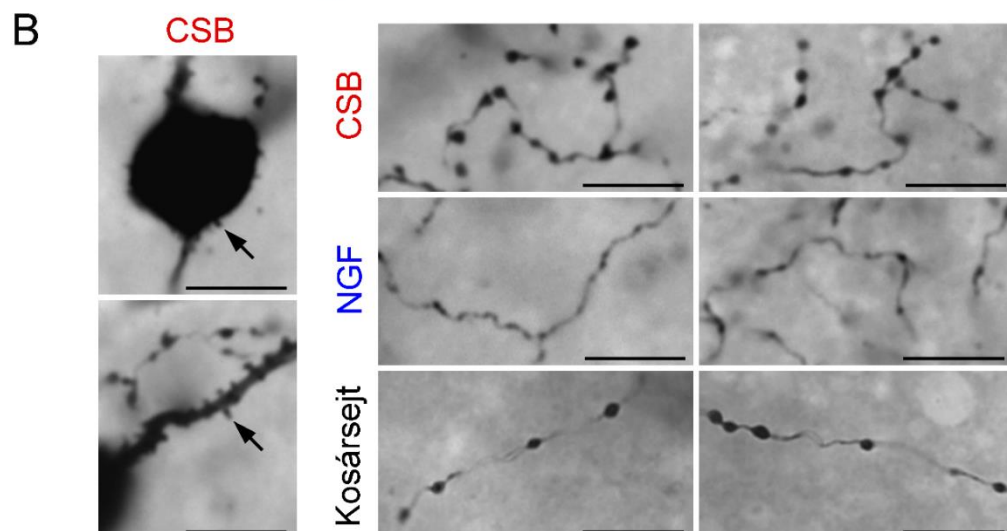
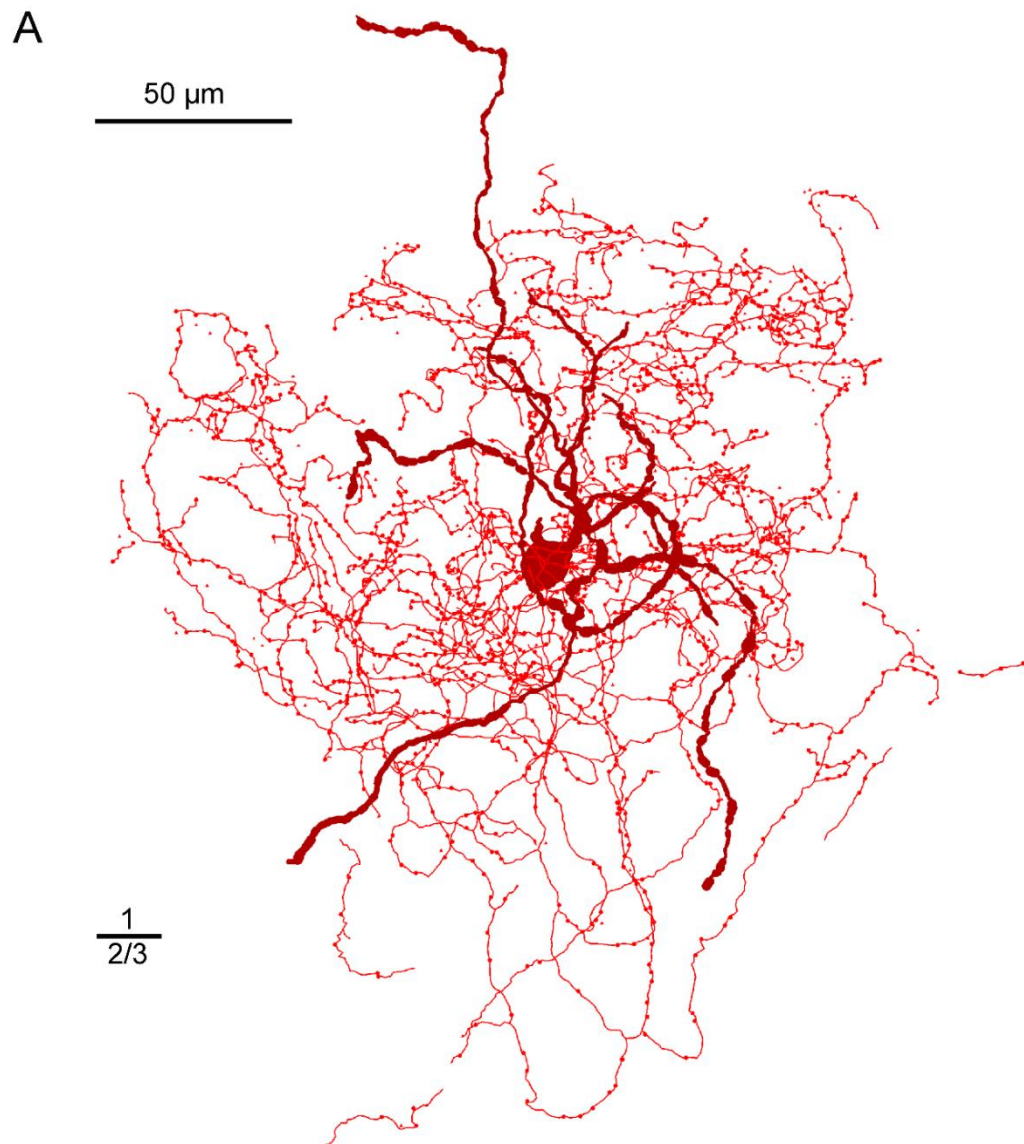
Eredményeinkben valamennyi értéknek az átlagát és szórását (\pm SD) adtuk meg, feltüntetve a kiértékelésbe bevett minták számát (n). A statisztikai tesztek az egyes kísérletek körülményeivel összhangban határoztuk meg (Real Statistics Data Analysis Tools, www.real-statistics.com). A normalitás tesztelését (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.

5. EREDMÉNYEK

Egy új humán agykérgi interneuron típus azonosítása

A mai napig kérdéses, hogy az emberi agy sejtés felépítése milyen szinten konzervált. Vannak-e olyan specializált sejtípusok és hálózati tulajdonságok, amik nem modellezhetők rágszálókban? Kísérleteink során célul tűztük ki, hogy kutatócsoportunk adatbázisában megtalálható több száz humán idegsejt morfológiáját megvizsgálva, kategorizálva potenciálisan új interneuron csoportokat azonosítunk. Vizsgálataink elsőként az első rétegi interneuronokra fókuszáltak. A kísérletekhez felhasznált minták olyan betegek (n=32, nők: n=18, férfiak: n=14, kor: 47 ± 16 év) akut biopsziás szöveteiből származtak, akiknél szubkortikális tumor (n=25) vagy aneurizma (n=7) sebészeti megközelítéshez szükséges volt eltávolítani a frontális (n=16), parietális (n=10) vagy temporális (n=6) nem patológiás agykérgi területek egy részét (Olah és mtsai., 2007; Molnár és mtsai., 2008, 2016). A szövetmintákból készített agykérgi szeletekből whole-cell patch-clamp technikával elektrofiziológiai elvezetéseket végeztünk. A sejtek kiválasztása során kezdetben nem preferáltunk egyetlen neuron típust sem, az elvezetések random történtek az első rétegben megtalálható idegsejt szómákból. Az elvezetések közben a sejteket biocitinnel töltöttük, hogy láthatóvá tehesük őket a későbbi fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz. A teljes szomatodendritikus és axonális morfológiával rendelkező első rétegi idegsejtek (n=76) alapos fénymikroszkópos vizsgálata során sikeresen azonosítottunk korábban már leírt, ismert sejtípusokat, mint például a neurogliaform sejteket (n=16; 21%; **2. B ábra, 3. B ábra**) (Olah és mtsai., 2007; Picelli és mtsai., 2014; Lake és mtsai., 2016) és egy eddig ismeretlen első rétegi interneuron csoportot is. Az új csoport sejtjeit rosehip, azaz csipkebogyó sejteknek (n=10, 13%) neveztük el az axonokon látható nagyméretű, kerek, csipkebogyóra emlékeztető boutonok és a sűrű, kompakt, bokorszerű axon arborizációjuk után (**2. ábra, 3. A ábra**). Tudomásunk szerint mindeddig nem írtak le hasonló fenotípussal rendelkező első rétegi agykérgi interneuron típust. A csipkebogyó sejtek szómája, illetve teljes dendrit és axon arborizációja az első rétegre korlátozódik, csak alkalmanként fut le egy-egy disztális dendrit vagy axon szál a 2. rétegbe. A csipkebogyó elnevezést tovább erősíti a szómán, illetve a proximális dendriteken megfigyelhető tüskeszerű filopodiumok jelenléte (**2. B ábra**). A csipkebogyó sejtek axonja általában a szóma alsó oldaláról ered, majd egy nagyon sűrű axon arborizációt hoz létre a szóma körül túlnyomórészt az első rétegre korlátozódva. A kanyarulatós axon kollaterálisokon megjelenő

kerekded boutonok mérete egyedülálló volt az általunk vizsgált első rétegi humán interneuronok axonterminálisai között (2. B ábra).

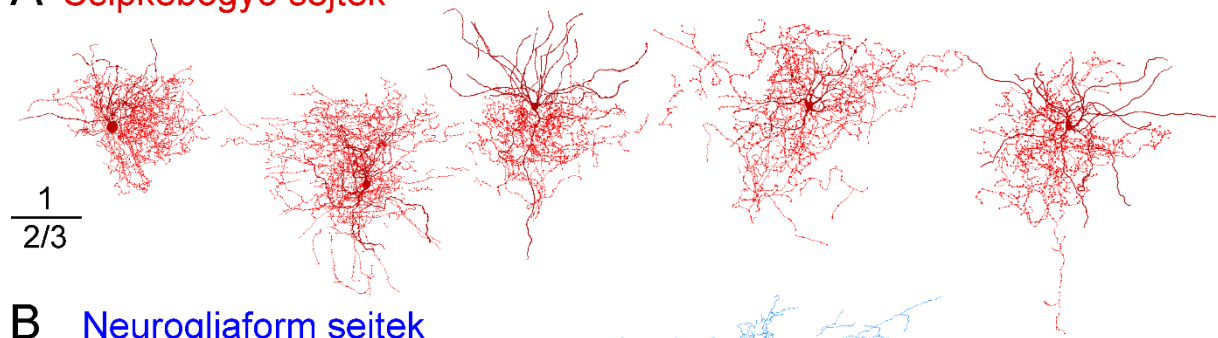
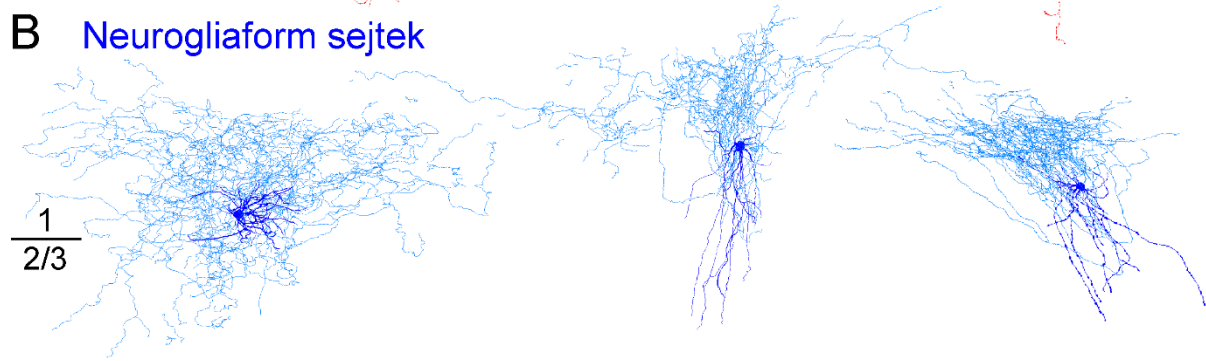
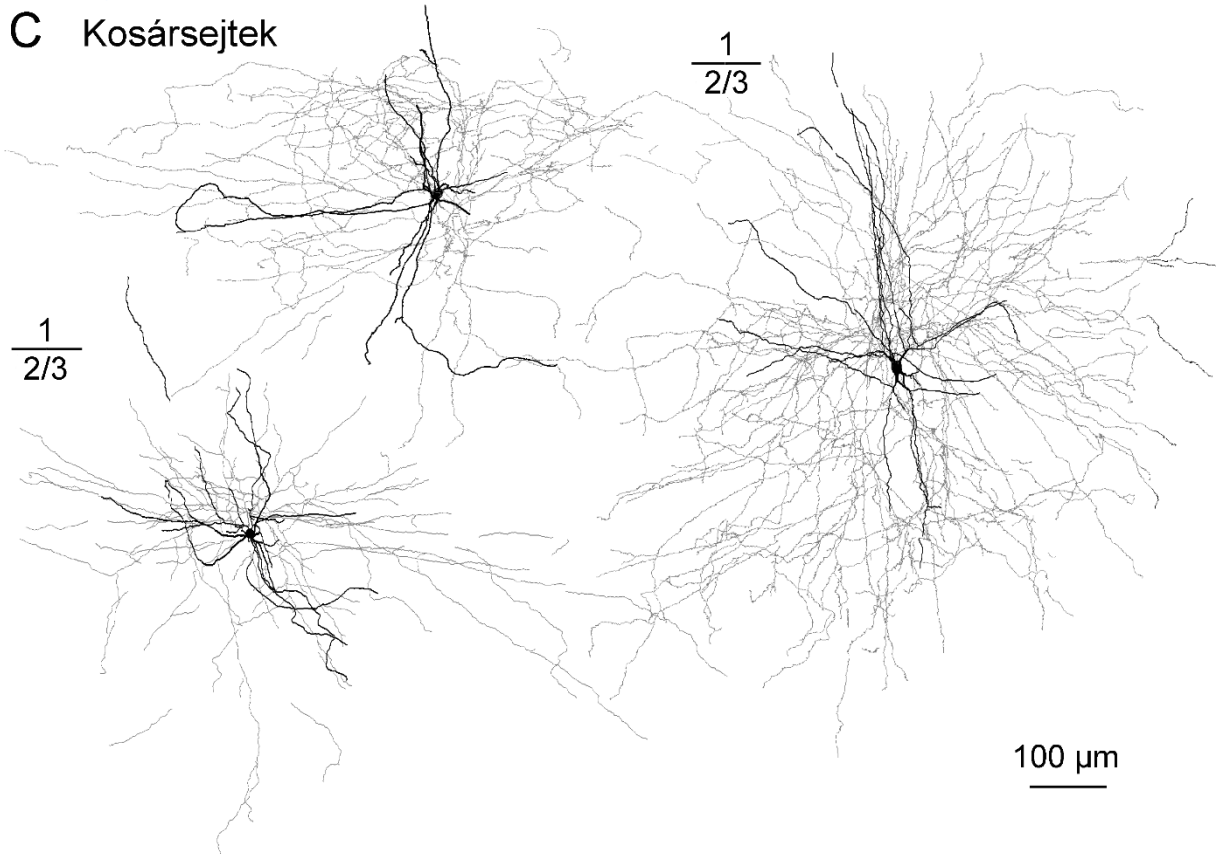


2. ábra. A csipkebogyó sejtek morfológiája. **A,** Egy whole-cell patch-clamp elvezetés során biocitinnel töltött csipkebogyó sejt háromdimenziós anatómiai rekonstrukciója (bordó: szóma és dendrit; piros: axon). **B,** Baloldali panel: csipkebogyó sejtek (CSB, n=130) fénymikroszkópos felvételein jól látszik a szóma és a proximális dendritek tüskézettsége (nyíl). Jobboldali panel: csipkebogyó sejtek sűrűn elágazó axon kollaterálisai nagyméretű, gömbölyű boutonokkal (fent). A kanyarulat neurogliaform sejt (NGF, n=16) axonokon nagyon kicsi boutonok figyelhetők meg (középen). A kosársejtek (n=5) egyenesebb lefutású axonjain a boutonok nagyobb távolságra helyezkednek el az előző két sejtípushoz képest (lent). Skálák: 10 μ m.

A csipkebogyó sejtek kvantitatív morfológiai jellemzése

Azonosításukat követően a csipkebogyó sejtek számát további célzott elektrofiziológiai elvezetésekkel növeltük adatbázisunkban (n=120). Ezt követően kvantitatív összehasonlítást végeztünk véletlenszerűen válogatott, háromdimenziósan rekonstruált csipkebogyó sejtek (n=6), első rétegi neurogliaform sejtek (n=5) és 2/3. rétegi kosársejtek (n=5) axodendritikus paraméterei között (**3. ábra, 4. ábra**) (Kisvarday és mtsai., 1990; Molnár és mtsai., 2008, 2016; Oláh és mtsai., 2009). A csipkebogyó sejtek elsőrendű dendritjeinek száma ($5,50 \pm 1,87$) hasonló volt a kosársejtekéhez ($6,2 \pm 2,17$), ellenben a neurogliaform sejtekéhez képest számuk szignifikánsan alacsonyabb volt ($8,6 \pm 2,19$; $p < 0,04$). A csipkebogyó sejtek teljes dendrit hossza ($1,96 \pm 0,90$ mm) szignifikánsan rövidebb volt a kosársejtek teljes dendrit hosszához viszonyítva ($3,41 \pm 0,58$ mm; $p < 0,031$), ugyanakkor szignifikánsan nem különbözött a neurogliaform sejtekétől ($2,62 \pm 1,08$ mm). A 100 μ m-enként átlagosan előforduló dendrit elágazódások száma a csipkebogyó sejtek esetében ($0,66 \pm 0,21$) szignifikánsan különbözött a kosársejtek értékétől ($0,29 \pm 0,10$; $p < 0,009$), viszont nem tért el a neurogliaform sejtekétől ($1,50 \pm 1,47$; **4. A ábra**).

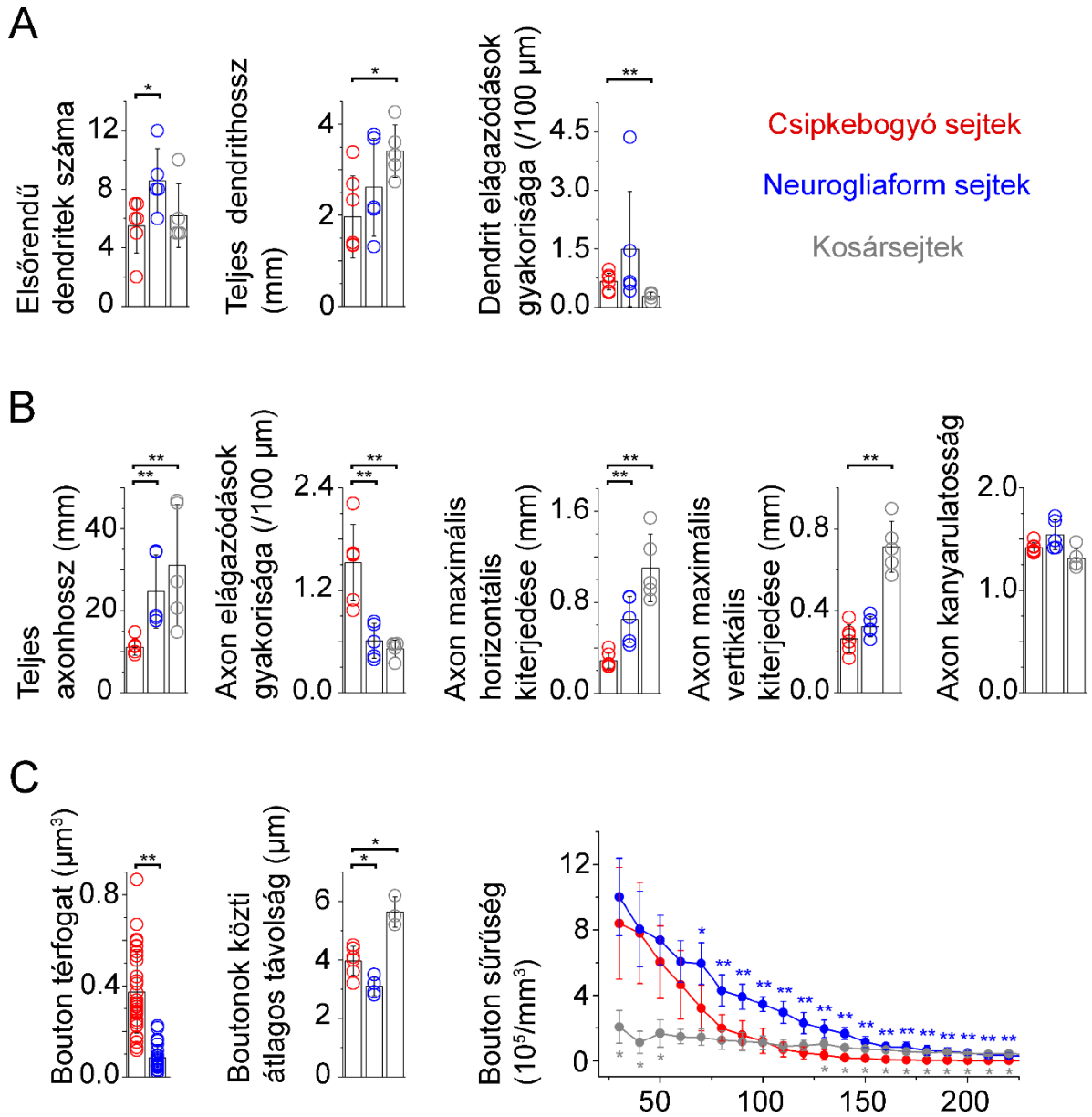
A csipkebogyó sejtek teljes axon hossza ($11,13 \pm 1,99$ mm) és az axonok maximális horizontális kiterjedése ($287,75 \pm 70,15$ μ m) szignifikánsan alacsonyabb volt mind a neurogliaform sejtek ($24,74 \pm 8,90$ mm és $648,68 \pm 202,60$ μ m; $p < 0,005$), mind a kosársejtek azonos adataihoz hasonlítva ($31,16 \pm 14,79$ mm; $p < 0,009$; $1102,76 \pm 296,99$ μ m; $p < 0,005$). A csipkebogyó sejt axonok maximális vertikális kiterjedése ($263,42 \pm 69,09$ μ m) szignifikánsan kisebb volt, mint a kosársejteké ($713,22 \pm 124,87$ μ m; $p < 0,005$), de nem különbözött a neurogliaform sejtekétől ($323,18 \pm 49,60$ μ m). A csipkebogyó sejtek axonjai gyakrabban ágaztak el mindkét másik vizsgált sejtípushoz képest.

A Csipkebogyó sejtek**B Neurogliaform sejtek****C Kosársejtek**

3. ábra. Humán agykérgi interneuronok háromdimenziós fénymikroszkópos rekonstrukciója. A, Csipkebogyó sejtek anatómiai rekonstrukciója (bordó: szóma és dendritek; piros: axon). **B,** Első rétegi neurogliaform sejtek anatómiai rekonstrukciója (sötétkék: szóma és dendritek; világoskék: axon). **C,** 2/3. rétegi kosársejtek anatómiai rekonstrukciója (fekete: szóma és dendritek; szürke: axon).

A csipkebogyó sejtek 100 μm -enként átlagosan $1,52\pm 0,45$, a neurogliaform sejtek $0,61\pm 0,21$, a kosársejtek pedig $0,52\pm 0,10$ axon elágazódással rendelkeztek ($p<0,005$). A csipkebogyó sejtek axon kanyarulatossága ($1,42\pm 0,05$) (lásd Anyagok és módszerek) nem különbözött szignifikánsan a neurogliaform ($1,54\pm 0,15$) és a kosársejtek ($1,31\pm 0,10$) esetén mért értékektől (**4. B ábra**).

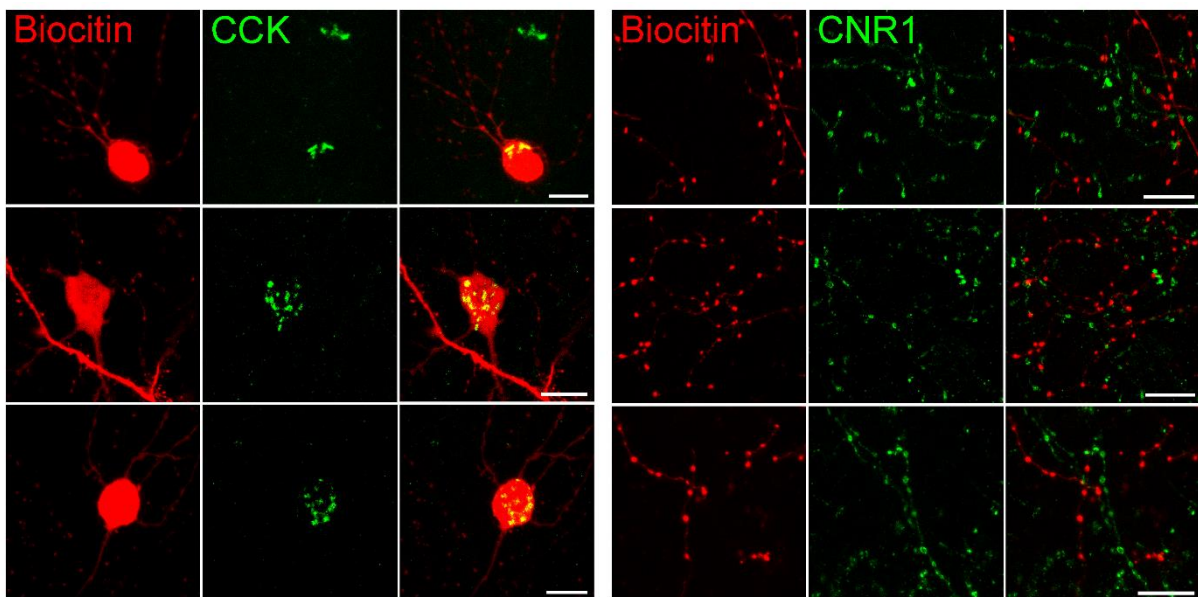
Megmértük a csipkebogyó ($n=6$), a neurogliaform ($n=4$) és a kosársejtek ($n=3$) axonális bouton sűrűségét Sholl-analízis segítségével 10 μm vastag, növekvő átmérőjű gömbhéjakban, korrigálva az agyszelet vastagságán kívül eső gömbhéj területekkel. Mindhárom sejtípus esetében a szómától távolodva szinte egyenletesen csökkent a bouton sűrűség, azonban a csipkebogyó sejtek értékeihez hasonlítva a kosársejteknél 30-50 μm -re a szómától alacsonyabb ($p<0,04$), 130-220 μm -re magasabb ($p<0,03$), a neurogliaform sejtek esetében pedig 70-220 μm -re a szómától magasabb ($p<0,02$) volt a mért bouton sűrűség. A csipkebogyó sejtek boutonok közti átlagos távolsága (interbouton intervallum) ($3,97\pm 0,49$) hosszabb volt a neurogliaform sejtek ($3,10\pm 0,32$ μm ; $p<0,038$) és rövidebb a kosársejtek adataival ($5,63\pm 0,51$ μm ; $p<0,024$) összevetve, lineáris távolságként mérve azt a szomszédos boutonok között. A 70 nm vastagságú sorozatmetszetekről készült elektronmikroszkópos felvételeken és az azokból összerakott háromdimenziós rekonstrukciókon végzett mérésekből kiderült, hogy a csipkebogyó sejtek bouton térfogata ($0,37\pm 0,18$ μm^3 ; $n=31$) csaknem négyszer nagyobb ($p<0,001$), mint a neurogliaform sejteké ($0,08\pm 0,06$ μm^3 ; $n=24$; **4. C ábra**). A csipkebogyó sejtek aktív zónáinak mérete ($0,11\pm 0,03$ μm^2 ; $n=11$) nem korrelált a boutonok térfogatával ($\rho=0,34$; $p=0,29$; Spearman-korreláció). Minden egyes teljesen rekonstruált bouton ($n=31$) egyetlen szinapszist alakított ki és minden esetben a posztszinaptikus célsejtek dendritörzseit célozta meg (**11. C ábra**).



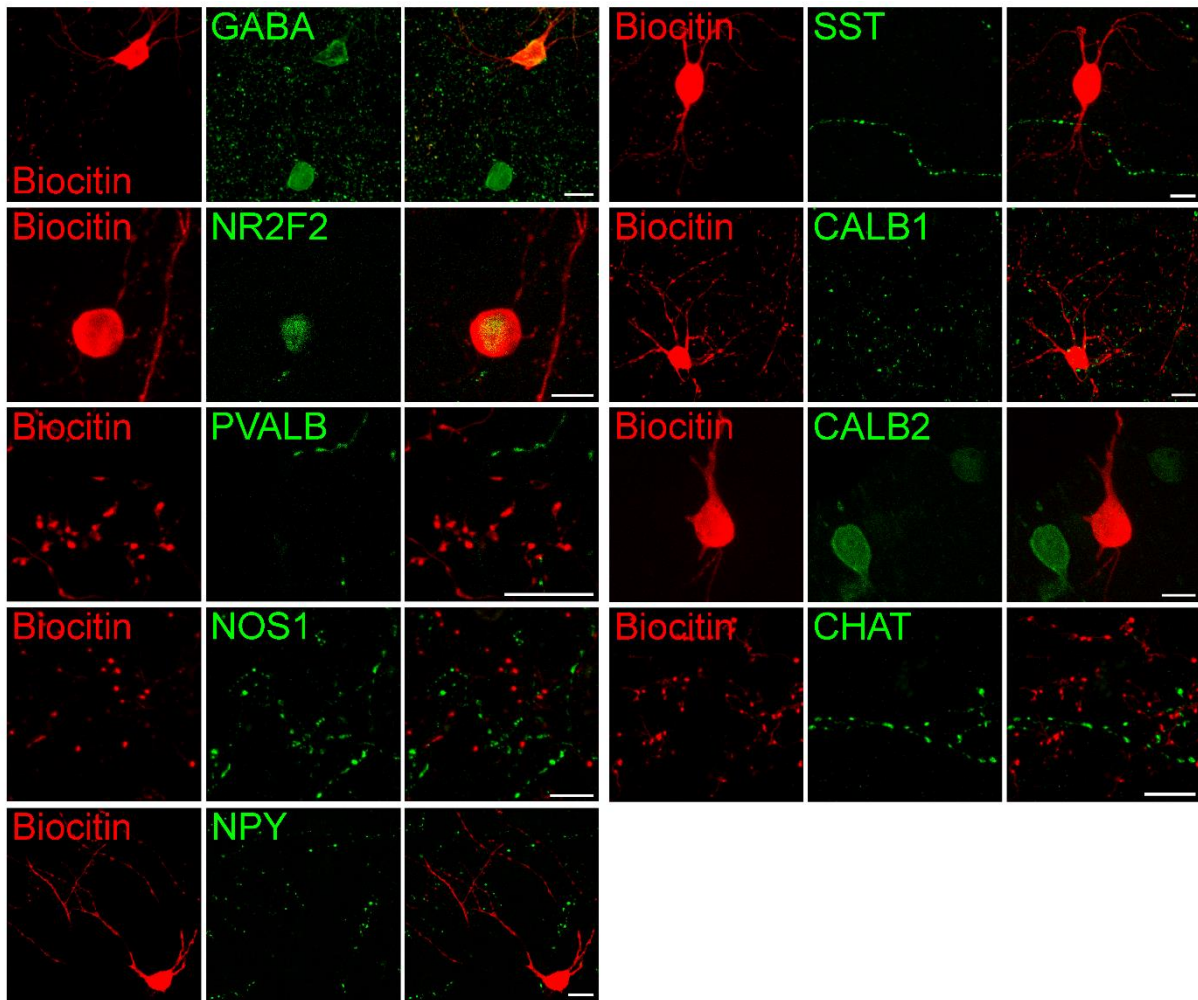
4. ábra. A csipkebogyó, a neurogliaform és a kosáresejtek morfológiai paramétereinek kvantitatív összehasonlítása. **A**, Dendritikus paraméterek. **B**, Axonális paraméterek. **C**, Boutonokra vonatkozó paraméterek. Piros: csipkebogyó sejtek; kék: neurogliaform sejtek; szürke: kosáresejtek.

A csipkebogyó sejtek molekuláris fenotípusának meghatározása

Hogy feltérképezzük az újonnan azonosított csipkebogyó sejtek jellemző marker molekuláit, immunhisztokémiai kísérleteket végeztünk. Az idegsejteket whole-cell patch-clamp elektrofiziológiai elvezetések során biocitinnel töltöttük, majd streptavidin segítségével láthatóvá tettük. Ezt követően anatómiailag, illetve SVM-azonosított csipkebogyó sejteken vizsgáltuk a GABAerg sejtípusok ismert marker molekuláit. A csipkebogyó sejtek kolecisztokinin (n=10) immunpozitivitást mutattak, ugyanakkor CB1 kannabinoid receptor (n=11) negatívak voltak (**5. ábra**). Továbbá GABA-t (n=2) és NR2F2 fehérjét (n=2) expresszáltak, ellenben nem fejeztek ki szomatosztatint (n=9), kalretinint (n=2), parvalbumint (n=3), NOS1-t (n=4), NPY-t (n=2), kalbindint (n=2), és kolin-acetiltranszferázt (n=3; **6. ábra**).



5. ábra. Whole-cell patch-clamp elvezetés közben biocitinnel töltött csipkebogyó sejtek immunhisztokémiai vizsgálata. Baloldali panelek: CCK immunpozitív csipkebogyó sejtek (n=3). Jobboldali panelek: CNR1 immunnegatív csipkebogyó sejt (n=3) axonok. Skálák: 10 μ m.

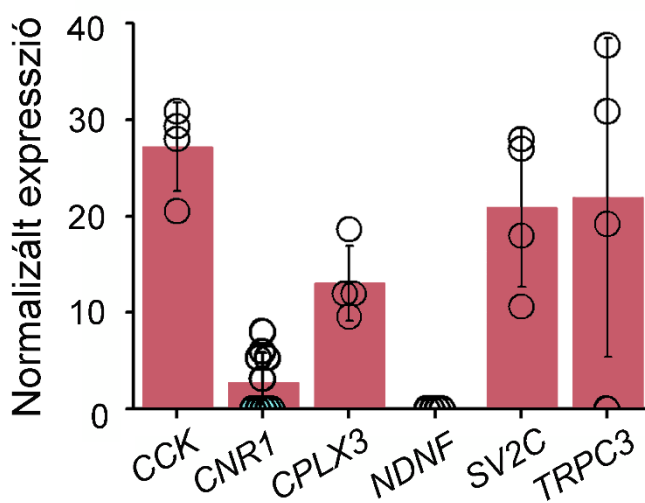


6. ábra. Csipkebogyó sejtek további immunjelölései. Immunpozitivitást mutató marker molekulák: GABA, NR2F2. Immunnegatív jelölések: szomatosztatin, kalretinint, parvalbumin, NOS1, NPY, kalbindin és kolin-acetiltransferáz. Skálák: 10 μ m.

Kísérleteinkkel egyidőben a kutatócsoportunkkal kooperáló seattle-i Allen Institute for Brain Science kutatóintézet munkatársai transzkriptom alapú sejtípus csoportosítással tíz GABAerg interneuron típust azonosítottak a humán agykéreg első rétegében. A csoportokat egysejt RNS szekvenáláson alapuló technika segítségével több száz sejtmag molekuláris információjának feldolgozásával alakították ki. A várakozásoknak megfelelően a transzkriptomikai osztályok egy része az ismert marker gének alapján átfedett az első rétegben megtalálható főbb sejtípusokkal, ugyanakkor eddig ismeretlen csoportok is megjelentek. A csipkebogyó sejtek immunhisztokémiai profilját rátérképezve a transzkriptomikai osztályokra, az egyik csoporttal átfedő expressziós mintázatot mutatott: $GAD1^+$ CCK^+ , de $CNR1^-$ SST^- $CALB2^-$ $PVALB^-$. Az így beazonosított feltételezett csipkebogyó sejt csoport volt az egyik

legjobban elkülönülő transzkriptomikai osztály. A csoport sejtjei nagy mennyiségben expresszálták a következő, szinaptikus fenotípus kialakításáért felelős géneket: szinaptikus vezikula glikoprotein 2c (*SV2C*), lizoszóma-kapcsolt membrán protein-5 (*LAMP5*), tranzien receptor potenciál klasszikus alcsalád C-3 (*TRPC3*), komplexin 3 (*CPLX3*), neurotripszin (*PRSS12*), netrin G1 (*NTNG1*), hisztamin receptor H1 (*HRH1*), receptor tirozin-kináz-szerű árva receptor 2 (*ROR2*), szomatosztatin receptor 2 (*SSTR2*) és taxilin béta (*TXLNB*). Ezen gének az axon növekedés folyamatában, illetve a szinapszis felépítésének és funkciójának szabályozásában játszanak szerepet, expressziójuk vagy magasan specifikus volt a feltételezett csipkebogyó sejt csoportra, vagy csak egyetlen másik első rétegi sejtcsoportnál volt megfigyelhető.

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 transzkripciós adatokat, amely szerint a csipkebogyó sejtek (n=4) *CCK*, *CPLX3*, *SV2C* és *TRPC3* pozitívak voltak és csak nagyon kis mennyiségben (*CNR1*, n=9), vagy egyáltalán nem (*NDNF*, n=4) expresszálták azokat a géneket, amelyeket a transzkriptomikai csoport sejtjei sem fejeztek ki (**7. ábra**). Az eredményeket a TBP (TATA-Box Binding Protein) háztartási génnel normalizáltuk. Összességében, molekuláris eredményeink erősen összekapcsolják az anatómiailag azonosított csipkebogyó sejteket egy újonnan leírt humán első rétegi transzkriptomikai sejtcsoporttal.



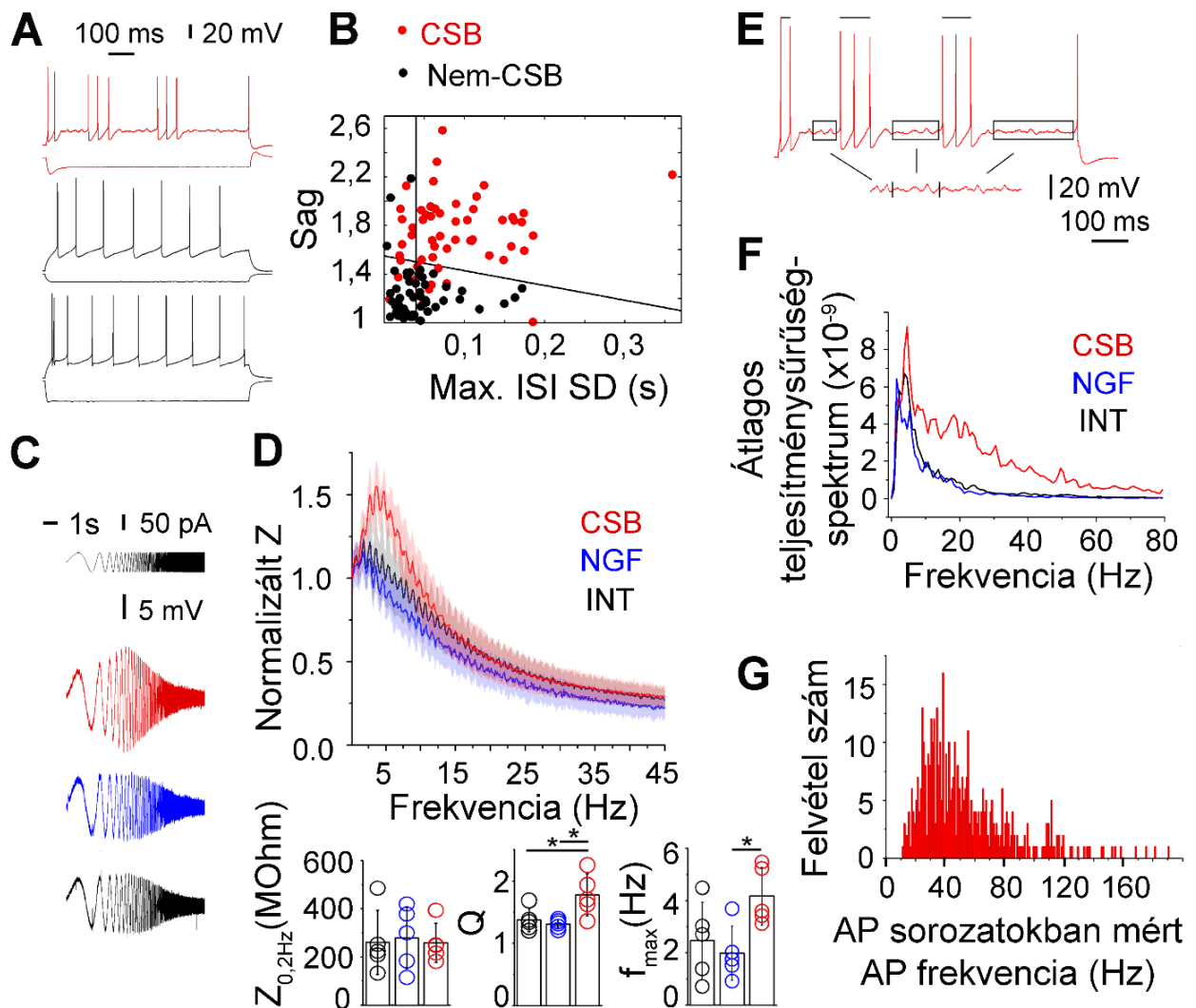
7. ábra. Csipkebogyó sejteken végzett dPCR kísérletek. Whole-cell patch-clamp elvezetett csipkebogyó sejtek citoplazmájából dPCR technika segítségével kvantifikált gének expressziós mintázata.

Intrinzik elektrofiziológiai tulajdonságok

Az anatómiailag azonosított csipkebogyó sejteket nyugalmi membránpotenciáljukon ($61,34 \pm 5,8$ mV) hosszú (800 ms) küszöbpotenciál feletti áraminjekcióval stimuláltuk, amelyre stuttering, azaz megszakításokkal tüzelő vagy szabálytalan tüzelési mintázattal válaszoltak (Ascoli és mtsai., 2008) (**8. A ábra**). A csipkebogyó sejtek reobázikus tüzelésére jellemző volt, hogy az egymást rövid idő intervallummal követő akciós potenciálokból álló sorozatokat hosszabb, csendes szakaszok választották el egymástól, melyek alatt a membránpotenciál küszöb alatti oszcillációja volt megfigyelhető. Mind az akciós potenciál sorozatokban mind a küszöb alatti oszcillációkban a béta és gamma frekvencia sávok domináltak (**8. E-G ábra**). A küszöb alatti membránpotenciál oszcillációk (Zemankovics és mtsai., 2010) átlagos teljesítménysűrűség-spektruma 3,8 és 80 Hz között magasabb volt a csipkebogyó sejtekben, mint a neurogliaform sejtekben és a besorolatlan első rétegi interneuronokban (**8. F ábra**). „Besorolatlan interneuronok”-nak azokat az első rétegből elvezetett idegsejteket neveztük, melyek egyértelműen sem neurogliaform, sem csipkebogyó sejt morfológiával nem rendelkeztek.

A csipkebogyó sejtek interspike intervallumának, vagyis az egymást követő akciós potenciálok közt eltelt időnek a szórása (87 ± 64 ms; $n=55$) magasabb volt mind a neurogliaform sejtek (41 ± 34 ms; $n=16$; $p<0,001$), mind pedig a besorolatlan interneuronok értékeihez hasonlítva (47 ± 41 ms; $n=36$; $p<0,001$). A csipkebogyó sejtek magas interspike intervallum szórás értéke a tüzelési mintázat már korábban említett jellegzetes aktív és csendes periódusainak váltakozásának következménye. Az első rétegi humán interneuronok hiperpolarizáló áramimpulzusra adott feszültségválasza során jellemző sag potenciál jelenik meg (Olah és mtsai., 2007). Az anatómiailag azonosított csipkebogyó sejteknél mért sag potenciál amplitúdója ($1,73 \pm 0,30$; $n=55$) meghaladta a neurogliaform sejteknél ($1,19 \pm 0,12$; $n=16$; $p<0,001$) és a besorolatlan interneuronoknál ($1,29 \pm 0,28$; $n=36$; $p<0,001$) mért amplitúdó értékeket is. A csipkebogyó sejtek bemeneti ellenállása ($139,6 \pm 54,1$ M Ω) hasonló volt a neurogliaform sejtekéhez ($160,1 \pm 55,9$ M Ω), de alacsonyabb a besorolatlan interneuronokéhoz képest ($216,3 \pm 84,4$ M Ω ; $p<0,001$). A csipkebogyó sejtek időállandója ($7,3 \pm 3,7$ ms) nem különbözött a neurogliaform sejtektől ($8,9 \pm 2,4$ ms; $p<0,001$), viszont szignifikánsan kisebb volt a besorolatlan interneuronok időállandójához hasonlítva ($11,1 \pm 12,5$ ms; $p<0,001$). Az anatómiailag azonosított csipkebogyó sejtek más első rétegi interneuronokhoz képest eltérő impedancia profillal rendelkeztek, amelyet az elektrofiziológiai elvezetések során exponenciálisan növekvő frekvenciájú szinuszoid (0,2-200 Hz; 10 mp) áram injekció

segítségével határoztunk meg (8. C-D ábra). A csipkebogyó sejtek (n=5) 0,9–12,4 Hz közötti impedancia értéke magasabb volt a neurogliaform (n=5) és más besorolatlan interneuronok (n=5) értékeihez képest. A legalacsonyabb frekvencián mért impedancia ($Z_{0,2\text{ Hz}}$) hasonló volt az összes első rétegben vizsgált interneuron csoportban (csipkebogyó sejt: $258 \pm 81 \text{ M}\Omega$; neurogliaform sejt: $279 \pm 128 \text{ M}\Omega$, besorolatlan interneuronok: $261 \pm 133 \text{ M}\Omega$). A csipkebogyó sejtek rezonanciája (Q; $1,77 \pm 0,34$) szignifikánsan nagyobb volt, mint a neurogliaform sejteké ($1,31 \pm 0,07$; $p < 0,021$) és a besorolatlan interneuronoké ($1,37 \pm 0,19$; $p < 0,049$). A maximális impedanciához tartozó frekvencia értéke (f_{max}) a csipkebogyó sejtekben ($4,17 \pm 1,1 \text{ Hz}$) meghaladta a neurogliaform sejtekét ($1,98 \pm 1,04 \text{ Hz}$; $p < 0,045$), viszont a különbség nem volt szignifikáns a besorolatlan interneuronokéhoz képest ($2,47 \pm 1,47 \text{ Hz}$; $p < 0,142$). A neurogliaform sejtek és a besorolatlan interneuronok impedancia paramétereit között nem találtunk szignifikáns különbségeket.



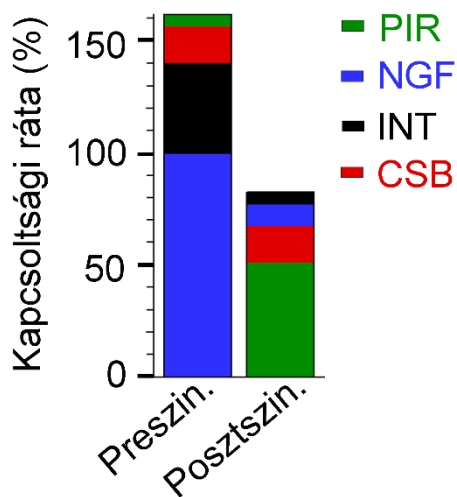
8. ábra. A csipkebogyó sejtek intrinzik elektrofiziológiai tulajdonságai. **A**, Egy jellegzetes csipkebogyó (fent), neurogliaform (középen) és egy besorolatlan első rétegi interneuron (lent) tüzelési mintázata. **B**, A csipkebogyó sejtek tüzelési mintázatának azonosításához használt SVM-alapú tulajdonság-kinyerő algoritmus a maximális interspike-intervallum szórás (max. ISI SD) és a hiperpolarizáció által kiváltott sag amplitúdó értékek alapján választotta szét (fekete vonalak) az anatómiailag azonosított csipkebogyó (CSB, piros pöttyök) és nem-csipkebogyó sejtek (Nem-CSB, fekete pöttyök) csoportját egymástól. **C**, **D**, A csipkebogyó sejtek (piros) eltérő impedancia profillal rendelkeztek más első rétegi interneuronokhoz (kék: NGF, fekete: besorolatlan interneuron) képest. **C**, Anatómiailag azonosított csipkebogyó (piros), NGF (kék) és egy besorolatlan interneuron (fekete) exponenciálisan növekvő frekvenciájú szinuszoid áram injekcióra (0,2-200 Hz; fekete, fent) adott feszültség válaszai. A méréseket a csipkebogyó sejtek 200 Hz-en mért amplitúdó értékeihez normalizáltuk. **D**, Fent: Különböző interneuron csoportok normalizált impedancia (Z) profiljai. Az árnyékos területek a szórást mutatják. Lent: A legalacsonyabb frekvencián mért impedancia ($Z_{0,2 \text{ Hz}}$, bal), a rezonancia (Q , középen) és a maximális impedanciához tartozó frekvencia értékek (f_{max} , jobb). **E**, A csipkebogyó sejtek tüzelési mintázatára jellemző akciós potenciál sorozatok (sávval jelölt) és az azokat megszakító küszöb alatti membránpotenciál oszcillációk (keretezett részek) automatizált kijelölése. **F**, Csipkebogyó (CSB, piros), neurogliaform (NGF, kék) és más besorolatlan első rétegi interneuronok (INT, fekete) küszöb alatti membránpotenciál oszcillációinak átlagos teljesítménysűrűség-spektruma. **G**, Az akciós potenciál (AP) sorozatokon belül mért akciós potenciál frekvencia értékek.

A csipkebogyó sejteket az első rétegi neurogliaform sejtektől és besorolatlan interneuronoktól legjobban elválasztó elektrofiziológiai jellemző megtalálásához egy SVM-alapú tulajdonság-kinyerő algoritmust használtunk. Ez az eljárás a megmért 200 jellemző közül a maximális interspike intervallum szórás és a hiperpolarizáció által kiváltott sag amplitúdó értékeket (lásd Anyagok és módszerek) találta a legoptimálisabbnak (**8. B ábra**). Az ezt a két tulajdonságot felhasználva tanított SVM modell hamis pozitív aránya 0% lett (összes vizsgált morfológiával rendelkező interneuron: $n=107$; azonosított csipkebogyó sejtek: $n=37$), ennek köszönhetően fel tudtuk használni a hiányos anatómiával rendelkező sejteket is, melyekre 'SVM-azonosított csipkebogyó sejt' néven hivatkoztunk.

Csipkebogyó sejtek a helyi mikrohálózatokban

A csipkebogyó sejtek morfológiai, molekuláris és elektrofiziológiai jellemzését követően a helyi mikrohálózatokban betöltött szerepét kezdtük el feltérképezni. Többszörös elektrofiziológiai elvezetéseket végeztünk csipkebogyó sejteken és azok potenciális pre- és

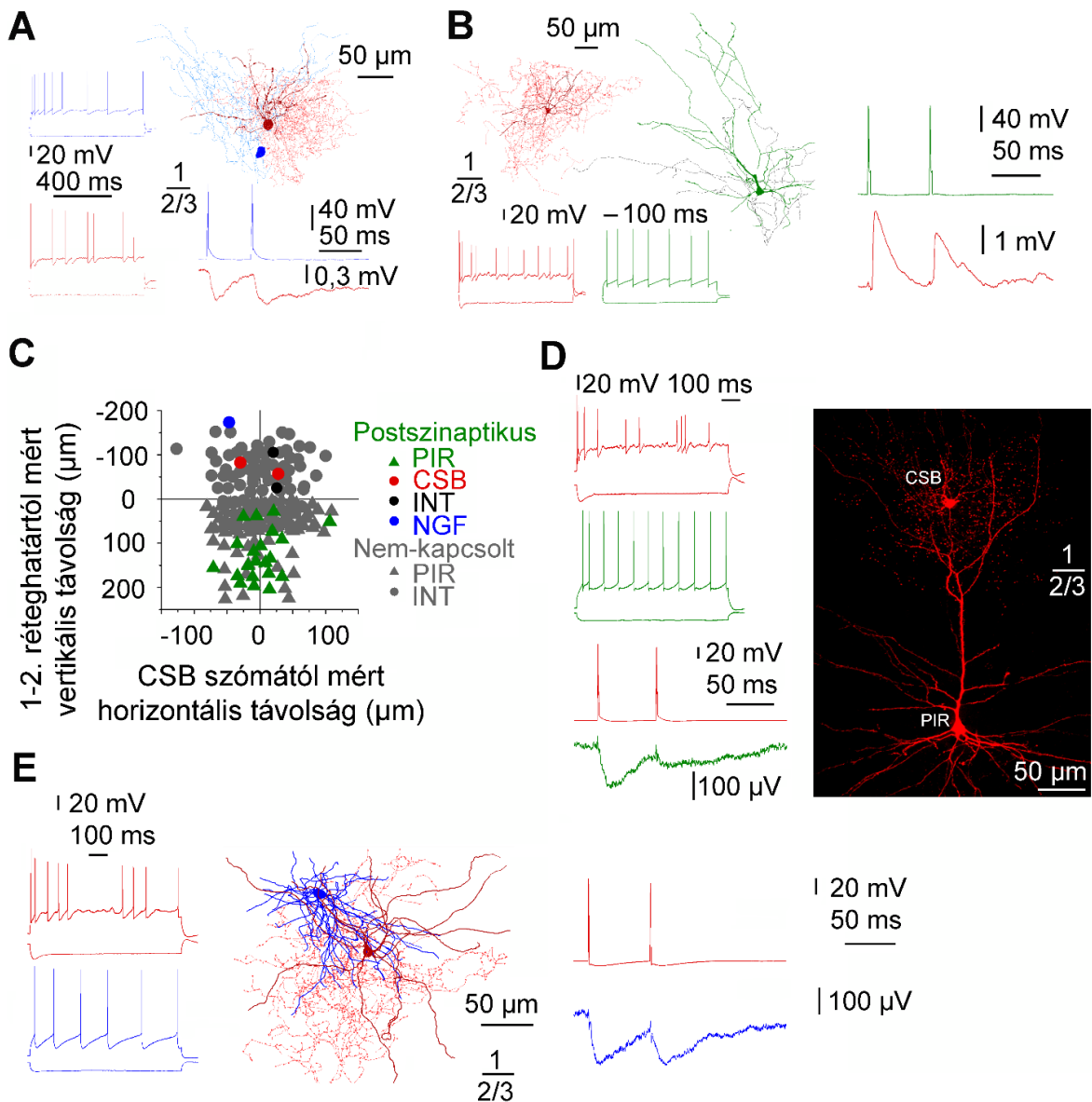
posztszinaptikus neuronjain (9. ábra, 10. ábra). A feltételezett partnersejtek kiválasztása során nem preferáltunk egyetlen neuron típust sem, az elvezetések véletlenszerűen történtek a csipkebogyó sejtek szómájától horizontális irányban $\sim 100 \mu\text{m}$, vertikális irányban $\sim 200 \mu\text{m}$ sugarú területen, az elsőtől a harmadik rétegig.



9. ábra. A csipkebogyó sejtek szinaptikus partnereinek feltérképezése. Csipkebogyó sejtek 1-3. rétegi preszinaptikus (Preszin.) és posztszinaptikus (Posztszin.) partner sejtjeinek kapcsoltsági aránya (PIR: piramis sejtek; NGF: neurogliaform sejtek; INT: besorolatlan első rétegi interneuronok, CSB: csipkebogyó sejtek).

Összesen 226 esetben teszteltük morfológiailag ($n=43$), illetve SVM-azonosított csipkebogyó sejtek ($n=24$) potenciális preszinaptikus kapcsolatait, amely során az első rétegi interneuronok 45%-a állt szinaptikus kapcsolatban a vizsgált csipkebogyó sejtekkel (9. ábra). A csipkebogyó sejteken IPSP-ket kiváltó első rétegi GABAerg sejtek kapcsoltsági rátája (KR) sejttypusonként eltérő volt. A neurogliaform sejtek ($n=10$) 100%-a ($n=10$), a csipkebogyó sejtek ($n=12$) 17%-a ($n=2$), míg a besorolatlan interneuronok ($n=35$) 40%-a ($n=14$) szinaptizált csipkebogyó sejteken. Ugyanakkor nem találtunk egyetlen olyan második rétegi (a 1-2. réteghatár alatti $70 \mu\text{m}$ -es sávban) interneuront ($n=9$) sem, amelyik csipkebogyó sejtrel állt volna szinaptikus kapcsolatban. A csipkebogyó sejtekre érkező IPSP-k amplitúdója az egyes preszinaptikus interneuron típusok esetében a következő volt: neurogliaform sejtek ($0,98 \pm 0,71$ mV; 10. A ábra), csipkebogyó sejtek ($0,92 \pm 0,59$ mV), besorolatlan interneuronok ($1,50 \pm 1,31$ mV). A páros pulzus stimulációra kapott IPSP-k amplitúdója rövid távú depressziót mutatott, arányaik a következőképpen alakultak a preszinaptikus sejttypustól függően: neurogliaform sejtek ($0,42 \pm 0,48$), csipkebogyó sejtek ($0,27 \pm 0,04$), besorolatlan interneuronok ($0,71 \pm 0,26$). A csipkebogyó sejtekhez a 2/3. rétegi piramis sejttypuktól ($n=160$) helyi serkentő bemenetek csak elvétve érkeztek ($n=8$, KR=5%), a regisztrált monoszínaptikus EPSP-k amplitúdója $3,36 \pm 1,46$ mV, páros pulzus aránya pedig $0,68 \pm 0,12$ volt (10. B ábra). Azt a humán agykéregben korábban megfigyelt nagyhatékonyságú serkentést, amely során egy piramis sejt egyetlen

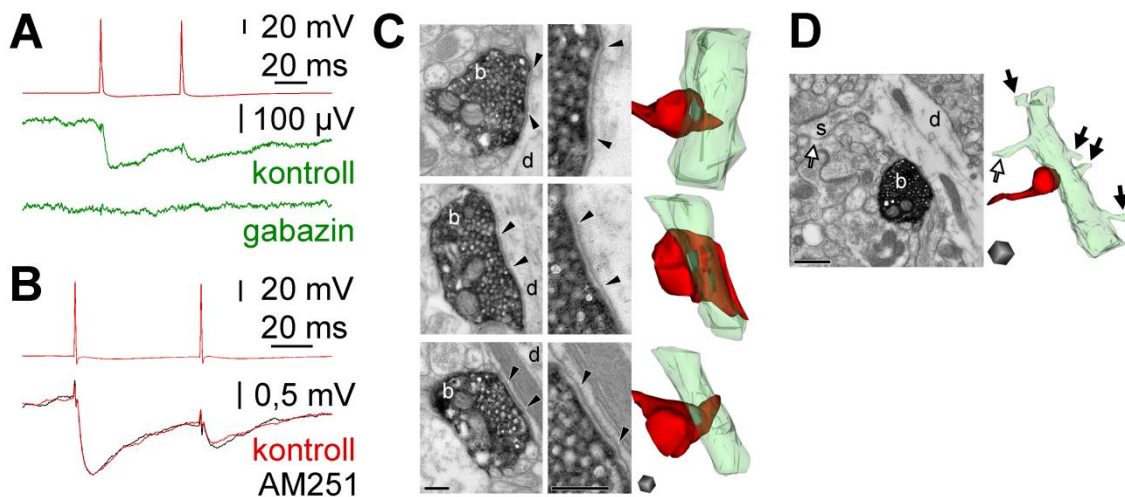
akciós potenciálja képes a posztszinaptikus kosár- és axo-axonikus sejteket küszöb fölé depolarizálni (Molnár és mtsai., 2008, 2016; Szegedi és mtsai., 2016), a csipkebogyó sejtek esetében nem figyeltük meg. Összességében megállapíthatjuk, hogy a csipkebogyó sejtek helyi bemenetei túlnyomó többségében GABAerg interneuronoktól érkeznek, szem előtt tartva, hogy az agyszelet készítés folyamata során potenciálisan levágott piramissejt axon kollaterálisok (10. B ábra) következtében a piramissejtek által kiváltott EPSP-k mennyisége alulreprezentált lehet.



10. ábra. A csipkebogyó sejtek lokális szinaptikus kapcsolatai. **A,** Egy neurogliaform-csipkebogyó sejt szinaptikus jelátvitel. Baloldali: a preszinaptikus neurogliaform sejt (kék) és a posztszinaptikus csipkebogyó sejt (piros) tüzelési mintázata. Jobboldali: a neurogliaform sejt (sötétkék: szóma; világoskék: axon) és csipkebogyó sejt (bordó: szóma és dendritek; piros: axon) fénymikroszkópos rekonstrukciója (fent). A neurogliaform sejt akciós potenciáljai (kék) lassú IPSP-t váltanak ki a piramis sejten (piros, lent). **B,** Egy piramis sejt-csipkebogyó sejt kapcsolat. Baloldali: a preszinaptikus piramis sejt (zöld: tüzelési mintázat, szóma és dendritek; fekete: axon) és a posztszinaptikus csipkebogyó sejt (bordó: szóma és dendritek; piros: axon, tüzelési mintázat) anatómiai rekonstrukciója (fent) és tüzelési mintázata (lent). Jobboldali: a piramis sejt kiváltott akciós potenciáljai (zöld) EPSP-ket váltanak ki a csipkebogyó sejten (piros). **C,** Csipkebogyó sejtek potenciális posztszinaptikus célsejtjeinek azonosítása és térbeli eloszlása. **D,** Egy csipkebogyó sejt és egy 3. rétegi piramis sejt szinaptikus kapcsolata. Baloldali: a preszinaptikus csipkebogyó (piros) és a posztszinaptikus piramis sejt (zöld) tüzelési mintázata (fent). A csipkebogyó sejt (piros) akciós potenciáljai IPSP-ket váltanak ki a piramis sejten (zöld, lent). Jobboldali: a sejt párról készült fluoreszcens konfokális felvételen látszik, ahogy a csipkebogyó sejt (CSB) axonfelhője a 3. rétegi piramis sejt (PIR) apikális dendritjének terminális régiójában helyezkedik el. **E,** Az egyetlen kapcsolt csipkebogyó sejt-neurogliaform sejt pár. Baloldali: a preszinaptikus csipkebogyó sejt (piros) és a posztszinaptikus neurogliaform sejt (kék) tüzelési mintázata (fent). Középen: a csipkebogyó (bordó: szóma és dendritek; piros: axon) és neurogliaform sejt (kék: szóma és dendritek) fénymikroszkópos rekonstrukciója. Jobboldali: a csipkebogyó sejt (piros) akciós potenciáljai IPSP-ket váltanak ki a neurogliaform sejten (kék).

A csipkebogyó sejtek (morfológiailag azonosított: $n=49$, SVM-azonosított: $n=13$) ellenben ritkán szinaptizáltak interneuronokon ($KR=8\%$). Összesen 197 esetben teszteltük csipkebogyó sejtek potenciális kimeneteit, amelynek eredményeképp $n=1$ posztszinaptikus neurogliaform sejtet ($n=10$; $KR=10\%$), $n=2$ csipkebogyó sejtet ($n=12$; $KR=17\%$), $n=2$ besorolatlan első rétegi interneuront ($n=40$; $KR=5\%$) azonosítottunk. Piramis sejtek esetében a 2. rétegi piramis sejteket ($n=100$) alacsony ($n=5$, $KR=5\%$), míg a 3. rétegi piramis sejteket ($n=35$) nagyobb kapcsoltsági ráta ($n=16$, $KR=46\%$) jellemezte (**9. ábra, 10. ábra**). A 3. rétegi piramis sejtek közé azokat a piramis sejteket soroltuk, ahol a szóma több, mint $70\ \mu\text{m}$ -rel az 1–2. réteghatár alatt volt található. Farmakológiai kísérleteink során a csipkebogyó sejtek által kiváltott IPSP-ket a GABA_A receptor antagonistá gabazin ($n=4$, $10\ \mu\text{M}$, **11. A ábra**) alkalmazásával sikerült blokkolni, így eredményeink bizonyítják, hogy a csipkebogyó sejtek által kiváltott IPSP-ket GABA_A receptorok közvetítik. A csipkebogyó sejtek által kiváltott IPSP-k amplitúdó értéke nagyobb volt a posztszinaptikus interneuronokon ($0,43\pm 0,37\ \text{mV}$), mint a 3. rétegi piramis sejteken ($0,09\pm 0,06\ \text{mV}$, $p<0,05$). Ezen eredmények szerint a

csipkebogyó sejtek elsősorban azokat a piramis sejteket célozzák meg, amelyek az első rétegbe küldik apikális dendritjeik terminális régióját. Elektronmikroszkópos vizsgálataink során véletlenszerűen kiválasztott csipkebogyó sejt (n=6) boutonokból (n=64) készített sorozatmetszeteken a megfigyelt axon terminálisok kizárólag dendritörzseken szinaptizáltak (100%; **11. C ábra**). A posztszinaptikus dendritek (n=46) további ultrastrukturális vizsgálata a legtöbb esetben piramis sejt dendritekre jellemző dendrittüskék és elszórt szimmetrikus szinapszisok jelenlétét mutatta ki (n=41; 86%; **11. D ábra**). A fennmaradó 5 esetben (11%) a vizsgált dendriteken nem voltak dendrittüskék, illetve a dendritörzsekre aszimmetrikus szinapszisok érkeztek, így nagy valószínűséggel interneuronokhoz tartoztak.

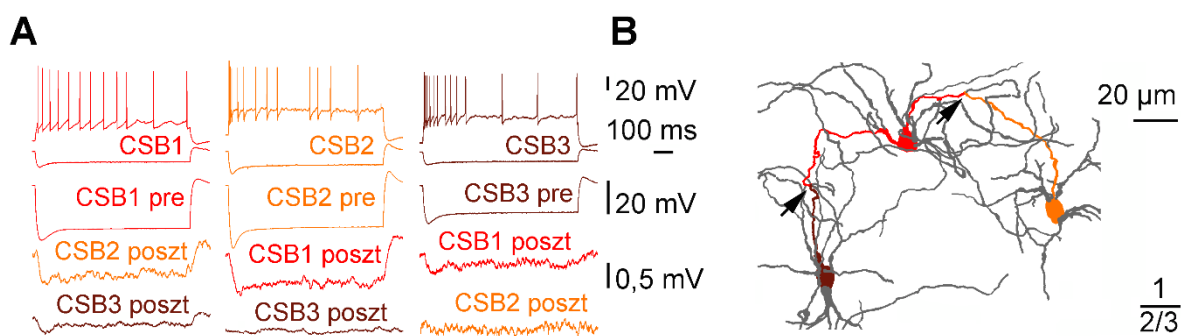


11. ábra. A csipkebogyó sejtek szinaptikus kimeneteinek farmakológiai és elektronmikroszkópos vizsgálata. **A**, Egy csipkebogyó-piramis sejt kapcsolat farmakológiai jellemzése. A preszinaptikus csipkebogyó sejt akciós potenciáljai (piros) által a posztszinaptikus 2/3. rétegi piramis sejtben kiváltott IPSP-k (zöld) gabazin hatására eltűntek. **B**, A csipkebogyó sejtek CNR1 expressziójának funkcionális tesztelése. A preszinaptikus csipkebogyó sejt akciós potenciáljai (piros, fent) IPSP-eket váltottak ki a posztszinaptikus csipkebogyó sejtől (piros, lent). Az AM251, CNR1 antagonistának nem volt hatása a kiváltott IPSP-kre. **C**, Dendritörzseken (d; zöld) szinaptizáló biocitinnel töltött csipkebogyó sejtek (n=3) axon terminálisairól (b; piros) készült elektronmikroszkópos felvételek (baloldali panelek) és háromdimenziós rekonstrukciók (jobboldali panelek). A szinaptikus rész határait nyilak jelölik. Skálák: 200 nm. **D**, Egy biocitinnel töltött csipkebogyó sejt boutonról (b; piros) készült elektronmikroszkópos felvétel (baloldali panel) és háromdimenziós rekonstrukció (jobboldali panel), amely egy dendrittüskék (s; nyilak) alapján azonosított piramis sejt dendritörzsen (d; zöld) szinaptizál. Skálák: 500 nm.

Korábbi vizsgálatok CCK immunpozitív interneuronokban funkcionális preszinaptikus CB1 kannabinoid receptor expressziót mutattak ki patkány agykéregben (Katona és Freund, 2012). Azonban immunhisztokémiai és dPCR eredményeinket megerősítve (**5. ábra**, **7. ábra**) elektrofiziológiai kísérleteink sem igazoltak CNR1 expressziót a CCK immunpozitivitást mutató csipkebogyó sejtekben. Whole-cell patch-clamp elvezetett csipkebogyó sejtek (n=4) által kiváltott IPSP-kre az AM251, CNR1 antagonistának nem volt hatása (**11. B ábra**).

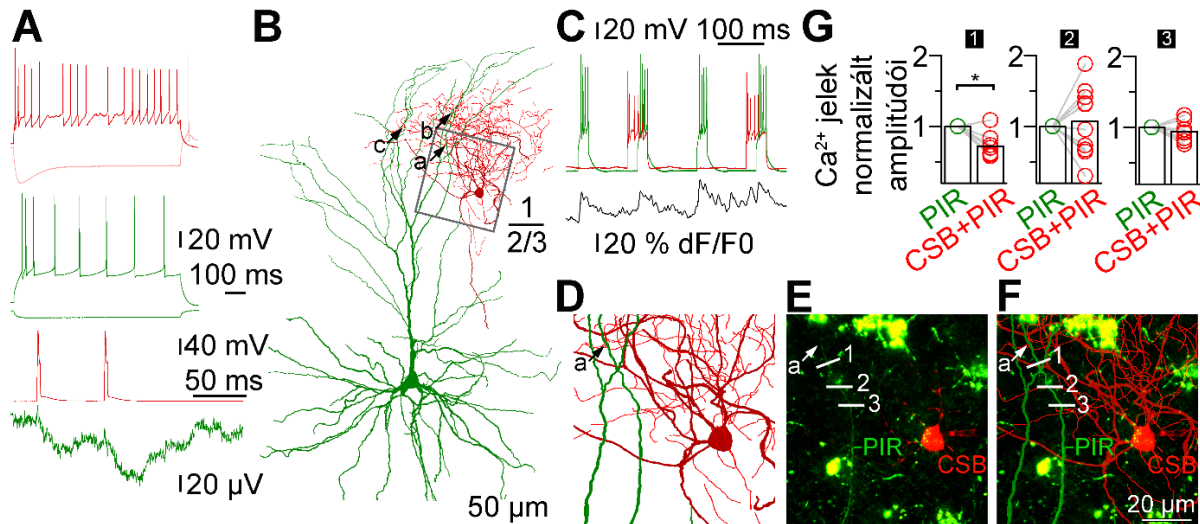
A humán neuronhálózatokra jellemzőek az egyetlen neuron által kiváltott poliszinaptikus eseménysorozatok (Molnár és mtsai., 2008, 2016; Szegedi és mtsai., 2016). Kísérleteink kimutatták, hogy a csipkebogyó sejtek is részt vesznek az egy-sejt-aktiválta hálózati eseményekben. Elektrofiziológiai elvezetéseink során második (n=1) és harmadik rétegi (n=2) piramissejtek által kiváltott diszinaptikus IPSP-ket és egy axo-axonikus sejt által kiváltott poliszinaptikus EPSP-ket regisztráltunk posztszinaptikus csipkebogyó sejtekben.

A mono- és poliszinaptikus kémiai szinapszisok mellett, a humán interneuronok elektromos szinapszisokon keresztül is kapcsolatban állnak egymással (Olah és mtsai., 2007). A csipkebogyó sejtek (n=9) egymás között homológ (n=5, KR=56%, **12. ábra**), más típusú interneuronokkal (n=18) heterológ elektromos szinapszisokat (n=2, KR=11%) alakítanak ki. Az elektromos szinapszisok kapcsoltsági koefficiensének vizsgálatát egy hiperpolarizáló áramlépcsővel végeztük, ami az első sejtbe injektálva átterjed a második sejtbe. A csipkebogyó sejtek elektromos szinapszisainak kapcsoltsági koefficiense ($0,05 \pm 0,05$) más humán és patkány interneuronokéhoz (Olah és mtsai., 2007) hasonló volt.



12. ábra. A csipkebogyó sejtek elektromos szinapszisokon keresztül hálózatokat alkotnak. **A**, Fent: Három csipkebogyó sejt tüzelési mintázata (CSB1: piros; CSB2: narancssárga; CSB3: barna). Lent: A CSB1 sejtbe injektált hiperpolarizációs áramlépcső kölcsönösen átterjedt a CSB2 és CSB3 sejtekbe, megerősítve a sejtek közötti reciprok elektromos szinapszisok jelenlétét. Pre: hiperpolarizáló áramlépcső megjelenése az első sejtben, poszt: hiperpolarizáló áramlépcső tovább terjedése. **B**, A hiperpolarizációs jel terjedésének útvonala a CSB1 (piros), CSB2 (narancssárga) és CSB3 (barna) sejtek feltételezett dendrodendritikus elektromos szinapszisain (nyilak) keresztül (szürke: további dendritek).

Az első réteget elérő piramis sejtek disztális dendritjeit célzó csipkebogyó sejtek feltehetően a dendritikus jelfeldolgozás szabályozásában vehetnek részt. A vizsgált csipkebogyó sejtek $2,6 \pm 1,5$ (min.-max.: 1-4) feltételezett szinapszist alakítottak ki harmadik rétegi piramis sejtek dendritjein, a posztszinaptikus piramis sejtek ($n=5$) szómájától 29 ± 98 μm (min.-max.: 94-455 μm) távolságra. Feltételezett szinapszist tekintettük az együttállásokat, ahol az egyik sejt axonterminálisa annyira megközelítette egy másik sejt dendritjét vagy sejttestét, hogy fénymikroszkóppal a két struktúrát már nem lehetett elkülöníteni. A posztszinaptikus piramis sejtekre ($n=5$) érkező IPSP-k felutási ideje (rise time; $7,3 \pm 2,4$ ms; min.-max.: 3,8-10,1 ms) korrelált a feltételezett szinapszistok szómától való távolságával ($\rho=0,90$; $p=0,04$, Spearman-korreláció). Szinaptikusan kapcsolt csipkebogyó sejt-piramissejt pároknál ($n=6$) a csipkebogyó sejteket Alexa Fluor 594 fluoreszcens festékkel töltöttük, hogy láthatóvá tegyük a preszinaptikus axon kollaterálisokat, a posztszinaptikus piramis sejteket pedig Oregon Green BAPTA-1 kalcium indikátorral, hogy követhető legyen a dendritek lefutása és mérni tudjuk a dendritikus Ca^{2+} -dinamikát (**13. ábra**). A csipkebogyó sejtek első akciós potenciálja által a posztszinaptikus piramis sejtek disztális dendritjein kiváltott IPSP-k amplitúdója a szómában mérve $35,6 \pm 24,7$ μV volt (**13. A, B ábra**). A humán neuronoknál korábban leírt akciós potenciál dendritikus visszaterjedést (Verhoog és mtsai., 2013; Kerekes és mtsai., 2014) kísérleteink során is sikerült kimutatni. A vizsgált posztszinaptikus harmadik rétegi piramis sejtek disztális dendritjein szomatikusan kiváltott akciós potenciál sorozatokat (100 ms-os áram injekció, 4 akciós potenciál/sorozat) követően detektálható Ca^{2+} válaszokat mértünk. Az első rétegben futó apikális dendritágak számos pontján (17 ± 8) következetesen mérhető volt a fluoreszcencia intenzitás változás ($\Delta\text{F}/\text{F}$; $17,2 \pm 7,3\%$), ami alátámasztja az akciós potenciál visszaterjedését a piramis sejtek disztális dendrit szakaszaiba (**13. C ábra**). Méréseinkhez olyan területeket választottunk, ahol az Oregon Green BAPTA-1 indikátorral jelölt posztszinaptikus apikális dendritágak átfedtek az Alexa Fluor 594 festékkel jelölt preszinaptikus csipkebogyó sejt axon arborizációval. Ezt követően váltakozva váltottunk ki akciós potenciál sorozatokat kizárólag a piramis sejtekben, majd egyidejűleg a sejt pár mindkét tagjában (**13. B-F ábra**). Kontrollnak azokat a méréseket tekintettük, amikor csak a piramis sejtekben történt aktiváció. A visszaterjedő akciós potenciálokkal egyidőben aktivált csipkebogyó sejt bemenetek képesek voltak lecsökkenteni a Ca^{2+} jelek amplitúdóját a kontroll értékekhez képest ($n=6$; $12,8 \pm 4,6\%$ vs. $18,8 \pm 5,7\%$ $\Delta\text{F}/\text{F}$, $p < 0,02$; **6. C ábra**) a posztszinaptikus sejt dendritjeinek egy vagy két mérési pontján (**6. G ábra**). A preszinaptikus axon arborizáció és a posztszinaptikus dendriteken lévő mérési pontok



13. ábra. A humán csipkebogyó sejtek szegmens-specifikusan szabályozzák a piramis sejtek disztális apikális dendritágaiba visszaterjedő akciós potenciálokat. **A**, Fent: Egy preszinaptikus csipkebogyó sejt (piros) és egy posztzinaptikus piramis sejt (zöld) tüzelési mintázata. Lent: A csipkebogyó sejt akciós potenciáljai (piros) IPSP-eket váltanak ki a piramis sejtben (zöld). **B**, A csipkebogyó sejt (bordó: szóma és dendritek; piros: axon) és a 2/3. rétegi piramis sejt (zöld: szóma és dendritek) fénymikroszkópos rekonstrukciója. A piramis sejt disztális dendritágait a csipkebogyó sejt axon terminálisok három helyen közelítették meg olyan mértékben, hogy azokat feltételezett szinapszis helyeknek tekintettük (a, b és c). **C**, Ismétlődő akciós potenciál sorozatokat váltottunk ki a piramis sejtben (zöld) miközben a csipkebogyó sejt kimenetét (piros) ki-be kapcsolgattuk, amelyet minden második piramis sejt akciós potenciál sorozat előtt indítottunk. Mindeközben a piramis sejt disztális apikális dendritágainak számos pontján vizsgáltuk a Ca^{2+} -dinamikát. Az E és F paneleken feltüntetett 1-es mérőhelyen detektált Ca^{2+} -szint változást a fekete vonal jelzi. **D**, A B panel bekeretezett területén egy feltételezett szinapszis helyet jelöltünk (a), ami a csipkebogyó sejtől érkezik a piramis sejt egyik disztális dendritágára (zöld). **E**, A whole-cell elvezetés során készült konfokális felvétel a D panelen mutatott területről (CSB, piros: csipkebogyó sejt szóma; PIR, zöld: piramis sejt dendrit; a: feltételezett szinapszis hely; 1, 2 és 3: Ca^{2+} -dinamika mérési pontok). A humán neuronok citoplazmájában található lipofuscinok jellemzően erős autofluoreszcenciát mutatnak (zöld foltok). **F**, A D panelen látható anatómiai rekonstrukció ráhelyezése az E panel konfokális felvételére. **G**, A piramis sejt tüzelése alatt a csipkebogyó sejt együttes aktiválásával, illetve nélküle mért Ca^{2+} jelek normalizált amplitúdói a piramis sejt dendritjének három különböző mérési helyén (1, 2 és 3). A csipkebogyó sejt bemenet egyidejű aktiválása a piramis sejt visszaterjedő akciós potenciáljaival az 1-es mérési ponton (1) szignifikánsan ($p=0,02$) lecsökkentette a Ca^{2+} jeleket. Az 1-es mérési pont volt a legközelebb ($8 \mu\text{m}$) a feltételezett szinapszishoz, míg a 2-es és 3-as mérési pontokon nem volt mérhető különbség (2: $p=1,0$; 3: $p=0,27$), amelyek $21 \mu\text{m}$ és $28 \mu\text{m}$ távolságra voltak a feltételezett szinaptikus kapcsolattól.

elhelyezkedése 4 sejtpár esetében került pontos feltérképezésre az elvezetéseket követően. A csipkebogyó sejt bemenetek aktiválása csak ott volt képes lecsökkenteni a Ca^{2+} jelek amplitúdóját, ahol a posztszinaptikus dendritek közeli szakaszára ($8 \pm 5 \mu\text{m}$) feltételezett szinapszisok érkeztek a csipkebogyó sejtektől. A csipkebogyó sejteknek nem volt mérhető hatása a dendritek távolabbi pontjain ($21 \pm 14 \mu\text{m}$; **13. D-G ábra**). Az eredmények alapján feltételezhetjük, hogy a csipkebogyó sejtek szegmens-specifikus gátlással szabályozhatják a humán piramissejtek dendritikus Ca^{2+} elektrogenézisét, hozzájárulva a dendritikus jelfeldolgozás folyamatához.

6. DISZKUSSIÓ

Kutatócsoportunk egy eddig ismeretlen idegsejt típust azonosított az emberi agykéreg első rétegében. A csipkebogyó sejtnek nevezett új sejtípust 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. Ismereteink szerint mindeddig sem humán, sem rágcsáló agykéregben nem írtak le hasonló fenotípussal rendelkező interneuron típust.

Munkánkkal párhuzamosan az Allen Institute for Brain Science kutatóintézetben transzkriptom alapú sejtípus csoportosítás során tíz GABAerg interneuron típust azonosítottak a humán agykéreg első rétegében. A mindeddig leírt 8 humán agykérgi GABAerg sejtípushoz képest (Lake és mtsai., 2016) eredményeik már egyetlen rétegen belül is jóval komplexebb képet mutatnak, amelynek hátterében a szekvenálási technikák fejlődése és a megnövelt mintavételi szám állhat. Eredményeiket erősíti Markram és munkatársainak kutatása, amely során más módszerekkel szintén hasonlóan nagyszámú neuron csoportot sikerült azonosítaniuk patkány agykéreg első rétegében: összesen 6 morfológiai és 17 morfo-elektrofiziológiai csoportot (Markram és mtsai., 2015). Az Allen Institute munkatársaival együttműködve összevetettük a transzkriptomikai osztályok és a csipkebogyó sejtek molekuláris profilját. A vizsgálat során átfedést találtunk az egyik transzkriptomikai csoport és a csipkebogyó sejtek expressziós mintázata között: $GAD1^+ CCK^+$, de $CNR1^- SST^- CALB2^- PVALB^-$. Az így beazonosított feltételezett transzkriptomikai csipkebogyó sejt csoport és a morfológiailag azonosított csipkebogyó sejtek kapcsolatát további digitális PCR kísérletekkel erősítettük meg. Az azonosított csipkebogyó sejtek begyűjtött citoplazmájából nyert dPCR eredményeink visszaigazolták a transzkripció adatokat, ezáltal a két csoport sejtjei erősen összeköthetővé váltak. Az amerikai kutatók a csipkebogyó sejt transzkriptomikai csoportot fluoreszcens *in situ* hibridizációval (FISH) vizsgálták tovább, amely során pozitív és negatív marker gén kombinációkkal végeztek hármas jelöléseket a humán mediális temporális lebeny első rétegében. A FISH jelölések minden esetben megerősítették a transzkriptomikai eredményeket, például megfigyeltek $CCK^+ CNR1^- LAMP5^+$, $CCK^+ PDGFRA^+ SOX13^+$ és $CCK^+ TRPC3^+ CPLX3^+$ sejteket is. A különböző hármas jelölések alapján a csipkebogyó sejtek arányát 10-15%-ra becsülték az első rétegi GABAerg neuronok között, amely teljes mértékben megfelel a kutatócsoportunk által korábban kimutatott 13%-os előfordulási aránynak. További hármas

FISH vizsgálatokkal a temporális lebeny mellett a frontális és parietális kérgi területek első rétegében is azonosítottak csipkebogyó sejteket, tehát minden olyan területen, ahol a morfológiai és elektrofiziológiai kísérletek történtek. Lake és munkatársai által azonosított neuron csoportok közül az In4 elnevezésű volt a legnagyobb mértékben megfeleltethető a csipkebogyó sejtek transzkriptomikai csoportjával, amelyeket mind a hat vizsgált kérgi területen (frontális, temporális és vizuális) sikerült azonosítaniuk (Lake és mtsai., 2016).

Az agykéreg sejtjes felépítésének evolúciós konzerváltsága napjainkig kutatott terület. Hagyományosan, a neuron típusok azonosítása a molekuláris markerek, illetve az axon és dendrit morfológia leírásával történt (Freund és Buzsáki, 1996; Kawaguchi és Kubota, 1997; Markram és mtsai., 2015; Tasic és mtsai., 2016). Több sejttípus esetén különböző fajokban is beazonosíthatók a főbb molekuláris és morfo-fiziológiai tulajdonágok (Kisvarday és mtsai., 1990; Olah és mtsai., 2007; Ascoli és mtsai., 2008), azonban ismertek olyan sejttípusok is, amelyek jelentős különbségeket mutatnak fajok között (DeFelipe, 1997; Xu és mtsai., 2004; Lein és mtsai., 2007; Hawrylycz és mtsai., 2012; Varga és mtsai., 2015). Az egyes neuron típusok humán aspektusainak vizsgálata fokozott nehézségekbe ütközik, ami korlátozza az emberi idegsejtek és azok hálózati működésének megismerését (Kisvarday és mtsai., 1990; Molnár és mtsai., 2008, 2016; Oláh és mtsai., 2009; Testa-Silva és mtsai., 2010; Hawrylycz és mtsai., 2012; Verhoog és mtsai., 2013; Miller és mtsai., 2014; Wang és mtsai., 2015; Lake és mtsai., 2016; Szegedi és mtsai., 2016). Az agykérgi sejtek morfológiai, elektrofiziológiai és molekuláris markerek alapján történő csoportosításával évtizedek alatt sem sikerült olyan egységesen elfogadott rendszertant felállítani, ami egyetemesen elfogadott lenne. Munkánk során az Allen Institute kutatóival kombináltuk a humán *post mortem* és műtétekből származó szövetmintákon végzett vizsgálatokat, amely hatékony technikai megoldásnak bizonyult. Az egyidőben akár több ezer sejtől nyert transzkriptomikai adatok statisztikai analízisével elválaszthatók egymástól a különböző neuron csoportok, pontos képet alkotva azok számáról és molekuláris profiljáról, beleértve az egészen ritka sejttípusokat is. A transzkriptomikai csoportok meghatározását követően lehetőség nyílik azok morfológiai és elektrofiziológiai jellemzésével a sejttípusok teljeskörű multimodális feltérképezésére (Yuste és mtsai., 2020). 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. Az elmúlt években egyre több tanulmány születik a transzkriptomikai sejtcsoportok fajok (Hodge és mtsai., 2019), illetve különböző kérgi

területek közti (Tasic és mtsai., 2018) összehasonlításáról. A leírt módszer kombinációval azonosított csipkebogyó sejtekhez hasonló morfológiájú neuronokat a mai napig nem azonosítottak a rágcsálók agykérgében. Mindez nem bizonyítja ezen sejtek teljes hiányát, azonban tekintve a számottevő szakirodalmi adatot, ahhoz, hogy ezek a sejtek mindeddig rejtve maradhassanak vagy rendkívül ritkának vagy kísérleti szempontból „nehezen vizsgálhatónak” kell lenniük. A csipkebogyó sejtek teljes transzkriptomikai profilját megismerve további vizsgálatokra nyílt lehetőségünk, amely során hasonló expressziós mintázatú sejtípusokat kerestünk más fajok agykérgében. Egy korábbi nagyszabású tanulmányban egér elsődleges látókérgi neuronok egysejt RNS szekvenáláson alapuló csoportosítását végezték (Tasic és mtsai., 2016). Összehasonlítva az egér transzkriptomikai csoportokat a csipkebogyó sejtek expressziós mintázatával egyetlen csoport sem mutatott jelentős mértékű átfedést. A legtöbb csipkebogyó sejt-specifikus gén nem egy csoporton belül vagy egyáltalán nem fejeződött ki az egér neuronokban. Annak ellenére, hogy az összehasonlítás humán temporális kéreg és egér látókéreg között történt, az eltérés feltételezhetően nem a regionális különbségekből származik, hiszen morfológiailag azonosított csipkebogyó sejteket több humán agykérgi régióban is azonosítottunk. A csipkebogyó sejtek molekuláris profiljához legközelebb álló rágcsáló neuron csoportot egy újabb tanulmányban azonosították (Hodge és mtsai., 2019). Hodge és munkatársai agykérgi minták mind a hat rétegeből származó több ezer humán és egér agykérgi sejt transzkriptomikai csoportosítását végezték el. A begyűjtött sejtek egysejt RNS szekvenálását, majd csoportosítását követően vizsgálták az egyes sejtcsoportok fajok közti konzerváltságát. Eredményeik alapján az egér agykérgi neurogliaform sejtek a humán csipkebogyó sejtek homológ sejtcsoportjának tekinthetők.

A CCK immunpozitív sejtek rágcsálókban magas CB1 kannabinoid receptor expressziót mutatnak és szerepet játszanak a periszomatikus gátlásban (Katona és Freund, 2012). A csipkebogyó sejtek bouton morfológiája és/vagy kompakt axon arborizációja emlékeztet a macska kéreg mélyebb rétegeiben leírt dendritcélzó és clutch sejtekhez, amelyek elsősorban proximális dendritekhez küldik axon terminálisaikat (Kisvárdy és mtsai., 1985; Tamás és mtsai., 1997). A CCK-pozitív csipkebogyó sejtek azonban nem fejeznek ki CB1 kannabinoid receptort és főként a piramissejtek disztális dendritjein szinaptizálnak. Rágcsáló kéregben Lee és munkatársai az első rétegi gátló neuronhálózatok átfogó feltérképezése során két olyan interneuron típust azonosítottak, amelyek feed-forward interneuron-interneuron szinaptikus jelátvitelben vesznek részt (Lee és mtsai., 2015). Eredményeik alátámasztják azt az elképzelést, amely szerint a rágcsálók első rétegében nem található a csipkebogyó sejtekéhez hasonló homológ útvonal, melyek monoszinaptikus kapcsolatokon keresztül elsősorban a

piramisisejteket célozzák meg. Mindemellett, a rágcsló kéregben az a fokális rétegek közti gátlás sincs jelen, ami a csipkebogyó sejtek kompakt axonfelhőjére korlátozódva a piramisisejt oszlopok disztális dendritjeire érkezik; az egér feed-forward gátló kapcsolatok posztszinaptikus célsejtjeik felé ezzel ellentétben jellemzően vertikális irányban terjednek tovább (Lee és mtsai., 2015).

A rágcsló kéregből hiányzó vagy nagymértékben specializálódott humán neuron típusok feltehetően olyan szinten módosítják a humán agykérgi hálózati működéseket (Markram és mtsai., 2015; Gjorgjieva és mtsai., 2016; Tremblay és mtsai., 2016), hogy azok nem modellezhetők rágcslókban. A csipkebogyó és más dendritcélzó interneuronok különbségeinek pontos feltérképezéséhez további célzott vizsgálatok szükségesek. A csipkebogyó sejtek feltételezhetően különös jelentőséggel bírnak a visszaterjedő akciós potenciálok szabályzásának folyamatában és a beérkező serkentő bemenetek párosításában. A rágcsló dendritek membrán kapacitancia értékeihez képest a humán piramisisejt egy tanulmányok szerint (Eyal és mtsai., 2016) jóval alacsonyabb értéket mutatnak, amely elősegíti az akciós potenciálok visszaterjedését és növeli a serkenthetőséget a humán dendritekben (Verhoog és mtsai., 2013; Kerekes és mtsai., 2014). Annak ellenére, hogy ezeket az eredményeket nem minden esetben erősítették meg (Beaulieu-Laroche és mtsai., 2018), a csipkebogyó sejtek aktivitásának szerepe lehet a piramisisejt akciós potenciálok disztális dendritekbe történő visszaterjedésének csillapításában. Ez a folyamat biztosíthatja azt a kiegészítő gátló kontrollt, amely szükséges lehet a humán dendritek potenciálisan magasabb ingerelhetőségének (Eyal és mtsai., 2016) kiegyensúlyozásához. A csipkebogyó sejtek 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 (Palmer és mtsai., 2012). Az egyedi csipkebogyó sejtekben mért küszöb alatti membrán potenciál oszcillációk legnagyobb csúcsa a théta 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, hasonlóan például az oszcilláció-függő memória konszolidáció folyamatához (Freund és Buzsáki, 1996; Klausberger és Somogyi, 2008). A humánspecifikus neuron típusok szerepe a hálózati funkciók kóros elváltozásainak megértésében is fontos lehet. Például számos csipkebogyó sejt szelektív marker kockázati tényezőként jelenik meg különböző neuropszichiátriai betegségek esetén, többek között a netrin G1 (NTNG1) mutációja Rett szindróma (Borg és mtsai., 2005), a neurotripszin (PRSS12) gén

hibája pedig értelmi fogyatékoság (Molinari és mtsai., 2002) kialakulásához vezethet. 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 (Cavanaugh és mtsai., 2014; Mak és mtsai., 2014).

Az emberi agyműködés megértésének egyik alapvető lépése az agykérgi idegsejt típusok és a köztük lévő hálózati kapcsolatok megismerése. Kutatócsoportunk által azonosított és jellemzett csipkebogyó sejtek egy eddig ismeretlen jól elkülönülő sejtcsoportot alkotnak mind morfológiai, elektrofiziológiai és szinaptikus fenotípusuk, valamint molekuláris profiljuk alapján egyaránt. A csipkebogyó sejtek tanulmányozását és a további humán kérgi sejtípusok szisztematikus feltérképezését a vizsgált sejtszámok növelésével és mélyebb kérgi rétegek bevonásával tervezzük folytatni.

7. ÖSSZEFOGLALÓ

A sejtes szerveződés legösszetettebb struktúrája az emlős agykéreg, amely az agy legmagasabb rendű tevékenységét ellátó része. Az emberi agyműködés megértésének egyik alapvető mérföldköve az agykérgi idegsejt típusok és a köztük lévő hálózati kapcsolatok feltérképezése. 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.

Kísérleteink során célul tűztük ki, hogy emberi asszociációs kérgi minták első rétegi idegsejtjeinek morfológiai, fiziológiai és molekuláris jellemzését végezzük. Munkánkhoz nem patológiás, frontális, parietális és temporális régiókból származó agykérgi mintákon whole-cell patch-clamp elektrofiziológiai elvezetéseket végeztünk, melyek során a sejteket biocitinnel töltöttük. A teljes szomatodendritikus és axonális morfológiával rendelkező idegsejtek fénymikroszkópos vizsgálata során sikeresen azonosítottunk már ismert sejt típusokat, 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 túszerű 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.

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 sejt típus értékeivel

összehasonlítva szignifikáns különbséget mutatott a csipkebogyósejtek boutonok közti átlagos távolsága, teljes axon hossza és az axonok maximális horizontális kiterjedése is.

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 kolecisztokinin immunpozitivitást mutattak, ugyanakkor CB1 kannabinoid receptor negatívak voltak. Továbbá GABA-t és NR2F2 fehérjét expresszáltak, ellenben nem fejeztek ki szomatosztatint, kalretinint, parvalbumint, NOS1-t, NPY-t, kalbindint, és kolin-acetiltranszferázt. Kísérleteinkkel egyidőben a kutatócsoportunkkal kooperáló Allen Institute for Brain Science kutatói transzkriptom alapú sejtípus 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 transzkripció adatokat, amely szerint megegyeztek a két csoport sejtjeiben a vizsgált expresszált és nem expresszált gének.

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 tüzelésükre 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.

Ezt követően a csipkebogyó sejtek helyi mikrohálózatokban betöltött szerepét kezdtük el vizsgálni. Többszörös elektrofiziológiai elvezetéseket 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 szinaptikus kapcsolatban. A csipkebogyó sejtek ritkán szinaptizálnak 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 szinaptizáltak. A posztszinaptikus dendritek további ultrastrukturális vizsgálata a legtöbb esetben piramissejt dendritekre jellemző dendrittüskék és elszórt szimmetrikus szinapszisok 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 szinapszisokat 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 festékekkel, 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+} elektrogenézisét, hozzájárulva a dendritikus jelfeldolgozás folyamatához.

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 rágszáló kéregből hiányzó vagy nagymértékben specializálódott humán neuron típusok feltehetően olyan szinten módosítják a humán agykérgi hálózati működéseket, hogy azok nem modellezhetők rágszálókbán. 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 theta 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 fontos lehet. 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.

8. SUMMARY

Understanding the cellular and circuit organization of the neocortex, the substrate for much of higher cognitive function, has been intensely studied since Ramón y Cajal. However, conservation of cellular and circuit principles in human cortex is assumed but largely untested to date. Indeed, there is evidence for substantial neuronal differences between rodents and human; for example, distinct membrane and synaptic properties and dendritic complexity of human neurons might contribute to human-specific signal processing. With the mouse cortex as the dominant model for understanding human cognition, it is essential to establish whether the cellular architecture of the human brain is conserved or whether there are specialized cell types and system properties that cannot be modeled in rodents.

To date, only a fraction of human neocortical cell types are described, thus, we set out to identify potentially novel cell types of human neocortex focusing on layer 1. We developed a dataset containing whole-cell-recorded, biocytin-filled interneurons in layer 1 of slices of nonpathological human samples of parietal, frontal, and temporal cortices. Unbiased recordings of layer 1 cell types yielded a set of interneurons with complete axo-somato-dendritic recovery. Light-microscopic examination of these cells identified neurons with previously described morphological features, for example, neurogliaform cells, as well as a previously undescribed group of interneurons with large, rosehip-shaped axonal boutons forming very compact, bushy arborizations. Due to the characteristic morphology, we named this cell type as rosehip cell. To our knowledge, interneurons with the phenotype of rosehip cells have not been identified previously in layer 1 of the cerebral cortex. Somata and dendrites of rosehip cells were confined to layer 1, with only distal dendrites occasionally penetrating layer 2. Proximal dendrites and somata of rosehip cells were decorated with stub-like spines. The axon of rosehip cells usually emerged from the basal part of the soma and gave rise to very compact, dense axonal trees predominantly arborizing in layer 1, with tortuous collaterals displaying spindle-shaped boutons with diameters not seen in other types of human layer 1 interneurons in our sample. Targeted recordings increased the number of rosehip cells in our database, and we quantitatively compared axodendritic parameters of randomly selected and three-dimensionally reconstructed rosehip cells to layer 1 neurogliaform and layer 2/3 basket cells. Bouton volume and the number of primary dendrites of rosehip cells were significantly different from those of neurogliaform cells. Maximal vertical extent of axon, total dendritic length, and dendritic node frequency of

rosehip cells differed significantly from those of basket cells. Furthermore, interbouton interval, total axon length, and maximal horizontal extent of the axon were also significantly different.

To reveal the molecular profile of rosehip cells we performed immunohistochemistry on electrophysiologically recorded and anatomically recovered cells for known markers of GABAergic cell types. This identified that rosehip cells were immunopositive for cholecystokinin but negative for CB1 cannabinoid receptor, somatostatin and calretinin. Furthermore, rosehip cells were immunopositive for GABA and for chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II and negative for parvalbumin, neuronal nitric oxide synthase, neuropeptide Y, calbindin, and choline acetyltransferase. In parallel with the immunohistochemistry approach, researchers at the Allen Institute for Brain Science used single-nucleus RNA-sequencing to profile large numbers of nuclei from frozen postmortem brain specimens. Iterative clustering was used to group nuclei with similar transcriptional profiles, thereby identifying ten GABAergic interneuron subtypes in layer 1. The immunohistochemical profile of rosehip cells aligned closely with a single transcriptomic cell type, i5, which was similarly GAD1⁺ CCK⁺ but CNR1⁻ SST⁻ CALB2⁻ PVALB⁻. To more strengthen these results, we performed digital PCR for additional marker genes on cellular content extracted from individual rosehip neurons. As predicted by the transcriptome data, rosehip cells were positive for genes expressed, and low or absent for genes not expressed by cells in that cluster. These data strongly link the anatomically defined rosehip phenotype with a highly distinctive transcriptomic cell type signature that is found in human layer 1.

Anatomically identified rosehip cells responded to long suprathreshold current injections with stuttering or irregular spiking firing patterns when activated from resting membrane potential. Analysis of silent and suprathreshold periods during rheobasic firing of rosehip cells indicated that membrane oscillations and firing of rosehip cells were tuned to beta and gamma frequencies. The standard deviation of interspike intervals was higher in rosehip cells compared to neurogliaform or unclassified interneurons, indicating alternating silent and active periods during rheobasic stimulation. As described previously, human interneurons recorded in layer 1 had a characteristic sag when responding to hyperpolarizing current pulses. However, the amplitude of the sag measured in rosehip cells exceeded that of neurogliaform cells or unclassified interneurons. Rosehip cells showed distinct impedance profiles relative to other layer 1 interneurons in response to current injections, with an exponential chirp. The resonance magnitude of rosehip cells was significantly higher compared to those of neurogliaform cells and unclassified interneurons. In addition, frequencies of maximal impedance in rosehip cells were significantly higher than in neurogliaform cells.

To assess functional connectivity of rosehip cells in the local microcircuit, we established recordings from rosehip cells and then searched for potential pre- and postsynaptic partners without any cell-type preference. Rosehip cells receive monosynaptic excitatory postsynaptic potential (EPSPs) from layer 2/3 pyramidal cells, and receive monosynaptic inhibitory postsynaptic potentials (IPSPs) from neurogliaform and other types of interneurons. None of the tested interneurons with somata in layer 2 were connected to rosehip cells. Rosehip cells rarely innervated postsynaptic interneurons and superficial layer 2 pyramidal cells. Rosehip cell outputs were predominantly directed toward layer 3 pyramidal cells. IPSPs elicited by rosehip cells were mediated by GABA_A receptors, based on experiments showing blockade of IPSPs by application of the GABA_A-receptor antagonist gabazine. Rosehip cells in layer 1 might preferentially target pyramidal cells sending terminal branches of their apical dendrites to layer 1. Indeed, when randomly sampling the output formed by rosehip cells using serial electron microscopic sections, we found that axon terminals exclusively targeted dendritic shafts. Moreover, further ultrastructural analysis of postsynaptic dendrites suggested that these dendrites predominantly belonged to pyramidal cells. We found that rosehip cells were involved in single-cell-activated ensembles detected through disynaptic IPSPs triggered by layer 2 and layer 3 pyramidal cells and through polysynaptic EPSPs triggered by an axo-axonic cell. In addition, rosehip cells also formed homologous electrical synapses between each other and established convergent heterologous electrical synapses with an unclassified layer 1 interneuron.

Preferential placement of output synapses on distal dendritic shafts of pyramidal cells reaching layer 1 suggests that rosehip cells might specialize in the control of dendritic signal processing. We found a correlation between the rise times of IPSPs arriving to the postsynaptic pyramidal cells and the distances of close axodendritic appositions from the somata. In dual recordings of synaptically connected rosehip cells to pyramidal cell pairs, we loaded rosehip cells with Alexa Fluor 594 to label presynaptic axons and filled the postsynaptic pyramidal cells with Oregon Green BAPTA 1 to structurally map the course of dendrites and to measure dendritic Ca²⁺ dynamics. Changes in $\Delta F/F$ in distal branches of the apical dendrites in layer 1 were consistently detected at multiple locations on the postsynaptic neurons, confirming action potential backpropagation into distal apical dendritic branches of human pyramidal cells. We triggered somatically evoked bursts in the pyramidal cells alone, for control, and together with bursts in the rosehip cell, in an alternating fashion. Rosehip inputs simultaneous with backpropagating pyramidal cell action potentials were effective in suppressing Ca²⁺ signals only at sites that were neighboring the putative synapses between the two cells. This suggests

that rosehip cells specialize in providing tightly compartmentalized control of dendritic Ca^{2+} electrogenesis of human pyramidal cells, thereby enforcing inhibitory microdomains in dendritic computation.

Here we combine single-nucleus transcriptomics and slice physiology to study GABAergic neurons in layer 1 of human cortex and provide convergent lines of evidence for identification of a cell type with human-specialized features. Rosehip cells represent a type with a highly distinctive transcriptomic signature; a highly distinctive morphological, physiological, and connectional phenotype; and a strong correspondence between these properties. In this respect, it appears similar to other highly specialized and distinctive cortical cell types, such as chandelier cells. To our knowledge, a similar anatomical cell type has not been described in rodent. A complete comparison of all cortical cell types and assessment of relative similarities between cell types should be possible in the future as more comprehensive transcriptome data become available and linked to other cellular phenotypes in multiple species. Our study is based on a relatively limited number of multimodally characterized cells due to the scarcity of high-quality human samples, and further systematic analyses of human cell types in well-defined cytoarchitectonic areas using increased sample sizes are needed to substantiate further interpretations.

Addition of new human cell types, or specialization of existing types through major modification of cellular features, would be expected to alter circuit function and therefore cannot be studied in rodents. Dissimilarities of rosehip cells and other dendrite-targeting interneurons cannot be fully understood without further experiments testing these differences directly. Rosehip cells may be of particular importance in compartmental control of backpropagating action potentials and their pairing with incoming excitatory inputs. The sharp resonance in the theta-range detected in individual rosehip cells and its potential spread through gap junctions to a rosehip network could phase-selectively interact with long-range inputs similarly to mechanisms suggested (for example) in oscillation dependent memory consolidation. The function of neuron types specific to the human circuit could be important in understanding pathological alterations of network functions. For example, several highly selective markers for rosehip cells have been implicated as risk factors for neuropsychiatric disease, including netrin G1 for Rett syndrome and neurotrypsin for intellectual disability. A better understanding of human cellular and circuit organization may help counteract the current lack of success in translating promising rodent results to effective treatment against human neuropsychiatric disorders.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt, szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Tamás Gábornak, hogy lehetőséget biztosított számomra kutatócsoportjában, ahol az elmúlt évek során magas színvonalú kutatói képzésben részesülhettem.

Köszönettel tartozom munkatársaimnak, akik részt vettek a disszertációm alapjául szolgáló kísérletek kivitelezésében: Oláh Gáspárnak, Dr. Rózsa Mártonnak, Dr. Ozsvár Attilának, Kovács Balázsnak, Bordé Sándornak, Dr. Baka Judithnak, Dr. Kocsis Ágnes Katalinnak, Dr. Faragó Nórának és külön köszönet Dr. Molnár Gábornak, segítőkészségéért, türelméért, akihez mindig fordulhattam kérdéseimmel. Dr. Barzó Pálnak köszönöm, hogy biztosította az emberi agyszövet mintákat. Köszönöm az anatómiai munkák során nyújtott precíz segítséget Ábrahám-Tóth Nellinek, Mezei Leonának és Tóth Évának. Hálával tartozom nekik és a labor többi jelenlegi és volt tagjának: Dr. Oláh Szabolcsnak, Dr. Vámos Enikőnek, Szemenyei Viktornak, Veketyné Várad Margitnak, Averkin Róbertnek, Horváth Jánosnak, Furdan Szabinának, Szóts Ildikónak, Lehóczki Bettinának, Lákovits Rajmundnak, Mihut Norbertnek, Tóth Martinnak, Bakos Emőkének, Törteli Annának, Joana Sandle-nek, Dr. Komlósi Gergelynek, Szemenyeiné Mikite Katalinnak, Piszár Ildikónak, Dr. Báldi Ritának és Lovas Sándornak a motiváló és baráti légkörért, amit kialakítottak a laborban.

Nagyon hálás vagyok Édesanyámnak, Férjemnek, Nagyszüleimnek és az egész családomnak, hogy mindenben mellettem álltak és támogatásukkal, szeretetükkel segítették munkámat.

10. IRODALOMJEGYZÉK

- Ali AB, Deuchars J, Pawelzik H, Thomson AM (1998) CA1 pyramidal to basket and bistratified cell EPSPs: dual intracellular recordings in rat hippocampal slices. *J Physiol* 507:201–217.
- Allman JM, Watson KK, Tetreault NA, Hakeem AY (2005) Intuition and autism: a possible role for Von Economo neurons. *Trends Cogn Sci* 9:367–373.
- Ascoli GA és mtsai. (2008) Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 9:557–568.
- Beaulieu-Laroche L, Toloza EHS, van der Goes M-S, Lafourcade M, Barnagian D, Williams ZM, Eskandar EN, Frosch MP, Cash SS, Harnett MT (2018) Enhanced Dendritic Compartmentalization in Human Cortical Neurons. *Cell* 175:643-651.e14.
- Binzegger T, Douglas RJ, Martin KAC (2004) A quantitative map of the circuit of cat primary visual cortex. *J Neurosci* 24:8441–8453.
- Borg I, Freude K, Kübart S, Hoffmann K, Menzel C, Laccone F, Firth H, Ferguson-Smith MA, Tommerup N, Ropers H-H, Sargan D, Kalscheuer VM (2005) Disruption of Netrin G1 by a balanced chromosome translocation in a girl with Rett syndrome. *Eur J Hum Genet* 13:921–927.
- Braitenberg, V., Schuz A (1991) *Anatomy of the cortex: Statistics and geometry*. Berlin: Springer.
- Brecht M (2012) Neuronal Communication: Firing Spikes with Spikes. *Curr Biol* 22:R633–R635.
- Brodmann K. (1909) *Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaues*. Leipzig J A Barth.
- Buhl EH, Halasy K, Somogyi P (1994) Diverse sources of hippocampal unitary inhibitory postsynaptic potentials and the number of synaptic release sites. *Nature* 368:823–828.
- Butti C, Sherwood CC, Hakeem AY, Allman JM, Hof PR (2009) Total number and volume of Von Economo neurons in the cerebral cortex of cetaceans. *J Comp Neurol* 515:243–259.
- Cardin JA, Carlén M, Meletis K, Knoblich U, Zhang F, Deisseroth K, Tsai L-H, Moore CI (2009) Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. *Nature* 459:663–667.
- Cauli B, Porter JT, Tsuzuki K, Lambolez B, Rossier J, Quenet B, Audinat E (2000) Classification of fusiform neocortical interneurons based on unsupervised clustering. *Proc Natl Acad Sci* 97:6144–6149.
- Cavanaugh SE, Pippin JJ, Barnard ND (2014) Animal models of Alzheimer disease: historical pitfalls and a path forward. *ALTEX* 31:279–302.
- Cobb SR, Buhl EH, Halasy K, Paulsen O, Somogyi P (1995) Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. *Nature* 378:75–78.
- Cragg BG (1967) The density of synapses and neurones in the motor and visual areas of the cerebral cortex. *J Anat* 101:639–654.

- De Marco García N V, Priya R, Tuncdemir SN, Fishell G, Karayannis T (2015) Sensory inputs control the integration of neurogliaform interneurons into cortical circuits. *Nat Neurosci* 18:393–401.
- DeFelipe J (1997) Types of neurons, synaptic connections and chemical characteristics of cells immunoreactive for calbindin-D28K, parvalbumin and calretinin in the neocortex. *J Chem Neuroanat* 14:1–19.
- DeFelipe J (1999) Chandelier cells and epilepsy. *Brain* 122:1807–1822.
- DeFelipe J (2011) The Evolution of the Brain, the Human Nature of Cortical Circuits, and Intellectual Creativity. *Front Neuroanat* 5.
- DeFelipe J és mtsai. (2013) New insights into the classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons. *Nat Rev Neurosci* 14:202–216.
- DeFelipe J, Alonso-Nanclares L, Arellano JI (2002) Microstructure of the neocortex: comparative aspects. *J Neurocytol* 31(3-5):29.
- DeFelipe J, Fariñas I (1992) The pyramidal neuron of the cerebral cortex: Morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Prog Neurobiol* 39:563–607.
- Economo C, Koskinas GN (1925) *Die Cytoarchitektonik der Hirnrinde des erwachsenen Menschen*. Wien Springer Verlag.
- Elston GN (2003) Cortex, Cognition and the Cell: New Insights into the Pyramidal Neuron and Prefrontal Function. *Cereb Cortex* 13:1124–1138.
- Evrard HC, Forro T, Logothetis NK (2012) Von Economo Neurons in the Anterior Insula of the Macaque Monkey. *Neuron* 74:482–489.
- Eyal G, Verhoog MB, Testa-Silva G, Deitcher Y, Lodder JC, Benavides-Piccione R, Morales J, DeFelipe J, de Kock CP, Mansvelder HD, Segev I (2016) Unique membrane properties and enhanced signal processing in human neocortical neurons. *Elife* 5.
- Faragó N, Kocsis ÁK, Lovas S, Molnár G, Boldog E, Rózsa M, Szemenyei V, Vámos E, Nagy LI, Tamás G, Puskás LG (2013) Digital PCR to determine the number of transcripts from single neurons after patch-clamp recording. *Biotechniques* 54:327–336.
- Freund TF, Buzsáki G (1996) Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6:347–470.
- Fricker D, Miles R (2000) EPSP Amplification and the Precision of Spike Timing in Hippocampal Neurons. *Neuron* 28:559–569.
- Galarreta M, Hestrin S (1999) A network of fast-spiking cells in the neocortex connected by electrical synapses. *Nature* 402:72–75.
- Galarreta M, Hestrin S (2001) Spike Transmission and Synchrony Detection in Networks of GABAergic Interneurons. *Science* (80-) 292:2295–2299.
- Gjorgjieva J, Drion G, Marder E (2016) Computational implications of biophysical diversity and multiple timescales in neurons and synapses for circuit performance. *Curr Opin Neurobiol* 37:44–52.
- Goriounova NA, Heyer DB, Wilbers R, Verhoog MB, Giugliano M, Verbist C, Obermayer J, Kerkhofs A, Smeding H, Verberne M, Idema S, Baayen JC, Pieneman AW, de Kock CPJ, Klein M, Mansvelder HD (2018) Large and fast human pyramidal neurons associate with

- intelligence. bioRxiv:1–21.
- Gupta A (2000) Organizing Principles for a Diversity of GABAergic Interneurons and Synapses in the Neocortex. *Science* (80-) 287:273–278.
- Hakeem AY, Sherwood CC, Bonar CJ, Butti C, Hof PR, Allman JM (2009) Von Economo Neurons in the Elephant Brain. *Anat Rec Adv Integr Anat Evol Biol* 292:242–248.
- Hawrylycz MJ és mtsai. (2012) An anatomically comprehensive atlas of the adult human brain transcriptome. *Nature* 489:391–399.
- Hebb DO (1949) *The organization of behavior*. New York Wiley Sons.
- Herculano-Houzel S (2009) The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. *Front Hum Neurosci* 3.
- Hodge RD és mtsai. (2019) Conserved cell types with divergent features in human versus mouse cortex.
- Holmgren C, Harkany T, Svennenfors B, Zilberter Y (2003) Pyramidal cell communication within local networks in layer 2/3 of rat neocortex. *J Physiol* 551:139–153.
- Hubel DH, Wiesel TN (1969) Anatomical demonstration of columns in the monkey striate cortex. *Nature* 221:747–750.
- Jensen EC (2013) Quantitative Analysis of Histological Staining and Fluorescence Using ImageJ. *Anat Rec* 296:378–381.
- Jiang X, Shen S, Cadwell CR, Berens P, Sinz F, Ecker AS, Patel S, Tolias AS (2015) Principles of connectivity among morphologically defined cell types in adult neocortex. *Science* (80-) 350:aac9462–aac9462.
- Jones EG, Peters A (1984) *Cerebral Cortex - Functional Properties of Cortical Cells*. New York: Plenum Press.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, A SS, J HA (2013) *Principles of neural science - Fifth Edition*.
- Karagiannis A, Gallopin T, David C, Battaglia D, Geoffroy H, Rossier J, Hillman EMC, Staiger JF, Cauli B (2009) Classification of NPY-Expressing Neocortical Interneurons. *J Neurosci* 29:3642–3659.
- Katona I, Freund TF (2012) Multiple functions of endocannabinoid signaling in the brain. *Annu Rev Neurosci* 35:529–558.
- Kawaguchi Y, Kubota Y (1997) GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb Cortex* 7:476–486.
- Kawaguchi Y, Kubota Y (1998) Neurochemical features and synaptic connections of large physiologically-identified GABAergic cells in the rat frontal cortex. *Neuroscience* 85:677–701.
- Kerekes BP, Tóth K, Kaszás A, Chiovini B, Szadai Z, Szalay G, Pálfi D, Bagó A, Spitzer K, Rózsa B, Ulbert I, Wittner L (2014) Combined two-photon imaging, electrophysiological, and anatomical investigation of the human neocortex *in vitro*. *Neurophotonics* 1:011013.
- Kisvárdy ZF, Beaulieu C, Eysel UT (1993) Network of GABAergic large basket cells in cat visual cortex (area 18): Implication for lateral disinhibition. *J Comp Neurol* 327:398–415.

- Kisvárday ZF, Gulyas A, Beroukas D, North JB, Chubb IW, Somogyi P (1990) Synapses, Axonal and Dendritic Patterns of GABA- Immunoreactive Neurons in Human Cerebral Cortex. *Brain; a J Neurol* 13:793–812.
- Kisvárday ZF, Martin KAC, Whitteridge D, Somogyi P (1985) Synaptic connections of intracellularly filled clutch cells: A type of small basket cell in the visual cortex of the cat. *J Comp Neurol* 241:111–137.
- Klausberger T, Magill PJ, Márton LF, Roberts JDB, Cobden PM, Buzsáki G, Somogyi P (2003) Brain-state- and cell-type-specific firing of hippocampal interneurons in vivo. *Nature* 421:844–848.
- Klausberger T, Somogyi P (2008) Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science* 321:53–57.
- Lake BB és mtsai. (2016) Neuronal subtypes and diversity revealed by single-nucleus RNA sequencing of the human brain. *Science* 352:1586–1590.
- Lee AJ, Wang G, Jiang X, Johnson SM, Hoang ET, Lanté F, Stornetta RL, Beenhakker MP, Shen Y, Julius Zhu J (2015) Canonical Organization of Layer 1 Neuron-Led Cortical Inhibitory and Disinhibitory Interneuronal Circuits. *Cereb Cortex* 25:2114–2126.
- Lein ES és mtsai. (2007) Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* 445:168–176.
- Lübke J, Feldmeyer D (2007) Excitatory signal flow and connectivity in a cortical column: Focus on barrel cortex. *Brain Struct Funct* 212:3–17.
- Lui JH, Hansen D V., Kriegstein AR (2011) Development and Evolution of the Human Neocortex. *Cell* 146:18–36.
- Mak IW, Evaniew N, Ghert M (2014) Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment. *Am J Transl Res* 6:114–118.
- Markram H és mtsai. (2015) Reconstruction and Simulation of Neocortical Microcircuitry. *Cell* 163:456–492.
- Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C (2004) Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci* 5:793–807.
- McCormick DA, Connors BW, Lighthall JW, Prince DA (1985) Comparative electrophysiology of pyramidal and sparsely spiny stellate neurons of the neocortex. *J Neurophysiol* 54:782–806.
- Miller JA és mtsai. (2014) Transcriptional landscape of the prenatal human brain. *Nature* 508:199–206.
- Mohan H, Verhoog MB, Doreswamy KK, Eyal G, Aardse R, Lodder BN, Goriounova NA, Asamoah B, Brakspear ABC, Groot C, van der Sluis S, Testa-Silva G, Obermayer J, Boudewijns ZSRM, Narayanan RT, Baayen JC, Segev I, Mansvelter HD, de Kock CPJ (2015) Dendritic and Axonal Architecture of Individual Pyramidal Neurons across Layers of Adult Human Neocortex. *Cereb Cortex* 25:4839–4853.
- Molinari F és mtsai. (2002) Truncating neurotrypsin mutation in autosomal recessive nonsyndromic mental retardation. *Science* 298:1779–1781.
- Molnár G, Oláh S, Komlósi G, Füle M, Szabadics J, Varga C, Barzó P, Tamás G (2008)

- Complex events initiated by individual spikes in the human cerebral cortex. *PLoS Biol* 6:e222.
- Molnár G, Rózsa M, Baka J, Holderith N, Barzó P, Nusser Z, Tamás G (2016) Human pyramidal to interneuron synapses are mediated by multi-vesicular release and multiple docked vesicles. *Elife* 5:1–12.
- Mountcastle V. B. (1997) The columnar organization of the neocortex. *Brain* 120 (Pt 4).
- Murayama M, Pérez-Garci E, Nevian T, Bock T, Senn W, Larkum ME (2009) Dendritic encoding of sensory stimuli controlled by deep cortical interneurons. *Nature* 457:1137–1141.
- 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* 461:1278–1281.
- Olah S, Komlosi G, Szabadics J, Varga C, Toth E, Barzo P, Tamas G (2007) Output of neurogliaform cells to various neuron types in the human and rat cerebral cortex. *Front Neural Circuits* 1:4.
- Pakkenberg B, Gundersen HJ (1997) Neocortical neuron number in humans: effect of sex and age. *J Comp Neurol* 384: 312-2.
- Palmer LM, Schulz JM, Murphy SC, Ledergerber D, Murayama M, Larkum ME (2012) The Cellular Basis of GABAB-Mediated Interhemispheric Inhibition. *Science* (80-) 335.
- Picelli S, Faridani OR, Björklund AK, Winberg G, Sagasser S, Sandberg R (2014) Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2. *Nat Protoc* 9:171–181.
- Pouille F, Scanziani M (2004) Routing of spike series by dynamic circuits in the hippocampus. *Nature* 429:717–723.
- Quirk GJ, Beer JS (2006) Prefrontal involvement in the regulation of emotion: convergence of rat and human studies. *Curr Opin Neurobiol* 16:723–727.
- Rakic P (2008) Confusing cortical columns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:12099–12100.
- Ramon y Cajal S (1899) Estudios sobre la corteza cerebral humana. *Corteza Vis Rev Trim Microgr* 4:1–63.
- Ramon y Cajal S (1904) *Textura del Systema Nervioso del Hombre y los Vertebrados*. (Madrid, Spain, Moya), Vol 2.
- Ramon y Cajal S (1911) *Histologie du systeme nerveux de l’homme et des vertebres*.
- Remak R (1838) *Observationes anatomicae et microscopicae de Systematis nervosi structura*. Berolini, Sumtibus et formis Reimerianis.
- Rudy B, Fishell G, Lee S, Hjerling-Leffler J (2011) Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. *Dev Neurobiol* 71:45–61.
- Schuman B, Machold RP, Hashikawa Y, Fuzik J, Fishell GJ, Rudy B (2019) Four unique interneuron populations reside in neocortical layer 1. *J Neurosci* 39:125–139.
- Shepherd GM (2004) *The Synaptic Organization of the Brain* (Shepherd GM, szerk). Oxford University Press.
- Sherrington CS (1907) The Integrative Action of the Nervous System. *Nature* 76:122–122.

- Silberberg G, Markram H (2007) Disynaptic Inhibition between Neocortical Pyramidal Cells Mediated by Martinotti Cells. *Neuron* 53:735–746.
- Sohal VS, Zhang F, Yizhar O, Deisseroth K (2009) Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature* 459:698–702.
- Somogyi P (1977) A specific „axo-axonal” interneuron in the visual cortex of the rat. *Brain Res* 136:345–350.
- Somogyi P, Freund TF, Cowey A (1982) The axo-axonic interneuron in the cerebral cortex of the rat, cat and monkey. *Neuroscience* 7:2577–2607.
- Somogyi P, Kisvárday ZF, Martin KAC, Whitteridge D (1983) Synaptic connections of morphologically identified and physiologically characterized large basket cells in the striate cortex of cat. *Neuroscience* 10:261–294.
- Somogyi P, Klausberger T (2005) Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *J Physiol* 562:9–26.
- Somogyi P, Tamás G, Lujan R, Buhl EH (1998) Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex. *Brain Res Rev* 26:113–135.
- Szabadics J, Lorincz A, Tamás G (2001) β and γ Frequency Synchronization by Dendritic GABAergic Synapses and Gap Junctions in a Network of Cortical Interneurons. *J Neurosci* 21:5824–5831.
- Szabadics J, Varga C, Molnár G, Oláh S, Barzó P, Tamás G (2006) Excitatory effect of GABAergic axo-axonic cells in cortical microcircuits. *Science* 311:233–235.
- Szegedi V, Paizs M, Csakvari E, Molnar G, Barzo P, Tamas G, Lamsa K (2016) Plasticity in Single Axon Glutamatergic Connection to GABAergic Interneurons Regulates Complex Events in the Human Neocortex Bacci A, szerk. *PLoS Biol* 14:e2000237.
- Szentágothai J, Arbib MA (1974) Conceptual models of neural organization. *Neurosci Res Program Bull* 12:305–510.
- Tamas G (2003) Identified Sources and Targets of Slow Inhibition in the Neocortex. *Science* (80-) 299:1902–1905.
- Tamás G, Buhl EH, Lörincz A, Somogyi P (2000) Proximally targeted GABAergic synapses and gap junctions synchronize cortical interneurons. *Nat Neurosci* 3:366–371.
- Tamás G, Buhl EH, Somogyi P (1997) Fast IPSPs elicited via multiple synaptic release sites by different types of GABAergic neurone in the cat visual cortex. *J Physiol* 500 (Pt 3:715–738.
- Tamás G, Somogyi P, Buhl EH (1998) Differentially Interconnected Networks of GABAergic Interneurons in the Visual Cortex of the Cat. *J Neurosci* 18:4255–4270.
- Tamás G, Szabadics J (2004) Summation of unitary IPSPs elicited by identified axo-axonic interneurons. *Cereb Cortex* 14:823–826.
- Tamás G, Szabadics J, Lörincz A, Somogyi P (2004) Input and frequency-specific entrainment of postsynaptic firing by IPSPs of perisomatic or dendritic origin. *Eur J Neurosci* 20:2681–2690.
- Tang Y, Nyengaard JR, De Groot DMG, Gundersen HJG (2001) Total regional and global

- number of synapses in the human brain neocortex. *Synapse* 41:258–273.
- Tasic B és mtsai. (2016) Adult mouse cortical cell taxonomy revealed by single cell transcriptomics. *Nat Neurosci* 19:335–346.
- Tasic B és mtsai. (2018) Shared and distinct transcriptomic cell types across neocortical areas. *bioRxiv*:229542.
- Testa-Silva G, Verhoog MB, Goriounova NA, Loebel A, Hjorth J, Baayen JC, de Kock CPJ, Mansvelder HD (2010) Human synapses show a wide temporal window for spike-timing-dependent plasticity. *Front Synaptic Neurosci* 2:12.
- Tremblay R, Lee S, Rudy B (2016) GABAergic Interneurons in the Neocortex: From Cellular Properties to Circuits. *Neuron* 91:260–292.
- Uematsu M, Hirai Y, Karube F, Ebihara S, Kato M, Abe K, Obata K, Yoshida S, Hirabayashi M, Yanagawa Y, Kawaguchi Y (2008) Quantitative Chemical Composition of Cortical GABAergic Neurons Revealed in Transgenic Venus-Expressing Rats. *Cereb Cortex* 18:315–330.
- Uylings HBM, van Eden CG (1991) Qualitative and quantitative comparison of the prefrontal cortex in rat and in primates, including humans. In, pp 31–62.
- Varga C, Tamas G, Barzo P, Olah S, Somogyi P (2015) Molecular and electrophysiological characterization of GABAergic interneurons expressing the transcription factor COUP-TFII in the adult human temporal cortex. *Cereb Cortex* 25:4430–4449.
- Verhoog MB, Goriounova NA, Obermayer J, Stroeder J, Hjorth JJJ, Testa-Silva G, Baayen JC, de Kock CPJ, Meredith RM, Mansvelder HD (2013) Mechanisms underlying the rules for associative plasticity at adult human neocortical synapses. *J Neurosci* 33:17197–17208.
- Wang B, Yin L, Zou X, Ye M, Liu Y, He T, Deng S, Jiang Y, Zheng R, Wang Y, Yang M, Lu H, Wu S, Shu Y (2015) A Subtype of Inhibitory Interneuron with Intrinsic Persistent Activity in Human and Monkey Neocortex.
- Wozny C, Williams SR (2011) Specificity of synaptic connectivity between layer 1 inhibitory interneurons and layer 2/3 pyramidal neurons in the rat neocortex. *Cereb Cortex* 21:1818–1826.
- Xu Q, Cobos I, De La Cruz E, Rubenstein JL, Anderson SA (2004) Origins of Cortical Interneuron Subtypes. *J Neurosci* 24:2612–2622.
- Yuste R és mtsai. (2020) A community-based transcriptomics classification and nomenclature of neocortical cell types. *Nat Neurosci* 23:1456–1468.
- Zeisel A, Munoz-Manchado AB, Codeluppi S, Lonnerberg P, La Manno G, Jureus A, Marques S, Munguba H, He L, Betsholtz C, Rolny C, Castelo-Branco G, Hjerling-Leffler J, Linnarsson S (2015) Cell types in the mouse cortex and hippocampus revealed by single-cell RNA-seq. *Science* (80-) 347:1138–1142.
- Zemankovics R, Káli S, Paulsen O, Freund TF, Hájos N (2010) Differences in subthreshold resonance of hippocampal pyramidal cells and interneurons: the role of h-current and passive membrane characteristics. *J Physiol* 588:2109–2132.
- Zhu Y (2004) Chandelier Cells Control Excessive Cortical Excitation: Characteristics of Whisker-Evoked Synaptic Responses of Layer 2/3 Nonpyramidal and Pyramidal Neurons. *J Neurosci* 24:5101–5108.