

Két molekula sejtszintű kifejeződése patkány agyszövetben:
a KCC2, mely közvetett módon, a posztzinaptikus GABA_A receptor mediált
sejtválaszban játszik szerepet,
valamint a δ alegységgel rendelkező GABA_A receptor, mely a tónusos áramok
kialakításában vesz részt.

Ph.D. értekezés

Báldi Rita

Témavezető:

Tamás Gábor, Ph.D, D.Sc
egyetemi tanár

Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék,
Szegedi Tudományegyetem
Szeged

Biológia Doktori Iskola

2012

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK.....	2
1. ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS.....	3
1. Az idegsejt felépítése.....	3
2. Az idegsejt ionháztartása.....	3
2.1. Feszültségfüggő ioncsatornák és szerepük.....	4
2.2. Ligandfüggő ioncsatornák és szerepük.....	9
2.2.1. GABA _A receptor család.....	9
2.2.2. Extraszinaptikus GABA _A receptorok: a δ alegységgel rendelkező GABA _A receptor.....	11
2.3. Kation-klorid kotranszporterek és szerepük.....	13
2.3.1. Kálium-klorid kotranszporter KCC2.....	14
2. CÉLKITŰZÉSEK ÉS KÖZREMŰKÖDÉSEK.....	16
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	18
4. EREDMÉNYEK.....	24
I. A KCC2 feltérképezése a hippokampális principális sejtek axo-szomato-dendritikus tengelye mentén.....	24
1. CA1 piramissejtek.....	28
1.1. A citoplazmatikus KCC2 tartalom kvantitatív meghatározása.....	28
1.2. A membránkapcsolt KCC2 sűrűség meghatározása.....	28
1.3. Dendritikus és dendrittüske KCC2 sűrűség összehasonlítása.....	29
2. GD szemcsesejtek KCC2 eloszlása.....	31
II. A GABA _A receptor δ alegységének feltérképezése.....	32
5. DISZKUZZIÓ.....	37
1. Mikrohálózatok és KCC2.....	37
2. KCC2 és glutamáterg bemenetek – serkentő és gátló neurotranszmisszó.....	42
3. Tónusos gátlás és a δ alegységgel rendelkező GABA _A receptor.....	44
6. ÖSSZEFOGLALÓ.....	46
7. SUMMARY.....	49
8. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS.....	52
9. IRODALOMJEGYZÉK.....	53
MELLÉKLETEK.....	64

1. ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS

Az időnek egyetlen oka van: minden nem történhet egyszerre.

Albert Einstein

1. Az idegsejt felépítése

Az idegrendszert felépítő két fő sejtípus a glia és az idegsejt. Az idegsejtek (neuronok) morfológiailag és funkcionálisan is erősen polarizált sejtek. Morfológiailag három fő részre oszthatók, a (1) sejttestre (szóma), ahol a sejtmag és a citoplazmatikus sejtalkotók jelentős része foglal helyet, a sejttestből eredő (2) dendritekre és az egyetlen (legtöbb esetben szomatikus de előfordul dendritikus) eredési hellyel rendelkező (3) axonfára. A dendriteknek lehetnek dendrittüskéi, mint az a piramisisejtekre és szemcsesejtekre jellemző (általában glutamáterg sejtekre), vagy lehetnek simák, lásd az interneuronok többségét. Az axonok általában túlnyúlnak a dendritfán és nagyobb az elágazódásaik száma. A dendrit- és axonfa alakja és elhelyezkedése az idegsejtek csoportosításának egyik alapja. Az idegsejtek közötti kommunikáció, leggyakrabban szinapszisok segítségével, ingerületek felfogásán - feldolgozásán (dendritfa és szóma), valamint továbbításán (axon) keresztül valósul meg, a sejtek passzív és aktív elektromos tulajdonságainak alapján.

2. Az idegsejt ionháztartása

Az idegsejtek passzív elektromos tulajdonságát a membrán kapacitása (C) és konduktanciája (g) határozza meg. Míg az előbbi az ionokra átjárhatatlan lipid kettősrétegből fakad, az utóbbi a membránba ágyazott ioncsatornák jelenlététől / mennyiségétől, és azok állapotától függ. A membrán két oldala közötti eltérő töltéssűrűséget és az eltérő ioneloszlást az ionpumpák és transzporterek alakítják ki: a belső oldal negatív, a külső pozitív töltésű, a köztük mérhető feszültségkülönbség (ΔV) a sejtre jellemző nyugalmi membránpotenciál: interneuronok esetében átlagosan -65mV , piramisisejtek esetében -72mV . A nyugalmi membránpotenciál értékét a Goldman egyenlet adja meg, ami figyelembe veszi a plazmamembránnak a különböző ionokra vonatkozó relatív permeabilitását. Míg intracellulárisan a K^+ ionok, extracellulárisan a Na^+ , Ca^{2+} és

Cl^- ionok mennyisége a meghatározó. Mivel nyugalomban a K^+ ionok extra- és intracelluláris térrész közötti szabad mozgása (ioncsatornákon keresztül) a legjelentősebb, a nyugalmi membránpotenciál a K^+ ion egyensúlyi potenciáljának környékén helyezkedik el, ebből kifolyólag, értékét a K^+ ionok eloszlása, extracelluláris koncentrációja, nagyban befolyásolja. Hogy ezt valamiképpen kompenzálja a szervezet, az extracelluláris K^+ szint erősen szabályozott a gliasejtek aktív K^+ felvétele, és a kapillárismembrán K^+ -ra való impermeabilitása által. A membránpotenciál pozitívabb irányba való eltolódását nevezzük depolarizációnak, negatívabb irányba mozdulását, hiperpolarizációnak. A membránpotenciál változása a membránban helyet foglaló ioncsatornák nyitódásából fakad, a létrejövő ionáramok nagyságát (I) Ohm törvénye írja le: $I = g\Delta V$. Megegyezés szerint a pozitív töltésű ionok sejtbe áramlását bemenő áramnak, kifelé áramlását kimenő áramnak hívjuk.

2.1. Feszültségfüggő ioncsatornák és szerepük

A membrán aktív tulajdonságait a feszültségfüggő ioncsatornák alakítják ki. Nevükből adódóan a membránpotenciál változására aktiválódnak - deaktiválódnak. A voltage-clamp technika felfedezésével (Kenneth Cole) lehetővé vált a membránon átfolyó áramok meghatározása, aminek segítségével Hodgkin és Huxley (1952) megmérte az akciós potenciál során létrejövő Na^+ és K^+ konduktanciák változását, és elsőként következtethettek az ebben szerepet játszó ioncsatornák nyitvatartásának feszültségfüggésére. A patch clamp módszer megjelenése (Hamill et al., 1981) további előrelépést jelentett, amivel egyetlen ioncsatorna áramai, és ennek következtében, a feszültségfüggő ioncsatornák széles skálája is meghatározhatóvá vált.

A membránok aktív elektromos tulajdonságait tehát az idegrendszerben elsőként az axonon írták le az akciós potenciál létrejöttének és terjedésének vizsgálata során, míg a dendriteket ezidőben csak passzív elektromos kábelként modellezték és a következő paraméterekkel jellemezték: specifikus membrán kapacitás (C_m), specifikus membrán rezisztencia (R_m) és axiális rezisztencia (R_i) (Rall, 1959). A dendriteken kialakuló feszültségkülönbség ezek alapján a terjedés során egyre csökken, mivel a létrejött áram egy része a membránon keresztül elszivárog. Rall vizsgálataiból az következik, hogy a disztálisabban elhelyezkedő szinapszisok hatása a sejtek kimenetét tekintve egyre kisebb (Rall, 1977; Spruston et al., 1994). Azonban már korán felmerült az a gondolat is,

miszerint a dendriteknek szerepe lehet a szinaptikus bemenetek felerősítésében, és regeneratív feszültségek kialakításában (Chang, 1951a, 1951b; No and Condouris, 1959), de technikailag csak sokkal később vált elérhetővé ezek detektálása (Llinas and Sugimori, 1980).

A feszültségfüggő ioncsatornák elhelyezkedésének és tulajdonságainak kutatása aktív területté vált, mivel jelentősen befolyásolják az idegsejtek plasztikus és integratív funkcióit. Elektrofiziológiai és képalkotó módszerek segítségével (feszültségérzékeny festékek, Ca^{2+} indikátorok) kezdetben az akciós potenciál kialakulásának térbeli meghatározása felé fordult a figyelem, ami a különböző típusú idegsejteknél bizonyos mértékű változatosságot mutatott. A gyrus dentatus szemcsesejtjei esetében például a proximális axonon (Kole et al., 2008; Schmidt-Hieber et al., 2008), az agykérgi 5. rétegi piramissejteknél, és a hippocampális CA3 piramissejteknél a disztális axon iniciális szegmentumon (Palmer and Stuart, 2006; Kole et al., 2007; Meeks and Mennerick, 2007; Shu et al., 2007), míg a Purkinje sejteknél az első Ranvier befűződésnél (Clark et al., 2005) jön létre a sejtek tüzelése, valamint a létrejött akciós potenciálok formája és a tüzelési mintázat is sejtípusonként változik. Ebben a heterogenitásban vehet részt az eltérő alegységekkel rendelkező Na^+ és K^+ csatornák változatos eloszlása (Lorincz és Nusser, 2008). Míg tradicionálisan az akciós potenciálokra egyszerű bináris jelekként tekintettek, amelyek a változó szomatodendritikus bemeneteket 'minden vagy semmi' formában frekvenciájuk és időbeli mintázatuk alapján továbbítják, egyre több bizonyíték van arra vonatkozólag, hogy ennél sokkal összetettebb funkciókkal is bírnak (Debanne, 2004).

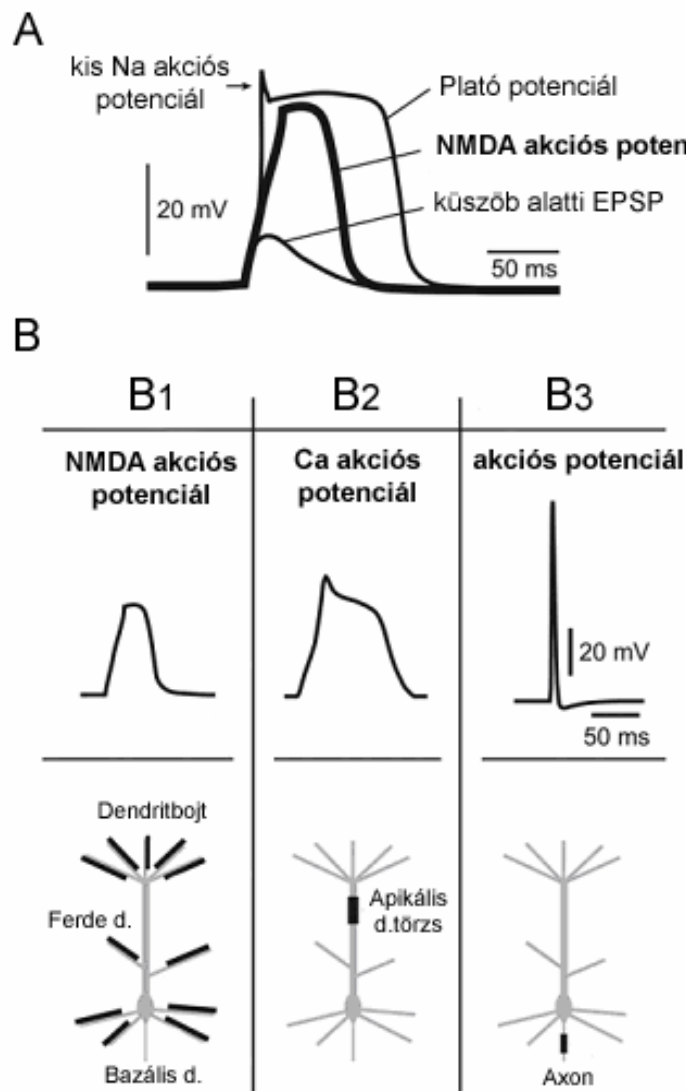
A dendriteken leírtak feszültségfüggő Na^+ , K^+ és Ca^{2+} csatornákat, amik lehetővé teszik az axo-szomatikus akciós potenciálok aktív dendritikus visszaterjedését (Stuart and Sakmann, 1994; Magee and Johnston, 1995; Spruston et al., 1995; Waters et al., 2005). Mára úgy tűnik, hogy minden idegsejt típusnak megvan a rá jellemző feszültségfüggő ioncsatorna készlete, ami az egyedfejlődés során változik (Mills et al., 1994; Maletic-Savatic et al., 1995; Miyashita and Kubo, 1997; Zhu, 2000), és neurotranszmitterek által is szabályozódik (Johnston et al., 1999), így az akciós potenciál visszaterjedése is sejtípusonként változik: aktivitás-függő mintázatot mutathat, mint a CA1 piramissejtek esetében (Spruston et al., 1995), vagy mint néhány interneuronnál, tüzelési frekvenciától függetlenül alig változik a visszaterjedés során (Martina et al., 2000; Hu et al., 2010).

Az axo-szomatikus Na^+ akciós potenciálok dendritekbe történő hatolása lehetővé teszi a sejt számára a bemeneti és kimeneti jeleinek egyidejű észlelését, és így részt

vesznek a tüzelés idejétől függő szinaptikus plaszticitásban (Lisman and Spruston, 2005; Sjostrom et al., 2008). Mindemellett bizonyos idegsejtekben a visszaterjedő akciós potenciálnak szerepe lehet a dendritikus neurotranszmitter felszabadításában (Hausser et al., 1995; Bischofberger and Jonas, 1997; Chen et al., 1997), valamint közreműködnek a dendritikus akciós potenciálok (lokális regeneratív feszültségek) kialakításában (Herreras, 1990; Kim and Connors, 1993; Schiller et al., 1997; Kamondi et al., 1998). Piramissejteknél ebben Na^+ - és Ca^{2+} konduktanciáknak van szerepe, melyek jobbra a proximális és apikális dendritekre jellemzőek (Golding and Spruston, 1998; Golding et al., 1999).

A piramissejtek vékony dendritágaira: a ferde, a bazális dendritekre és a dendritbojtra specifikus regeneratív események az NMDA akciós potenciálok („N-metil-D-aszpartát”, ionotróp glutamát receptor függő akciós potenciálok, **1. ábra**). Ezek 10-50 szomszédos glutamáterg bemenet egyidejű aktiválásával jönnek létre, és az adott dendritszakaszt több 100 ms-on keresztül egy megemelkedett, 40-50 mV-os depolarizált állapotba hozzák, ami kedvezőbb körülményt alakít ki az aktív bemenetek interakciójához, rövid ideig és hosszan tartó szinaptikus változások létrejöttéhez. Ha az NMDA akciós potenciál a proximális dendriten jön létre, akkor rendszerint az egész sejttest depolarizált állapotba kerül, míg a disztális válasz többnyire helyi hatást eredményez (Antic et al., 2010). A vékony dendriteken létrejövő tisztán NMDA regeneratív potenciálokról akkor beszélünk, mikor a két fő feszültségfüggő konduktanciát (Na^+ - és Ca^{2+} -) leblokkoljuk (tetrodotoxin és Cd^{2+} segítségével), és lokálisan a glutamát koncentrációja elér egy bizonyos küszöböt. Fiziológias körülmények között a küszöb feletti glutamáterg stimulus az NMDA potenciál mellett aktiválja a Na^+ és Ca^{2+} csatornákat, ami egy összetett regeneratív feszültséget eredményez, ezt nevezzük „plató potenciálnak”. Modellszimulációk alapján a plató potenciál egy regeneratív feszültség láncolatként jöhet létre: az AMPA (szintén glutamát-) receptorok aktivációja egy gyors Na^+ -feszültségválaszt eredményez, ami a lassabb, Ca^{2+} -mediált regeneratív potenciált alakítja ki, és aktiválódik a teljes NMDA akciós potenciál (Schiller et al., 2000). A kezdeti Na^{2+} válasz azonban nem elegendhetetlen feltétele a glutamát indukált dendritikus akciós potenciáloknak. A vékony dendritágaknak csak töredéke (5. rétegi agykérgi piramissejtek bazális dendriteinek 10-25%-a) tartalmaz ehhez megfelelő mennyiségű feszültségfüggő Na^+ csatornát (Milojkovic et al., 2005b; Nevian et al., 2007; Acker and Antic, 2009). Meghatározó tulajdonságuk, hogy a glutamáterg stimulus intenzitásának növekedésével a plató potenciál amplitúdójával

ellentétben annak időtartama növekszik, ami lineáris összefüggést eredményez a sejt kimeneti akciós potenciáljainak számával (Milojkovic et al., 2005a). Mivel a piramis sejtekre érkező szinapszisok majd 85%-a a bazális, a ferde dendriteken és a dendritbojt területén található meg (Larkman, 1991), valamint a serkentő bemenetek elhelyezkedése dendrittűskékhez kötött, ahol a hosszantartó szinaptikus változások, mint az LTP („long term potentiation”, szinaptikus megerősödés) és LTD („long term depression”, szinaptikus gyengülés) is végbemennek (Emptage et al., 1999; Luscher et al., 2000; Yuste and Bonhoeffer, 2001; Nimchinsky et al., 2002; Matsuzaki et al., 2004), a piramis sejtek esetében valószínűleg ezeknek a dendritágaknak van legnagyobb szerepe a tanulás és a memóriafolyamatok sejtszintű mechanizmusában (Yang et al., 2009). A glutamáterg bemenetek (serkentő posztzinaptikus potenciálok, EPSPk) dendritikus összegződésére vonatkozóan Rall volt az első, aki feltételezte, hogy az azonos dendritágra érkező jelek szublineárisan, míg a különbözőkre érkezők lineárisan összegződnek (Rall, 1964). A CA1 piramis sejteken végzett mérések ezt alátámasztották (Cash and Yuste, 1999), a disztális dendritektől eltekintve az EPSPk közel lineáris összegződést mutattak. Modelltanulmányok (Poirazi et al., 2003b, 2003a), melyeket kísérleti eredmények is igazoltak (Polsky et al., 2004; Losonczy and Magee, 2006), egy „két lépcsős hálózati” modellt javasolnak, amelyben a dendritágakra beérkező EPSPk szublineárisan integrálódnak, majd a szómához közel megtörténik a befutó jelek lineáris integrációja. Noha az EPSPk összegződéséről számos adat áll rendelkezésre, a glutamáterg és gátló, GABAerg bemenetek egymásra hatásáról még keveset tudunk. A GABAerg bemenetek kétféle gátlást váltanak ki: az egyik a hiperpolarizáló válasz (gátló posztzinaptikus potenciál, IPSP) (Rall, 1964; Blomfield, 1974), amely a depolarizációval lineárisan összegződik, a másik az EPSPk amplitúdójának nemlineáris csökkentése a glutamáterg áramok söntölése által (Fatt and Katz, 1953; Rall, 1964; Blomfield, 1974). Söntölésen azt értjük, mikor GABAerg hatásra megváltozik a membrán konduktanciája anélkül, hogy önmagában bármi feszültségváltozás létrejönne. Ennek hatására a szinaptikus serkentő áramok a bemenő ellenállás csökkenésének következtében kisebb feszültségválasz kialakítására képesek. Teoretikus és modelltanulmányokból az következik (Koch et al., 1983; Koch, 1999), hogy a söntölés akkor a legeredményesebb, mikor a gátló bemenetek a sejttest és a glutamáterg szinapszisok közötti dendritszakaszon helyezkednek el, valamint kvantitatív analízisre is lehetőséget kínálnak a különböző típusú bemenetek közötti távolság ismeretében (Hao et al., 2009).



1. ábra: Az idegsejt minden része közreműködik valamilyen regeneratív feszültség (akciós potenciál) kialakításában. **A,** A piramissejtek vékony dendritjein (bazális-, ferde- és bojt dendritek) a gyenge glutamáterg bemenetek EPSP-szerű depolarizációt váltanak ki („küszöb alatti EPSP”). Erősebb (küszöb feletti) bemenetek rendszerint dendritikus „plató potenciált” indukálnak. A plató potenciálokra jellemző egy gyors felfutási szakasz, kezdeti Na^+ akciós potenciál, egy plató fázis, és egy hirtelen összeomlás a plató fázis végén. A glutamát-indukált plató potenciál különböző dendritikus konduktanciák eredménye. A legfőbb résztvevője az NMDA receptor áram. Tiszta NMDA akciós potenciált a Na^+ és Ca^{2+} csatornák blokkolásával kapunk (Schiller et al., 2000). **B,** Három regeneratív feszültség (akciós potenciál) alakja egymás mellett, méretarányosan (**B1-B3**). Az idegsejt azon része, ahol a regeneratív jel indukálódik, a sematikus ábrán feketén van jelölve (iniciációs hely). Az agykérgi piramissejt fő részei: a sejttest, apikális-,

ferde-, bazális dendritek és a dendritbojt. **B1**, Az NMDA akciós potenciál 50-100 ms-ig tart, és az apikális dendritbojton, ferde dendriteken valamint a bazális dendriteken indukálódik. **B2**, A Ca^{2+} akciós potenciálok amplitúdója és időtartama valamivel nagyobb, mint az NMDA akciós potenciáloké. Gyakran előfordulnak a Ca^{2+} akciós potenciál iniciációs helyen, az apikális dendrittrözsön. **B3**, A szomatikus akciós potenciál (AP) az axon-iniciális szegmentumon jön létre, ahonnan visszaterjed a dendritfába (Stuart et al., 1997). A visszaterjedő akciós potenciál dendritikus alakja az ábrán nincs feltüntetve (Antic, 2003; Nevian et al., 2007; Zhou et al., 2008; Holthoff et al., 2010). Az akciós potenciál iniciációs helyek Larkum és munkatársai (2009) cikkén alapulnak. Az ábra Antic és munkatársainak (2010) cikkábrája alapján készült.

2.2. Ligandfüggő ioncsatornák és szerepük

A ligandfüggő ioncsatornák az idegsejtek közötti neurotranszmisszióban vesznek részt, ligand kötődésével nyitódnak vagy záródnak, szinaptikus és extraszinaptikus helyen egyaránt előfordulnak. Közéjük tartoznak többek között a GABA_A -, glicin-, nikotinos acetilkolin receptorok, valamint a szerotonin- és glutamáterg receptorok egy része. Alegységeik felépítése hasonló, nagy extracelluláris amino terminális tartalmazza a ligandkötő helyet, rendelkeznek egy nagy intracelluláris doménnel és négy transzmembrán doménnel. A receptorok többsége heteropentamer (5 alegységű), a glutamáterg ioncsatornák tetramerek (4 alegységűek). Aktivációjukon keresztül a preszinaptikusan felszabadult neurotranszmitter kémiai jelét alakítják elektromos válasszá.

2.2.1. GABA_A receptor család

A GABA_A receptor alegységeknek 7 családja van, melyek további izoformokkal rendelkeznek: α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ϵ , θ , és π . A leggyakoribb felépítés a $2\alpha 2\beta\gamma$ alegységekből tevődik össze, a γ alegység gondoskodik a receptor szinaptikus elhelyezkedéséről. A γ -t nem tartalmazó, jobbra extraszinaptikus receptorok nagyobb agonista affinitást mutatnak (Moss és Smart, 2001).

A γ -aminovajsav (GABA) a központi idegrendszer legfőbb gátló neurotranszmittere, amely az ionotróp GABA_A - és a metabotróp GABA_B receptorokon keresztül fejti ki hatását. A GABA_A receptorok Cl^- és HCO_3^- ionokra permeábilis csatornák, melyek a szinaptikus résbe felszabadult neurotranszmitter kötődésével gyors, néhány ezredmásodperces, fázikus posztzinaptikus választ alakítanak ki a GABA_A receptorok

reverzpotenciálnak megfelelően. Az extracelluláris GABA-koncentráció a szinaptikus térből kijutott GABA mennyiségétől és a GABA transzporterek aktivitásától függ, ahol eléri a tónusos gátlásban részt vevő GABA receptorokat. A hálózati aktivitás tehát befolyásolja a tónusos gátlást, ami az idegsejtek bemenő konduktanciája és a membrán időállandójának megváltoztatása által szabályozza a sejt bemeneti és kimeneti jele közötti kapcsolatot (Semyanov et al., 2004). A GABA_B receptorok mind pre- és posztzinaptikusan jelen vannak. Preszinaptikusan a neurotranszmitter-felszabadulást blokkolják a Ca²⁺ csatornák zárásával, és hosszú, néhány tizedmásodperces gátlást váltanak ki a befelé rektifikáló K⁺ csatornák aktiválásával (Mann és Paulsen, 2007). Az idegrendszerben egyedülálló módon a neurogliaform sejtek egyetlen akciós potenciáljukkal képesek környezetük oly mértékű GABA elárasztására, hogy ott elérik az extraszinaptikus GABA_A és GABA_B receptorokat is (Tamas et al., 2003; Olah et al., 2009). A GABA_A és GABA_B receptorok által kiváltott válaszoknak a már fentebb említett kétféle posztzinaptikus hatása van: a membránkonduktancia növekedésével létrejött söntölés, és az ionáramok által keletkezett membránpotenciál-változás. A tisztán söntölő hatás mindig gátló, mivel az egyidejűleg aktiválódó serkentő bemenetek depolarizáló válaszát csökkenti (Staley és Mody, 1992), és szűkíti azt az idő- és térbeli intervallumot, amelyben a beérkező jelek integrációja megtörténhet, csökkentve az esélyét az akciós potenciál létrejöttének. A söntölés csupán addig tart, míg az ebben részt vevő ioncsatornák nyitva vannak. A GABA_A áramok viszont a membránpotenciálhoz viszonyított reverzpotenciáljuktól függően lehetnek hiperpolarizálóak és depolarizálóak is, míg a GABA_B sejtválaszok csak hiperpolarizálóak. A GABA_A reverzpotenciál az interneuronok esetében általában kevésbé negatív, mint piramisneuronoknál, és közel áll az akciós potenciál küszöbhöz, így rajtuk a gyors GABA_A válasz legfőbb hatása a „söntölő gátlás”, ami a sejt nagyobb tüzelési frekvenciáját, és a membránpotenciál akciós potenciál küszöbhöz történő virtuális rögzítését idézi elő (Vida et al., 2006; Bartos et al., 2007). Mindez annak köszönhető, hogy legalábbis néhány interneurontípus esetében, ellentétben az agykérgi idegsejtek többségével, az intracelluláris kloridionhomeosztázis az egyedfejlődés során nem változik (Banke és McBain, 2006).

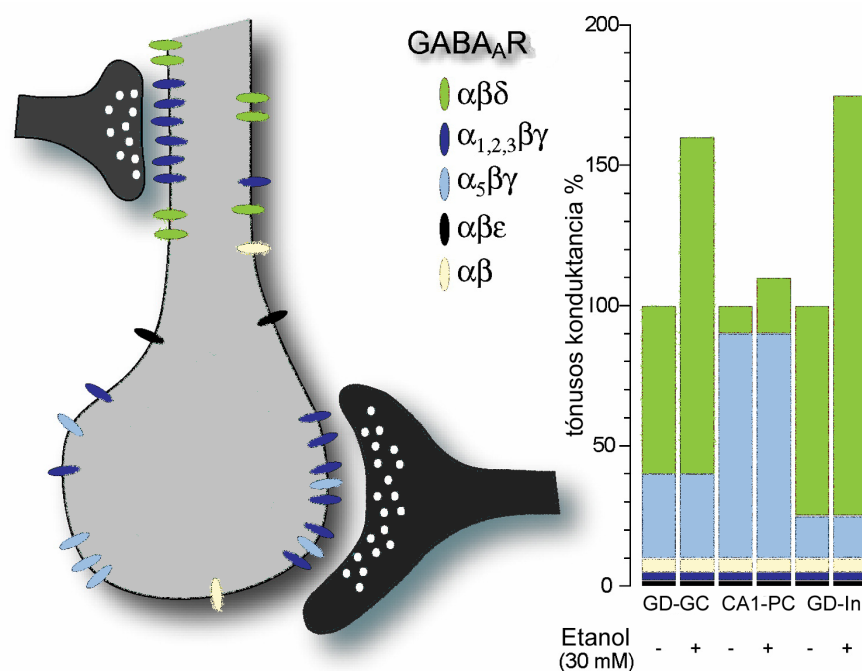
2.2.2. Extraszinaptikus GABA_A receptorok: a δ alegységgel rendelkező GABA_A receptor

A tónusos áramok jelentős szerepet játszanak a hálózati aktivitás szabályozásában (Semyanov et al., 2003), és az információfeldolgozásban (Mitchell és Silver, 2003; Chadderton et al., 2004).

A tónusos GABA_Aerg válasz kialakításához elengedhetetlen a GABA_A receptorok nagy agonista affinitása, ami lehetővé teszi az extracelluláris térbeli néhány mikromólos koncentrációjú GABA megkötését (Nyitrai et al., 2006). Ez éles ellentétben áll a szinaptikus elhelyezkedésű receptorokkal, ahol a millimólos koncentráció a kis affinitásuk ellenére kifejti hatását (Mozrzymas et al., 2003).

A δ alegységgel rendelkező GABA_A receptort (a továbbiakban „GABA_Aδ”-val jelölöm a gördülékenység kedvéért) számos tulajdonsága teszi igen hatékonná a tónusos gátlásban való közreműködéséhez. Egyrészt extraszinaptikus elhelyezkedésű (Nusser et al., 1998), rendkívül nagy affinitást mutat a GABA-hoz, és annak folyamatos jelenléte mellett is alacsony deszenzitizációt mutat (Haas és Macdonald, 1999; Wohlfarth et al., 2002; Bianchi és Macdonald, 2003). Nagy affinitása mellett azonban kicsi a GABA csatornanyitó hatékonysága, ez arra utal, hogy a szabályozása a hatékonyságának változtatásán keresztül valósul meg, amiben különböző neuro- és kortikoszteroidok vesznek részt (Majewska et al., 1986; Wohlfarth et al., 2002; Bianchi és Macdonald, 2003; Belelli és Lambert, 2005). Fiziológiai és farmakológiai módszerekkel, nullmutánsokat is felhasználva kimutatták, hogy az idegrendszer számos sejtípusában, köztük a kisgyei szemcsesejtekben (Stell és Mody, 2002), a gyrus dentatus szemcsesejtjeiben (Stell és Mody, 2002) és molekuláris rétegi interneuronjaiban (Glykys és Mody, 2007b), a thalamikus neuronokban (Cope et al., 2005; Bright et al., 2007), és a 2/3. rétegi piramissejtekben (Drasbek és Jensen, 2006) is a GABA_Aδ receptorok dominálnak a tónusos konduktanciák kialakításában. A CA1, CA3 (Caraiscos et al., 2004; Cheng et al., 2006; Glykys és Mody, 2006; Prenosil et al., 2006; Glykys és Mody, 2007b) és 5. rétegi agykérgi piramissejtek (Yamada et al., 2007) esetében a GABA_Aα5 receptor tölti be ezt a szerepet, ami mellett a hippocampális piramissejteken még megtalálhatóak az α és β alegységet tartalmazó receptorok, melyek nagy érzékenységet mutatnak a Zn²⁺ ionra (Mortensen és Smart, 2006), ami a hippocampusz területén jelentős mennyiségben előfordul (Frederickson et al., 2005). A CA3 piramissejteken továbbá előfordulnak GABA_Aε receptorok, melyek ligand jelenléte nélkül

is közreműködnek a tónusos áramok létrejöttében (McCartney et al., 2007) (2. ábra). Ha összehasonlítjuk a tónusosan és fázikusan aktív receptorok által közvetített áramokat, ezek aránya mintegy 3-5:1 a tónusos áramok javára (Mody and Pearce, 2004; Cavalier et al., 2005), ami jelzi, hogy jelentős befolyással bírnak a sejt bemenete és kimenete közötti kapcsolatra (Mitchell and Silver, 2003; Chadderton et al., 2004; Semyanov et al., 2004; Cavalier et al., 2005). A tónusos áramokban bekövetkező változások funkcionális következményeit még csak most kezdjük megismerni. Az ovarialis ciklus során változik a GABA_A receptor expressziója (Maguire et al., 2005; Lovick, 2006), a stresszválaszhoz kötött neuroszteroidokra (Stell et al., 2003) és az etanolra is nagy érzékenységet mutat (Mody et al., 2007), hatással van a kognitív funkciókra (Caraiscos et al., 2004), és egyes epilepszia modelleknek is részese (Peng et al., 2004; Zhang et al., 2007). Összefoglalóként lásd Glykys és Mody cikkét (2007a).

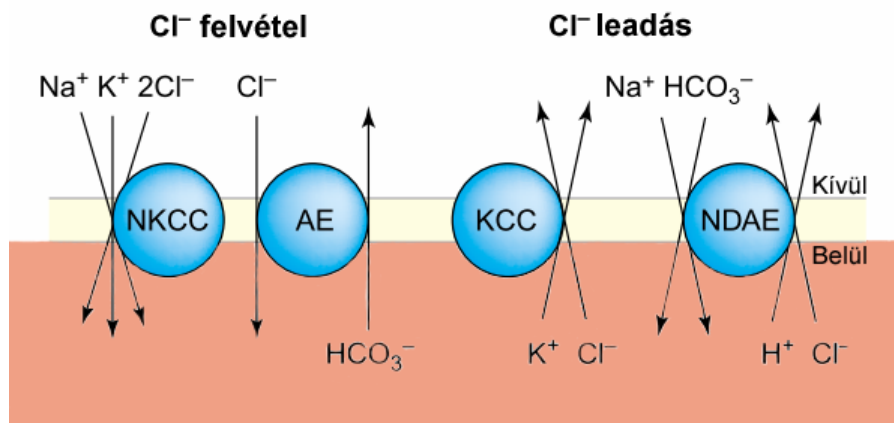


2. ábra: A tónusos konduktanciák kialakításában részt vevő GABA_A receptorok illusztrációja. A különböző alegység-összetételű receptorok más-más színnel vannak jelölve. A sejt felszíni relatív eloszlásuknak, és az aktivációjukhoz szükséges specifikus körülményeknek megfelelően bármely sejtben a különböző receptorok kombinációja felelős az összetett tónusos konduktancia kialakításához. A jobb oldali panel ezen receptorok hipotetikus oszlopdiagramja 3 idegsejt-típus esetében: gyrus dentatus szemcsesejt (GD-GC), CA1 piramissejt (CA1-PC) és gyrus dentatus molekuláris rétegi interneuron (GD-In). A különböző sejteken az eltérő alegységű

receptorok eltérő mértékben vesznek részt a tónusos áramok létrehozásában. Az etanol szelektíven modulálja a δ alegységet tartalmazó receptor hatását (Mody et al., 2007). Az ábra eredetije Glykys és Mody (2007a) cikkében található.

2.3. Kation-klorid kotranszporterek és szerepük

A kloridionhomeosztázis kialakításában kation-klorid kotranszporterek vesznek részt (Payne et al., 2003), amelyeken keresztül létrejövő iontranszport nem jár nettó töltésmozgással, elektroneutrálisak, és másodlagosan aktívak, működésükhöz a Na^+/K^+ ATP-áz biztosítja az energiát. A transzporterek három nagy csoportja tartozik ebbe a családba, a Na^+/Cl^- kotranszporterek (NCC), amelyek az idegszövetben nem fordulnak elő, a $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ kotranszporterek (NKCC) és a K^+/Cl^- kotranszporterek (KCC). Míg normál fiziológiás körülmények között a Na^+/Cl^- kotranszporterek és a $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ kotranszporterek a sejtbe befelé hajtják a kloridionokat, a K^+/Cl^- kotranszporterek a sejtől kifelé transzportálják őket. Egyéb transzporterek is részt vesznek a kloridion-háztartás kialakításában, úgy, mint a Na^+ -függő- és Na^+ -független anioncserélők, melyek a Cl^- iont HCO_3^- ionra cserélik (Romero et al., 2000; Grichtchenko et al., 2001) (3. ábra).



3. ábra: Másodlagosan aktív Cl^- kotranszporterek és működésük. Fiziológiai körülmények között a Cl^- felvétel $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ kotranszporterek (NKCC) és a Na^+ független anioncserélők (AE) által szabályozott, míg a K^+/Cl^- kotranszporterek (KCC) a Cl^- iont a sejtől kifelé transzportálják. Mivel a HCO_3^- ionok a Na^+ függő- (NDAE) és Na^+ független anioncserélők szubsztrátja, így résztvesznek az intracelluláris pH beállításában is. Az ábra (Payne et al., 2003) cikkéből származik.

2.3.1. Kálium-klorid kotranszporter KCC2

A K^+Cl^- kotranszporterek négy fajtája közül az idegsejtspecifikus K^+Cl^- kotranszporter KCC2-nek van legnagyobb szerepe a kloridion fordulási potenciáljának meghatározásában. Az egyedfejlődés során a KCC2 molekula lényeges expressziós változáson megy keresztül, ami a posztszinaptikus sejten létrehozott GABAerg sejtválaszban nyilvánul meg. Az újszülött patkány idegsejtjeiben két hét elteltével a KCC2 mennyisége jelentősen megemelkedik, míg az NKCC1 szintje lecsökken, ami az addigi GABA által kiváltott depolarizáló választ hiperpolarizálóvá alakítja, ezzel létrehozza a felnőtt idegrendszerre jellemző GABAerg gátlást (Ben-Ari et al., 1989; Plotkin et al., 1997; Clayton et al., 1998; Rivera et al., 1999; Wang et al., 2002; Dzhala et al., 2005).

Különböző idegrendszeri betegségek (pl. epilepszia, trauma) esetében azonban a GABAerg hiperpolarizáló válasz lecsökken, sőt depolarizálóvá is válhat (Payne et al., 2003). A kloridion koncentráció pontos szabályozásában fontos szerepet tölthet be a KCC2 gyors, ~20 perces körforgása is, ami lehetővé teszi a folyamatosan változó körülményekhez való gyors adaptációt (Wardle and Poo, 2003; Rivera et al., 2004). A KCC2 molekula érzékenységet mutat a hálózati aktivitásra. A posztszinaptikus sejt tartós tüzelése egy Ca^{2+} függő útvonalon keresztül a KCC2 funkciójára gyakorolt hatásával lecsökkenti a ráérkező GABAerg gátlást (Fiumelli et al., 2005), míg preszinaptikus GABAerg interneuronok nagyfrekvenciás stimulációja a posztszinaptikus piramissejten HCO_3^- -mediált extracelluláris K^+ szint növekedése által előidézett depolarizáló GABAerg sejtválaszhoz, és a Cl^- ionok intracelluláris felhalmozódásához vezet (Kaila et al., 1997; Smirnov et al., 1999; Ruusuvuori et al., 2004). Ennek oka a $GABA_A$ receptorokon szintén átjutó HCO_3^- ion Cl^- ionokkal szembeni lényegesen pozitívabb fordulási potenciálja (~ -10 mV vö. ~ -70 mV), valamint a pH-beállításban betöltött funkciója. Az extracelluláris K^+ ionkoncentráció megemelkedése egy hosszan elnyúló, nem szinaptikus depolarizációt eredményez, ami szintén képes LTP kialakítására.

A KCC2, a GABAerg sejtválaszban betöltött szerepe mellett, már pusztán jelenlétével is részt vesz a piramissejtek dendrittüskéinek normális fejlődésében (Li et al., 2007; Fiumelli et al., 2012), amelyekre szinte kizárólag glutamáterg bemenetek érkezők. Ez a kettős funkció kapcsolatot jelez a gátló és serkentő jelátvitel között.

A ligand- és feszültség függő ioncsatornák sejt felszíni elrendeződéséről számos adattal rendelkezünk (Nusser and Somogyi, 1997; Nusser, 2009), az iontranszporterek és kicserélő molekulák elhelyezkedése azonban kevésbé ismert. Nagy felbontású immunolokalizációt használva kutatócsoportunk korábban kimutatta agykérgi piramissejteken az axon iniciális szegmentum sejttesthez viszonyított relatív KCC2 hiányát. Az axon iniciális szegmentum plazmamembránján jelenlévő alacsony KCC2 szint hozzájárul a periszomatikus GABA_A receptor mediált posztszinaptikus sejt válaszok eltérő reverzpotenciáljaihoz (Szabadics et al., 2006; Khirug et al., 2008; Glickfeld et al., 2009; Woodruff et al., 2009). A piramissejtek dendritikus régiójában a potenciálisan különböző KCC2 tartalom magyarázatot adhat a posztszinaptikus GABA_Aerg válasz vizsgálatával kapott eltérő eredményekre (Alger and Nicoll, 1979; Andersen et al., 1980; Perkins and Wong, 1997; Gullledge and Stuart, 2003; Glickfeld et al., 2009), ehhez azonban a KCC2 dendritikus eloszlása meghatározásra vár. A hippocampális CA1 régió és a gyrus dentatus (GD) principális sejtjeinek axo-szomato-dendritikus tengelye mentén elektronmikroszkópos immunarany jelölés segítségével analizáltuk a KCC2 elhelyezkedését, ami a piramissejtek dendritikus régiójában igen komplex mintázatot mutatott, ellentétben szemcsesejtekkel, ami további alapot ad a két sejt típus eltérő dendritikus tulajdonságaira, integratív funkcióira (Spruston et al., 1995; Hoffman et al., 1997; Krueppel et al., 2011).

2. CÉLKITŰZÉSEK ÉS KÖZREMŰKÖDÉSEK

A képzelőerő fontosabb, mint a tudás.

Albert Einstein

I. A korábbiakban kimutatott eredményeinken alapulva (Szabadics et al., 2006), melyek szerint a kortikális piramis sejtek periszomatikus régiójában található eltérő mennyiségű KCC2 tartalomnak meghatározó szerepe lehet a különböző interneuronok által kiváltott GABAerg sejtválaszokban, a következő kérdéseket céloztuk meg kísérleteinkkel (**I. Cikk** Baldi et al., 2010):

(a hippokampális régiót választva objektumul, ahol a principális sejtek azonos struktúrái jól elkülöníthető rétegekbe szerveződnek)

1. a CA1 piramis sejtek mentén hogyan alakul a KCC2 elhelyezkedése

1.1. citoplazmatikusan valamint

1.2. a plazmamembránhoz kötve?

1.3. Milyen különbségek figyelhetők meg a GABAerg bemenetekkel rendelkező dendritikus plazmamembrán és a glutamáterg beidegzésű dendritkák membránja között?

2. A hippokampusz másik principális sejt típusán, a GD szemcsesejtjeinek mentén hogyan alakul a KCC2 elhelyezkedése?

II. A központi idegrendszerben a neurogliaform sejt egyedülálló módon képes aktivációjával, a lassú GABA_A és GABA_B receptor-mediált poszt-szinaptikus válasz kiváltására környezetének nagymennyiségű GABA-val történő elárasztásával, amiben morfológiájának is szerepe van (Tamas et al., 2003; Szabadics et al., 2007; Price et al., 2008). Az extraszinaptikus térbe kerülő GABA képes aktiválni az ott elhelyezkedő nagy affinitású GABA receptorokat. A neurogliaform sejt hatásait vizsgálva figyelmünk ezen receptorok felé irányult, így szemügyre kívántuk venni a specifikusan extraszinaptikus elhelyezkedésű δ alegységet tartalmazó GABA_A receptorok elhelyezkedését (**II. Cikk** Olah et al., 2009).

Közreműködések:

Az I. pontban foglaltakhoz tartozó kísérleteket magam hajtottam végre. A II. ponthoz kapcsolódó anatómiai munkákban szerepe volt Varga Csabának és Baka Judithnak is. Az elektrofiziológiai kísérletek Oláh Szabolcs, Füle Miklós és Komlósi Gergely érdemei.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Szövetpreparátum készítése immunhisztokémiához.

Minden eljárás a Szegedi Tudományegyetem jóváhagyásával és a Helsinki Nyilatkozat értelmében történt. A felnőtt Wistar patkányokat ($n = 12$) tribromoethanol (10 ml/kg) hasüregbe történő injekciójával mélyen elaltattuk. A KCC2 fénymikroszkópos azonosításához ($n = 3$) a perfundálás során az egy perces fiziológiás sóoldatot követően 4% paraformaldehidet, 0,05% glutáraldehidet és 0,2% pikrinsavat tartalmazó 0,1 M-os foszfát puffer oldatot használtunk 15-30 percig. A $GABA_{A\delta}$ receptorok megjelenítésére ($n = 5$) a fentebb említett fixálót glutáraldehid nélkül alkalmaztuk 10 percig. Az állatok agyait a koponyából azonnal eltávolítottuk, és 0,1 M foszfát pufferben tároltuk. A $GABA_{A\delta}$ -/- egereket ($n = 2$, Mody Istvántól, University of California, Los Angeles) hasonlóképpen fixálták.

A KCC2 elektronmikroszkópiás feltáráshoz ($n = 4$) a perfundálás során az 1 perces 0,9%-os sóoldatot, három állat esetében, 4% paraformaldehid és 4% akrolein 0,1 M-os foszfát pufferes oldata követte, míg a fennmaradó egy patkány esetében pH-eltoláson alapuló fixálást alkalmaztunk (Berod et al., 1981; Sloviter et al., 2001). 2 perces 2% paraformaldehidet és 0,1% glutáraldehidet tartalmazó 0,1 M-os acetate pufferes oldat keringetése után 1 órás 2% paraformaldehid és 0,1% glutáraldehid 0,1 M-os nátriumborátos (pH 8,5) oldatát használtuk. Az akroleines fixálást követően ($n = 3$) a patkányok agyát azonnal eltávolítottuk a koponyából, míg a sloviteres fixálás esetében ezt egy éjszakás 4 °C-os pihentetés után tettük meg. Horizontális és koronális metszeteket (60 μ m) készítettünk vibrotóm (Leica VT 1000S) segítségével, amelyeket 0,1 M-os foszfát pufferbe gyűjtöttünk. Az immunhisztokémiai eljárások során a hippokampusz dorzális részét valamint a szomatoszenzoros kérget vizsgáltuk.

Immunfluoreszcens jelölés a $GABA_A$ receptor δ alegységére

A 60 μ m-es metszeteket 10 mM citromsav és 0,05% Tween20 (Sigma) vizes oldatával (pH 6,0) kezeltük 10 percig 95-100 °C -on. Szobahőmérsékletre való lehűlés után a szeleteket normál ló szérum (NHS, 10%) Tris-pufferes sóoldatában (TBS, pH 7,4) blokkoltuk 1 órán át, majd a $GABA_A$ receptor δ alegységével szembeni elsődleges poliklonális nyúl antitesttel inkubáltuk (W. Siegharttól, Center for Brain Research, Bécs,

Ausztria) 2% NHS, 0,1% TritonX-100 TBS oldatában 4°C-on 72 óráig. A lépések közötti mosások 0,05% Tween20 TBS oldatával történtek a biotinilált szamár-anti-nyúl másodlagos antitesttel (1:250; Jackson Immunoresearch, 2% NHS, TBS) való inkubálásig, majd csupán TBS-sel. A szeleteket TBS-ben oldott ABC komplexszel kezeltük (1:100; Vector Laboratories), és a GABA_Aδ immunreakciót Alexa 488-kötött tyramid jelamplifikációs kittel hívtuk elő (Molecular Probes).

A fentebb leírt jelölt metszeteken kettős valamint hármas kolokalizációkat végeztük a következő elsődleges antitestek felhasználásával: egér anti- α -actinin (1:40000; Sigma), kecske anti-parvalbumin (1:5,000; PGV-214, Swant), egér anti-calbindin (1:100; C8666, Sigma), tengerimalac anti-vazoaktív intesztinális peptid (1:200; T-5030, Peninsula Laboratories), egér anti-calretinin (1:1000; 6B3, Swant), patkány anti-szomatosztatin (1:50; MAB354, Chemicon), és egér anti-reelin (1:50000; MAB5366, Chemicon). Az antitesteket 2% NHS és 0,1% TritonX-100 TBS oldatába hígítottuk, és a metszeteket további 1 éjszakán át 4°C-on inkubáltuk, majd az elsődleges antitesteknek megfelelően a következő másodlagos antitestek egyikével vizualizáltuk: Cy3-konjugált szamár anti-egér (1:500; Jackson Immunoresearch), Cy3-konjugált szamár anti-nyúl (1:500; Jackson Immunoresearch), Cy3-konjugált szamár anti-patkány (1:500; Jackson Immunoresearch), Cy5-konjugált szamár anti-tengerimalac (1:500; Jackson Immunoresearch) és Alexa 350-konjugált szamár anti-kecske (1:500; Molecular Probes). Végezetül a szeleteket Vectashield (Vector Laboratories) segítségével tárgylemezre vittük. Fotókat fénymikroszkóppal készítettünk (Olympus BX60) 4x (numerikus apertúra, 0,13) objektívvel vagy konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal (IX81, Olympus) 20x (numerikus apertúra, 0,75) vagy 40x (numerikus apertúra, 1,30) objektív segítségével. A „z-stack” képek 3-9 fotóból épülnek fel a szelet 5-45 μ m mélységéből.

Immunfluoreszcens jelölés a KCC2-re.

A metszeteket 30 percig 1% hidrogén-peroxid 0,1 M-os foszfát puffer (PB) oldatával kezeltük, majd 0,1 M PB-vel alaposan átmostuk. Minden metszetet 1 óráig inkubáltunk blokkoló pufferben (5% normál ló szérum, 0,3% TritonX-100, 0,05% azid 0,1 M PB oldata), majd éjszakára a KCC2 -vel szembeni elsődleges antitest (Upstate, Lake Placid, NY 12946, 1:500) blokkoló pufferes oldatában tartottuk. 0,1 M PB mosást követően az immunreakciót Cy3-kapcsolt szamár-anti-nyúl antitesttel (Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK, 1:250) jelenítettük meg, és a metszeteket Vectashield

(Vector Laboratories) segítségével vittük tárgylemezre. Fotókat fénymikroszkóppal készítettünk (BX60, Olympus) 4x objektívvel (numerikus apertúra, 0,13) vagy konfokális lézer pásztázó mikroszkóp (FV1000, Olympus) 20x objektívjével (numerikus apertúra, 0,85).

Beágyazás előttit elektronmikroszkópiás immunhisztokémia.

Az elektronmikroszkópiára készített koronális metszeteket 20 percig 1% nátrium-borohidrid 0,1 M PB oldatával kezeltük, majd 0,1 M PB –vel mostuk. Annak érdekében, hogy megnöveljük az ellenanyag penetrációját, a metszeteket cukros előinkubálást követően (10 perc 10% szukróz, majd újabb 10 perc 20% szukróz) folyékony nitrogénnel kezeltük. Intenzív Tris-puffer sóoldatos (TBS, pH 7,4) mosás után, a kiválasztott szeleteket 1 órára 10% normál kecske szérum TBS oldatában inkubáltuk, és éjszakára szobahőn tartottuk 2% normál kecske szérum TBS oldatában hígított nyúl anti-KCC2 ellenanyaggal (2 µg/ml, 1:500, Upstate). Számos TBS-es mosást követően a szeleteket a másodlagos antitesttel (0,8 nm arany-kapcsolt kecske anti-nyúl IgG, 1:50, BB International, Dundee, DD2 1 NH, UK) 0.8% szarvasmarha szérum albumin (Sigma, Saint Louis, Missouri 63103 USA) 0.1% cold-water fish skin gelatine (Aurion Immunoresearch, Wageningen, The Netherlands) TBS oldatában inkubáltuk egy éjszakán át, majd utólagos fixálást alkalmaztunk 1% glutáraldehid TBS oldatában. Az ultra-kicsi aranyrészecskéket R-Gent SE-LM ezüst kittel növeltük meg, amint azt a gyártó (Aurion) leírta. A szeleteket 0,5% OsO₄ 0,1 M-os oldatával 20 percig 4 °C-on kezeltük, és 25 percig 1%-os uranil-acetát oldattal kontrasztoltuk. Növekvő alkoholsorban dehidratáltuk a metszeteket, és végül Durcupan gyantába (Fluka, Bluchs, Switzerland) ágyasztuk őket. Az elsődleges antitestet elhagyva a fent leírt protokollból, nem kaptunk specifikus jelölést. A KCC2-vel szembeni ellenanyag specificitását a korábbiakban már alaposan megvizsgálták (Williams et al., 1999), és a különböző agyterületeken az immunreakciót sikeresen alkalmazták (Rivera et al., 1999; Gulacsi et al., 2003). A hippokampusz CA1 régióját és a gyrus dentatust (GD) vizsgáltuk a továbbiakban. Az ezen területeket tartalmazó blokkokból ultramikrotóm segítségével 80 nm-es metszeteket készítettünk, a metszetsorozatokat gridekre gyűjtöttük, majd Tecnai-12 (FEI) elektronmikroszkóppal vizsgáltuk. Fotókat CCD kamerával (MegaView III, Soft Imaging System) készítettünk.

Az immunarany jelölés kvantitatív analízise.

Az akroleines és szloviteres fixálással is hasonló eredményt kaptunk, így az adatokat együtt kezeltük. A citoplazmatikus és a membránkapcsolt KCC2 immunarany sűrűséget a CA1 piramissejtek szómája, dendrittörzse, dendrittüskéi és az axoniniciális szegmentumok (AIS) mentén határoztuk meg a következő régiókban: str. pyramidale (“0 μm ”), a str. radiatum proximális és disztális része (0-100 μm és 230-300 μm -re a sejtestek rétegétől) str. lacunosum moleculare (320-400 μm) és str. oriens (0-70 μm). A GD szemcsesejtjeinek mentén a szomatikus, dendritikus és az AIS membránhoz kapcsolt KCC2 sűrűségértékeket határoztuk meg a str. granulosum (“0 μm ”) valamint a str. moleculare proximális (0-40 μm) és disztális területén (140-180 μm , 1. Táblázat). A piramissejteket és a szemcsesejteket a gömbölyded sejtmagjuk, a serkentő (aszimmetrikus) szinapszist nélkülöző dendrittörzsük, és a dendrittüskék jelenléte alapján definiáltuk. Dendrittüskének azokat a profilokat tekintettük, melyek serkentő szinapszist kapnak, és nem tartalmaznak mitokondriumot. Az elektronmikroszkópos felvételeket a metszetek felső 2 μm -éről készítettük, ügyelve arra, hogy az immunrészecske-sűrűséget azonos mélységben vizsgáljuk. Először az aspecifikus jelölés sűrűségét határoztuk meg a sejtmag területén (arany/ μm^2) valamint a sejtmaghártya mentén (arany/ μm). Megmértük az immunarany részecskék plazmamembrántól való távolságát, ami Gauss eloszlást mutatott 18,8 nm-es csúcsertéssel és 11,1 nm-es szórással, így azokat a részecskéket tekintettük membránkapcsoltnak, melyek a membrántól 41 nm-en belül helyezkedtek el a sejt belsejében (± 2 szórás + csúcserték), ami egy 41 nm-es effektív membrán szélességet eredményezett. A KCC2 immunarany sűrűséget immunrészecske per effektív membrán terület valamint immunrészecske per membránhosszban határoztuk meg, ami lehetővé tette, első esetben, a membránkapcsolt jelek összehasonlítását a citoplazmatikus sűrűséggel, második esetben, a membránkapcsolt sűrűségek egymás közötti összehasonlítását. A sűrűség meghatározásához Reconstruct szoftvert használtunk (Synapse Web, Kristen M. Harris, PI, <http://synapses.clm.utexas.edu/>). Az értékek ‘átlag \pm szórás’-ként vannak feltüntetve. Minden sűrűségértéket páros *t*-próbával vetettünk össze az aspecifikus háttérjellel (membrán kapcsoltat a membrán kapcsolttal, citoplazmatikus a citoplazmatikussal) majd a szignifikáns értékeket a háttérjellel való korrigálás után tovább analizáltuk. (A háttérértékeket minden állatban meghatároztuk, és állatonként külön kezeltük őket.) Páros összehasonlításokat végeztünk ANOVA analízissel. Annak érdekében, hogy elkerüljük a variancia homogenitásának hiányából származó statisztikai problémákat, Brown-Forsythe és Welch módszerekkel megvizsgáltuk az F-értékeket,

amelyek minden esetben szignifikáns értékeket mutattak ($P < 0,001$), majd adatainkat Games-Howel post hoc tesztnek vetettük alá, ami nem alapul az egyenlő varianciák feltevésén.

A felszín-térfogat arány a hippokampális fősejtek mentén az eltérő dendritátmérőkből fakadóan jelentősen változik. Azért, hogy össze tudjuk hasonlítani a KCC2 sűrűségére vonatkozó adatainkat a korábbiakban meghatározott CA1 piramissejtekre érkező bemenetek sűrűségével (Megias et al., 2001), a szinapszis/ μm alakban megadott értékeiket becsültük szinapszis/ μm^2 -rel. A szomatikus felszín-térfogat arányt Megias és munkatársai (2001) adatai alapján számítottuk, ahol a térfogatértéket korrigáltuk a sejtmagi térfogat különbségével, ami a számításaink szerint az össztérfogat 77,5%-át adta. A dendritikus és az AIS felszín-térfogat számításhoz hengerformához történt megközelítést alkalmaztunk a következő dendritátmérőkkel (amelyeket az analízisben részt vevő profilok alapján határoztunk meg): $2,09 \pm 0,49 \mu\text{m}$ a str. radiatum proximális részén, $1,31 \pm 0,44 \mu\text{m}$ a disztális részen, $0,72 \pm 0,29 \mu\text{m}$ a lacunosum moleculareban, $0,58 \pm 0,16 \mu\text{m}$ az oriensben és $0,82 \pm 0,17 \mu\text{m}$ az AIS-ok esetében. Ennek alapján a szómán az arány 1,9; a bazális dendriteken 6,88; az AIS-on 4,9; a proximális apikális dendriten 1,92; disztálisan 3,06 és a dendritbojton, a lacunosum moleculareban 5,53.

Elektrofiziológia.

Wistar patkányokat (P22-35) 2-bromo-2-chloro-1,1,1-trifluoroetán gázzal altattuk, majd dekapitálás után $350 \mu\text{m}$ -es koronális szeleteket metszettünk a szomatoszenzoros agykérgi részről. A metszeteket szobahőn ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) tartottuk 1 órán át 130 mM NaCl , $3,5 \text{ mM KCl}$, $1 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$, 24 mM NaHCO_3 , 1 mM CaCl_2 , 3 mM MgSO_4 , $10 \text{ nM D(+)-glükóz}$ $95\% \text{ O}_2$ és $5\% \text{ CO}_2$ telített oldatában. A méréskor használt oldat annyiban különbözött, hogy az 3 mM CaCl_2 -ot és $1,5 \text{ mM MgSO}_4$ -ot tartalmazott. Az elektrofiziológiai elvezetéseket $36 \text{ }^\circ\text{C}$ -on whole cell patch clamp technikával végeztük egyidejűleg legfeljebb négy II/III. rétegbeli idegsejtből. A sejteket infravörös differenciál interferencia kontraszt (DIC) videomikroszkópia (Olympus BX60WI mikroszkóp, Hamamatsu CCD kamera, Luigis & Neumann Infrapatch manipulátor) és $40\times$ -es vízimmerziós objektív segítségével vizualizáltuk $60\text{-}130 \mu\text{m}$ -re a szelet felszínétől. A mikropipettákat ($5\text{-}7 \text{ MOhm}$) alacsony kloridion tartalmú intracelluláris oldattal töltöttük meg ($\text{pH } 7,25$, 300 mosmol) hogy a GABAerg és glutamáterg események könnyen

elkülöníthetők legyenek. Az intracelluláris oldat összetétele: 126 mM K-glükonát, 4 mM KCl, 4 mM ATP-Mg, 0,3 mM GTP-Na₂, 10 mM HEPES, 10 mM keratin-foszfát és a sejtek jelöléséhez 8 mM biocitin. Az elektrofiziológiai elvezetéseket áramzár üzemmódban végeztük (HEKA EPC 9/2, HEKA EPC 10 patch-clamp erősítők), a mért elektromos jeleket 5 kHz-en szűrtük, 10 kHz-en digitalizáltuk és PULSE szoftver (8.54-es verzió, HEKA, Lambrech/Pfalz, Németország) segítségével mértük és analizáltuk.

A sejtek passzív elektromos tulajdonságait és tüzelési mintázatukat a bevett gyakorlat szerint a sejtek nyugalmi membránpotenciálján mértük áramzár üzemmódban 2 másodpercenként 800 ms-os négyszögimpulzust injektálva a sejtbe. A négyszögimpulzusok -100 pA-tól kezdődtek és 20 pA-el növekedtek minden egyes ismétléskor. Akciós potenciál indukálásához rövid, 2 ms-os, küszöb feletti áramimpulzusokat használtunk több, mint 120 s időintervallummal, hogy elkerüljük a transzmisszió kimerülését. A posztzinaptikus sejteket -51 ± 4 mV membránpotenciálon tartottuk. Valamennyi adatot 30-200 lefutás értékének az átlagával és szórásával (s.d.) adtuk meg. A THDOC adagolásával történt kísérletek NBQX (10 μ m) és APV (20 μ m) jelenlétében történtek. A neurogliaform sejtek közötti hatásokat nem tudtuk pontosan egy exponenciális görbére illeszteni, ezért a félszélességeket vettük alapul. Wilcoxon és Mann-Whitney U-tesztet használtunk az adatsorok összehasonlítására, a különbségeket $P < 0,05$ esetén fogadtuk el szignifikánsnak.

4. EREDMÉNYEK

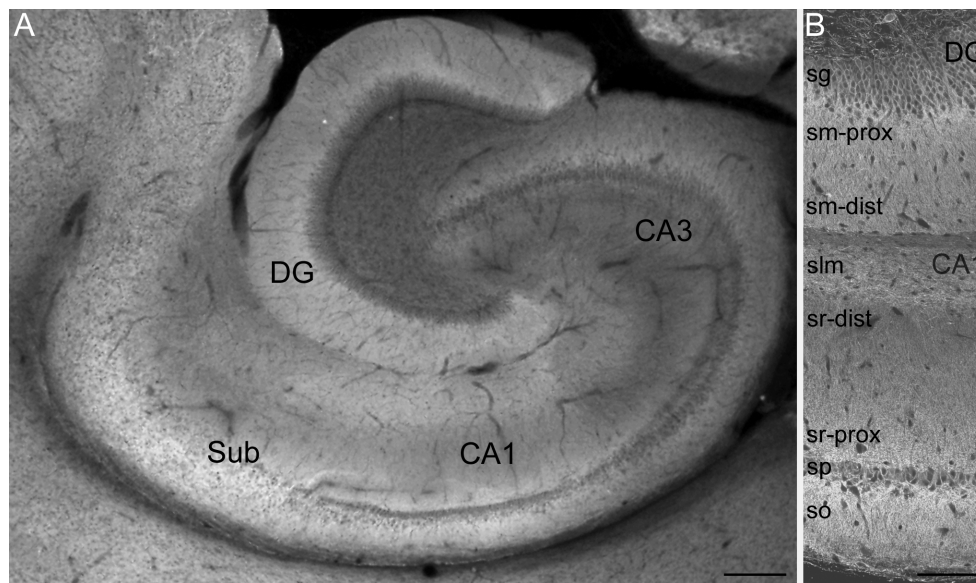
Csak kétféleképpen élheted az életed. Vagy abban hiszel, a világon semmi sem varázslat. Vagy abban, hogy a világon minden varázslat.

Albert Einstein

I. A KCC2 feltérképezése a hippokampális principális sejtek axo-szomato-dendritikus tengelye mentén

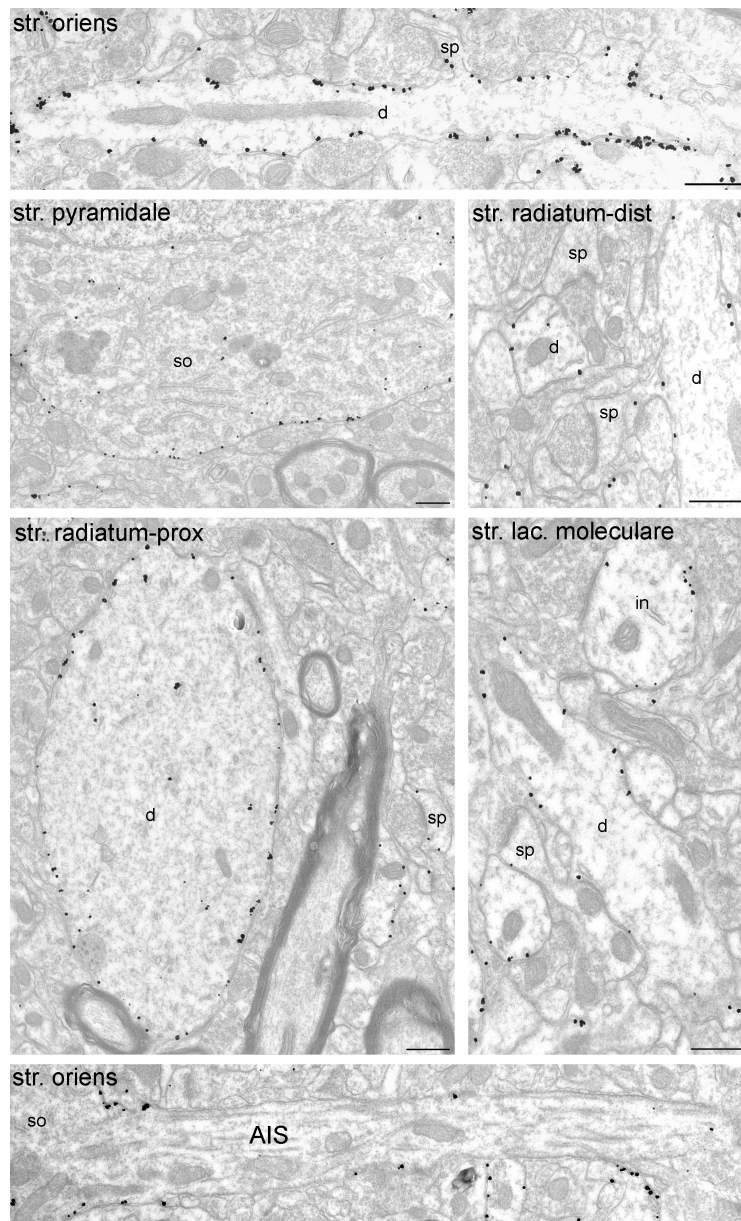
A KCC2 fénymikroszkópos eloszlását és az elektronmikroszkópos lokalizációját a korábbiakban részletesen leírták (Gulyas et al., 2001; Rivera et al., 2004), azonban kvantitatív kiértékelése mindezidáig csak az agykérgi piramissejtek jól behatárolt részén történt meg (Szabadics et al., 2006). Annak érdekében, hogy a hippokampális CA1 piramissejtek és a GD szemcsesejtjeinek régiónkénti KCC2 tartalmát meghatározzuk, nagy felbontású elektronmikroszkópos immunlokalizációt végeztünk.

A hippokampusz különböző régióiban a KCC2 fénymikroszkópos jelölése eltérő sejtminti koncentrációra utal (**I.1. ábra**). A legerősebb jelet a CA1 régió és a GD periszomatikus részén, a szubikulumban valamint azon rétegekben találtuk, melyek a perforáns pályáról kapják a bemenetüket (str. lacunosum moleculare és str. moleculare). A CA1 területén a jelölés a str. pyramidale két oldalán volt a legerősebb, a dendritikus részen a str. radiatum disztális részére lecsökkent az intenzitás, míg a lacunosum moleculareban újra felerősödött. Érdekes módon a GD festődése nem utal sűrűségbeli különbségre a dendritfa különböző részein. Azonban fénymikroszkópos technikával nem tudjuk kizárni annak lehetőségét, hogy a különböző típusú sejtek esetleges eltérő KCC2 immunreaktivitása befojásolja-e ezt a megfigyelést.

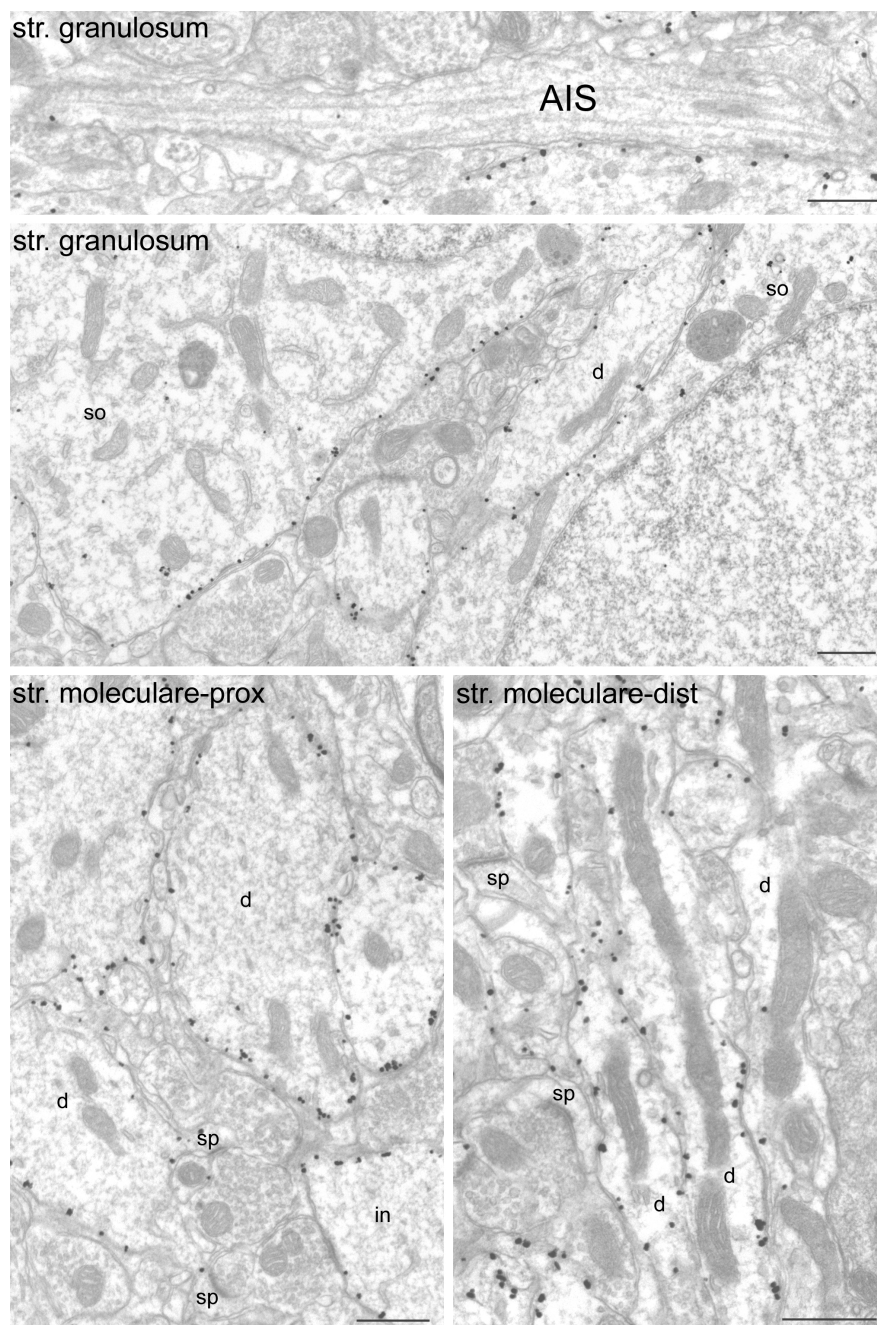


I.1. ábra: A KCC2 immunfluoreszcens jelölése a hippocampusban. **A,** A fénymikroszkópos immunjelölés a KCC2 változó eloszlását mutatja. A legerősebb festődés a CA1 régió és a szubikulum (Sub) periszomatikus részén figyelhető meg, amit a perforáns pálya bemeneteivel rendelkező rétegek követnek: a stratum lacunosum moleculare (slm) a CA1-ben valamint a stratum moleculare (sm) a gyrus dentatus területén. **B,** A CA1 régió konfokális mikroszkópiás képe a stratum pyramidale két oldali intenzív KCC2 immunreakcióját mutatja. A jelölés a stratum radiatum (sr) disztális része felé haladva egyre csökken, és a lacunosum moleculareban újra felerősödik, hasonló értékre, mint az a szemcsesejtek dendritikus régiójában látható (sm). so, stratum oriens; sg, stratum granulosum; sm, stratum moleculare. Skálák: (A) 200 μ m, (B) 100 μ m.

A KCC2-t jelölő immunarany részecskék a membrán belső oldalán helyezkedtek el, ahogyan azt a molekula sejten belüli epitópját felismerő ellenanyagtól vártuk is (Williams et al., 1999) (**I.2-3. ábra**). Először megmértük a háttérjel nagyságát a piramissejtek sejtmagjának területén ($0,29 \pm 0,18$ arany/ μ m², n = 4 állat) és a sejtmaghártya mentén ($0,09 \pm 0,05$ arany/ μ m, n = 4 állat), hogy a citoplazmatikus és a membránkapcsolt jelöléseket össze tudjuk hasonlítani. A piramissejt axoniniciális szegmentumának (AIS) citoplazmatikus KCC2 tartalmától eltekintve minden vizsgált sejtkompartment szignifikáns mennyiségű immunrészecskét tartalmazott (P<0,001 minden esetben, kivéve az AIS plazmamembránja, ahol P<0,05, páros t-teszt, **1. táblázat**). Az állatok adatainak saját háttérjelölésével történt korrigálása után a szomatikus értékekre normalizált értékekkel végeztük a további analízist.



I.2. ábra: A KCC2-t jelölő immunarany részecskék elhelyezkedésének elektronmikroszkópiás vizsgálata a hippocampális CA1 régió piramissejtjeinek mentén. Az aranyrészecskék többsége a szomatikus (so) és dendritikus (d) plazmamembránon helyezkedett el. Kisebb sűrűségben figyeltük meg a dendrittüskék (sp) membránján valamint a citoplazmában. A legerősebb immunreaktivitást a proximális dendritek mentén találtuk a stratum radiatumban és az oriensben. Az aranyrészecskék sűrűsége az apikális dendritek disztális részén leesett (stratum radiatum) és a lacunosum moleculareban újra megemelkedett. Az axoniniciális szegmentum (AIS) nagyon kevés KCC2 molekulát tartalmazott. in, interneuron dendrit. Az áttekinthetőség kedvéért csak a vizsgált profilokat jelöltük. Skála: 500 nm.



I.3. ábra: A KCC2 elektronmikroszkópos elhelyezkedésének vizsgálata a gyrus dentatus szemcsesejtjeinek mentén. Az aranyrészecskék legnagyobb részét a szomatikus (so) és dendritikus (d) membránhoz kötve figyeltük meg, kisebb sűrűséggel voltak jelen a citoplazmában. A legerősebb jelölés a dendritek mentén, a stratum moleculareban volt, proximális avagy disztális elhelyezkedésüktől függetlenül. Az axoniniciális szegmentum (AIS) nagyon kis mennyiségben tartalmazott aranyjelölést. Az áttekinthetőség kedvéért csak a vizsgált profilokat jelöltük. sp, dendrittüske; in, interneuron dendrit. Skála: 500 nm.

1. CA1 piramissejtek

1.1. A citoplazmatikus KCC2 tartalom kvantitatív meghatározása

A CA1 régióban meghatározott citoplazmatikus KCC2 sűrűség csupán a $3,6 \pm 0,7\%$ -át érte el a megfelelő területek sejtmag- valamint dendritikus plazmamembránjához kötött aranyrészecske sűrűségnek, és $17,7 \pm 16\%$ -át az AIS plazmamembránjának. Az axo-szomato-dendritikus tengely mentén az AIS-okban és a str. radiatum disztális részén ($0,37 \pm 0,49$ arany/ μm^2 és $1,16 \pm 0,57$ arany/ μm^2) szignifikánsan kisebb értékeket kaptunk a többi sejtalkotóhoz képest ($P < 0,0001$, $F(5,267) = 17,015$ ANOVA, $P < 0,007$ Games-Howel teszttel történt páronkénti összehasonlítás). A különböző sejtcompartmentek citoplazmatikus KCC2 tartalmát tekintve, az AIS és a sejttest megközelítőleg a felét ($53,1 \pm 10\%$ és $55,3 \pm 37,4\%$) tartalmazta az ott jelenlévő össz-KCC2 mennyiségnek (citoplazmatikus és membránkapcsolt együttevén), míg az apikális csúcs felé haladva ez az arány egyre csökkent: $44,6 \pm 14,7\%$ a proximális területeken, $29,2 \pm 8,8\%$ a disztális str. radiatumban és $22,5 \pm 13,8\%$ a lacunosum moleculareban valamint az oriensben szintén jelentősen esett ez az érték, $20,9 \pm 10,6\%$.

1.2. A membránkapcsolt KCC2 sűrűség meghatározása

A KCC2 immunarany jelölés legnagyobb része szomatikus és dendritikus plazmamembránhoz kötött (**I.2-3. ábra**). A CA1 piramissejtek felszínén a legnagyobb KCC2 sűrűséget a proximális apikális ($2,69 \pm 0,65$ arany/ μm) és a bazális dendriteken ($2,49 \pm 1,26$ arany/ μm) találtuk, amit a sejttest-membrán követett ($2,21 \pm 0,67$ arany/ μm). A piramissejtek apikális dendritjének KCC2 sűrűsége jellegzetes eloszlást mutatott. A szómához viszonyítva ($P < 0,001$, $F(4,231) = 8,518$ ANOVA) a str. radiatum proximális részén az aranyrészecskék mennyisége növekedett ($124,5 \pm 15,7\%$, $P < 0,001$, Games-Howel teszttel történt páronkénti összehasonlítás), távolodva, a radiatum disztális részére lecsökkent ($79 \pm 12,4\%$, $1,71 \pm 0,5$ arany/ μm , $P = 0,001$), majd a lacunosum moleculareban újra megerősödött a jelölés ($98,2 \pm 33,5\%$, $2,14 \pm 0,86$ arany/ μm) a proximális apikális KCC2 tartalomnál alacsonyabb értékre ($P < 0,001$, **I.4A/a ábra**).

Az AIS plazmamembránja sokkal kevesebb aranyrészecskét tartalmazott ($0,15 \pm 0,29$ arany/ μm) a szomatikus értéknek mindössze a $6,4 \pm 11,9\%$ -át ($P < 0,001$ páros-*t* teszt), hasonlóan az agykéregben kapott korábbi eredményeinkhez (Szabadics et al., 2006).

1. táblázat: A KCC2 sűrűsége a CA1 piramissejtek és a GD szemcsesejtek különböző kompartmentjeiben.

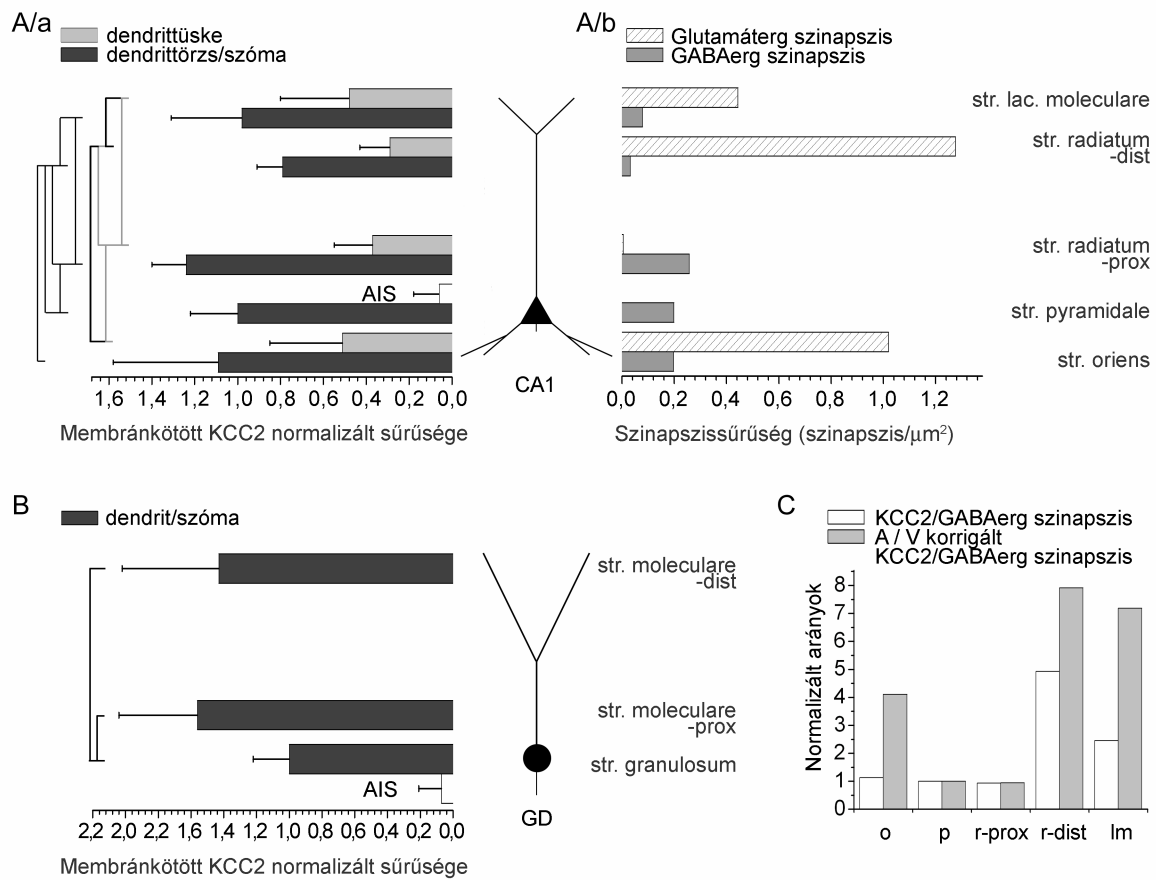
		Sűrűség (arany/ μm)		Membránhossz (μm)		Sűrűség (arany/ μm^2)		Terület (μm^2)		Mintavétel/állat (szám)	
		Átlag	s.d.	Átlag	s.d.	Átlag	s.d.	Átlag	s.d.	Átlag	s.d.
CA1 membrán	str. oriens	2,57	1,25	149,89	29,24	62,75	30,41	6,14	1,2	12,75	3,3
	str. pyramidale	2,29	0,67	196,16	22,58	55,95	16,23	8,04	0,93	6,75	0,96
	AIS	0,2	0,31	127,46	13,39	4,87	7,63	5,23	0,55	11,5	1,73
	str. radiatum-prox	2,78	0,64	228,12	15,98	67,69	15,7	9,35	0,66	6,5	1,29
	str. radiatum-dist	1,8	0,5	217,18	8,05	43,84	12,08	8,9	0,33	10	1,41
	str. lac. moleculare sejtmag	2,22	0,85	186,31	28,6	54,17	20,8	7,64	1,17	23	4,97
		0,09	0,04	174,03	22,03	2,22	0,98	7,14	0,9	6,75	0,96
CA1 citoplazma	str. oriens					2,47	1,84	44,25	12,51	12,75	3,3
	str. pyramidale					2,49	0,91	192,23	31,42	6,75	0,96
	AIS					0,57	0,57	42,63	4,13	11,5	1,73
	str. radiatum-prox					2,18	0,64	202,44	61,97	6,5	1,29
	str. radiatum-dist					1,45	0,62	121,13	21,02	10	1,41
	str. lac. moleculare sejtmag					2,39	1,41	57,05	10,46	23	4,97
						0,29	0,18	192,23	31,42	6,75	0,96
CA1 dendrittüske membrán	str. oriens	1,2	0,79	111,77	30,3					104	36,34
	str. radiatum-prox	0,87	0,4	141,33	63,27					132,5	59,47
	str. radiatum-dist	0,71	0,38	154,14	30,65					132	28,86
	str. lac. moleculare	1,11	0,71	118,16	37,84					78,5	31,37
GD membrán	str. granulosum	1,92	0,67	182,88	53,85					7,5	1,29
	AIS	0,12	0,09	109,11	50					18,5	10,25
	str. moleculare- prox	2,75	1	258,37	57,98					30,75	12,15
	str. moleculare- dist	2,4	0,77	214,11	96,66					33	20,43

AIS: axon iniciális szegmentum, GD: gyrus dentatus

1.3. Dendritikus és dendrittüske KCC2 sűrűség összehasonlítása

Korábbi eredmények (Gulyas et al., 2001) azt mutatták, hogy a serkentő szinapszisok közelébe koncentrálódik a KCC2 elhelyezkedése, ezért megvizsgáltuk annak sűrűségét a dendrittüskéken, amelyek a hippokampusz területén az elsődleges célpontjai a piramissejtekre érkező glutamáterg bemeneteknek. A KCC2-t jelölő aranyrészecskék valóban megtalálhatóak voltak a dendrittüske plazmamembránján, azonban mindössze a $39,9 \pm 8,5\%$ -át érte el az ugyanazon területen számolt dendrittörzs plazmamembránhoz kapcsolt KCC2 értéknek ($P < 0,001$ minden esetben, páros-*t* próbát alkalmazva). A különböző területeken mért dendrittüske-membránon található KCC2 tartalmakat egymással összehasonlítva azt az eredményt kaptuk, hogy a proximális apikális

dendrittűskékhez képest ($0,78 \pm 0,4$ arany/ μm) disztálisan a str. radiatum és lacunosum moleculare határára az immunrészecske-sűrűség lecsökkent ($0,63 \pm 0,39$ arany/ μm , $P=0,046$), és a lacunosum moleculareban valamint az oriensben mutatott nagyobb értékeket ($1,03 \pm 0,71$ arany/ μm , $P=0,043$ és $1,12 \pm 0,8$ arany/ μm , $P=0,031$, ANOVA $P<0,001$, $F(3,269)=7,153$, Games-Howell tesztet alkalmazva), vagyis eloszlása hasonlóan változott a dendritikus KCC2 elrendeződésével (I.4.A/a ábra).



I.4. ábra: A hippokampális principális sejtek mentén elhelyezkedő KCC2 és szinapszisok eloszlása valamint a KCC2/GABAerg szinapszisok relatív sűrűsége a CA1 piramis sejtek szomatikus és dendritikus plazmamembránján. A/a, A CA1 piramis sejtek felszínén elhelyezkedő KCC2 immunarany jelölés kvantitatív összehasonlítása a különböző rétegekben. Az immunarany jelölés megtalálható volt az apikális és bazális dendritek teljes hosszán, azonban az eloszlása heterogén mintázatot mutatott. A dendrittűskéken valamint az axoniniciális szegmentumon megtalálható aranyrészecskék sűrűsége szignifikánsan alacsonyabb értéket mutatott. A szignifikáns eltéréseket a vonalak jelölik ($P \leq 0,001$ fekete vonalak, $P < 0,05$ szürke vonalak, páros összehasonlítás Games-Howell post hoc tesztet alkalmazva), további

szignifikanciaszintek a dendrittüske, dendrittörzs, szomatikus valamint axoniniciális szegmentum (AIS) plazmamembránja között nincsenek feltüntetve. **A/b**, A hippokampális piramis sejtekre érkező szimmetrikus és aszimmetrikus szinapszisok sűrűsége a CA1 régióban. A szürke oszlopok ábrázolják a szimmetrikus szinapszisok sűrűségét, amiből látható, hogy a GABAerg szinapszisok túlnyomó része a piramis sejtek proximális dendritjén valamint szómáján helyezkedik el. Megjegyzendő, hogy a szimmetrikus szinapszisok eloszlása hasonló tendenciát mutat a KCC2 eloszlásával. A csíkozott oszlopok ábrázolják az aszimmetrikus, serkentő szinapszisokat, amiknek nagy része a disztális apikális dendriteken helyezkedik el a stratum radiatumban és lacunosum moleculareban valamint a bazális dendriteken a stratum oriensben. **B**, A szemcsesejtek dendritjei nagyobb KCC2 sűrűséget mutattak, mint a sejttest membrán, de a proximális és disztális dendritek között nem észleltünk eltérést. A vonalak a szignifikáns eltérést jelölik ($P < 0,001$, Games-Howell post hoc tesztet alkalmazva). **C**, A CA1 piramis sejtek proximális dendritjein a str. oriensben (o) és radiatumban (r-prox) valamint a szomatikus membránon a KCC2/GABAerg szinapszisok aránya megegyezik. Azonban a radiatum disztális része felé haladva (r-dist) és a lacunosum moleculareban (lm) ez az arány 5- és 2,5-szeresére növekszik. Figyelembe véve, hogy a szómától távolodva a dendritikus felszín/térfogat arány (A/V) változik a KCC2 és a GABAerg szinapszisok sűrűsége közötti különbség a proximális apikális dendritikus és szomatikus régióktól eltekintve tovább növekszik. A szinapszisok sűrűségére vonatkozó adatok (**A/b**, **C**) Megias és munkatársai (2001) közleményéből származnak.

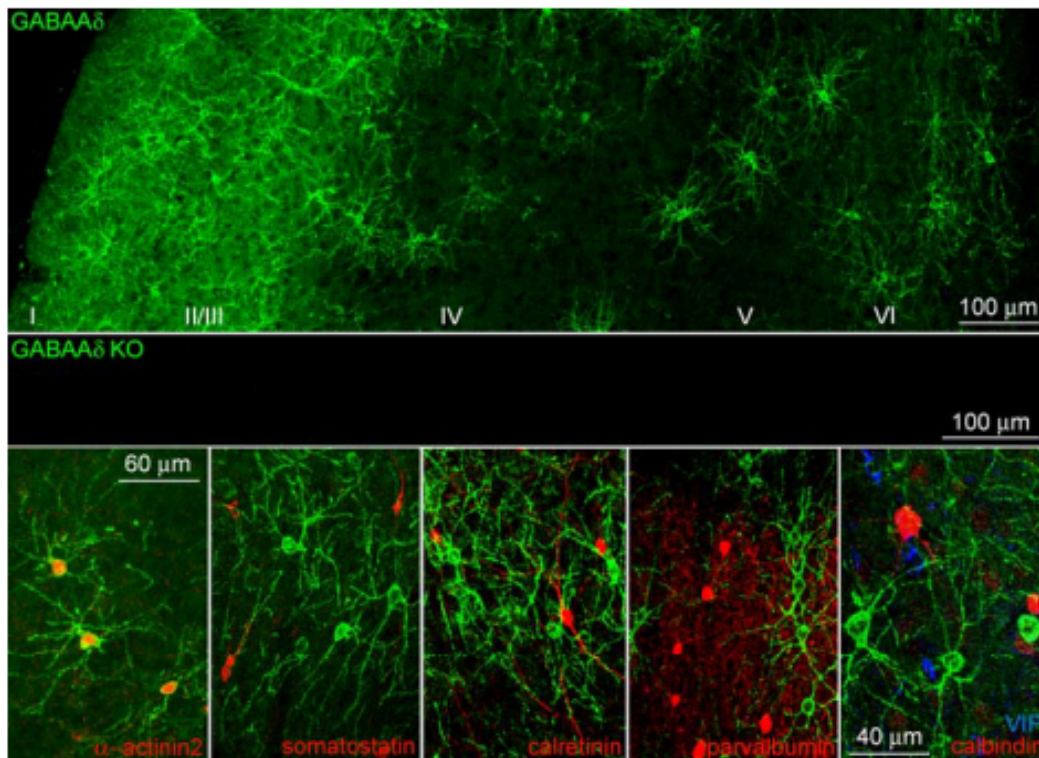
2. GD szemcsesejtek KCC2 eloszlása

A CA1 piramis sejteivel ellentétben a GD szemcsesejtjeinek dendritikus felszíne nem mutatott eltérést a KCC2 sűrűségében ($2,67 \pm 1$ arany/ μm a stratum moleculare proximális, és $2,32 \pm 0,77$ arany/ μm a disztális részén), azonban a szomatikus plazmamembrán ugyanúgy a KCC2 kisebb mértékű kifejeződésére utalt ($1,84 \pm 0,68$ arany/ μm , $P < 0,001$, $F(2,240)=12,328$ ANOVA; $P < 0,001$ Games-Howell tesztel történt páronkénti összehasonlítás, **I.4.B ábra**).

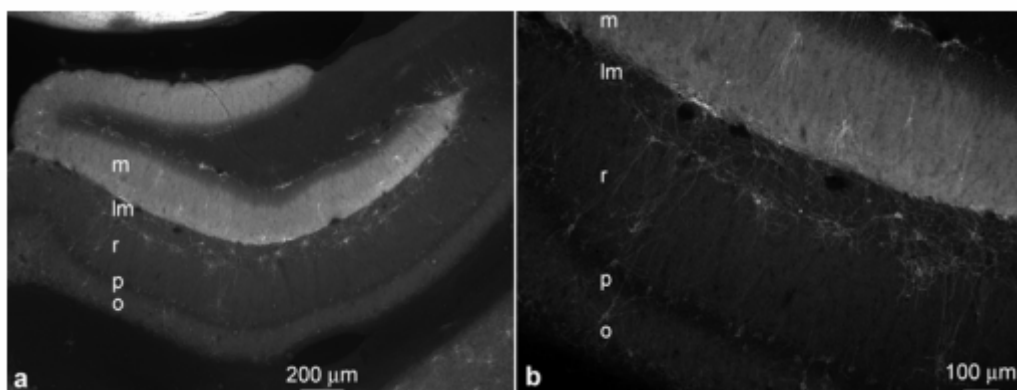
Az AIS plazmamembránja a hippokampális és kortikális piramis sejtekhez hasonlóan (Szabadics et al., 2006) rendkívül kevés KCC2-t tartalmazott ($0,1 \pm 0,22$ arany/ μm), a szomatikus érték mindössze $6,6 \pm 14,1\%$ -át ($P < 0,001$ páros-*t* teszt).

II. A GABA_A receptor δ alegységének feltérképezése

A neurogliaform sejtek által felszabadított GABA az extraszinaptikus térbe kerülve az ott jelenlévő GABA_B és GABA_A receptorokat is eléri. A tónusos gátlásban résztvevő delta alegységgel rendelkező extraszinaptikus GABA_A receptorok tehát a neurogliaform sejtek potenciális célpontjai. Kortikális és hippocampális feltérképezésükre elsődlegesen immunfluoreszcens technikát választottunk. A metszetek megfelelő feltárása után az idegsejtek egy csoportja igen erős szomato-dendritikus festődést mutatott, ami a dendritfa alapján és különböző interneuronmarkerekkel történő kolokalizáció során neurogliaform sejtek jelenlétére utalt (**II.1-2. ábra**). A korábbiakban már igazolt α -actinin2, úgynevezett neurogliaform markerrel (Uematsu et al., 2008), a GABA_{Aδ} receptort tartalmazó sejtek 65 \pm 12%-os átfedést mutattak (n = 3 patkány), ellenben más markerek esetében (parvalbumin, szomatosztatin, calretinin, vazóaktív intesztinális peptid (VIP), calbindin) nem találtunk egyezést. Az erősen jelölt GABA_{Aδ} pozitív interneuronok mellett az agykéreg felső rétegei intenzív neuropil jelölődést mutattak, ami a hippocampális gyrus dentatus molekuláris rétegére szintén jellemző volt. A hippocampusz területén a szemcsesejtek rétegének alsó határán, a CA1-3 régió stratum radiatum / lacunosum moleculare találkozásánál és az oriensben találtunk GABA_{Aδ} pozitív interneuronokat, amik feltehetően megegyeznek az Ivy- illetve neurogliaform sejteknek, amelyek a nagymértékű GABA felszabadításuk révén hatásos térfogati neurotranszmisszióra képesek (Olah et al., 2009). A GABA_{Aδ} -/- állatok metszetein végzett immunreakció negatív eredményt adott, ami az elsődleges antitest specificitását támasztja alá.

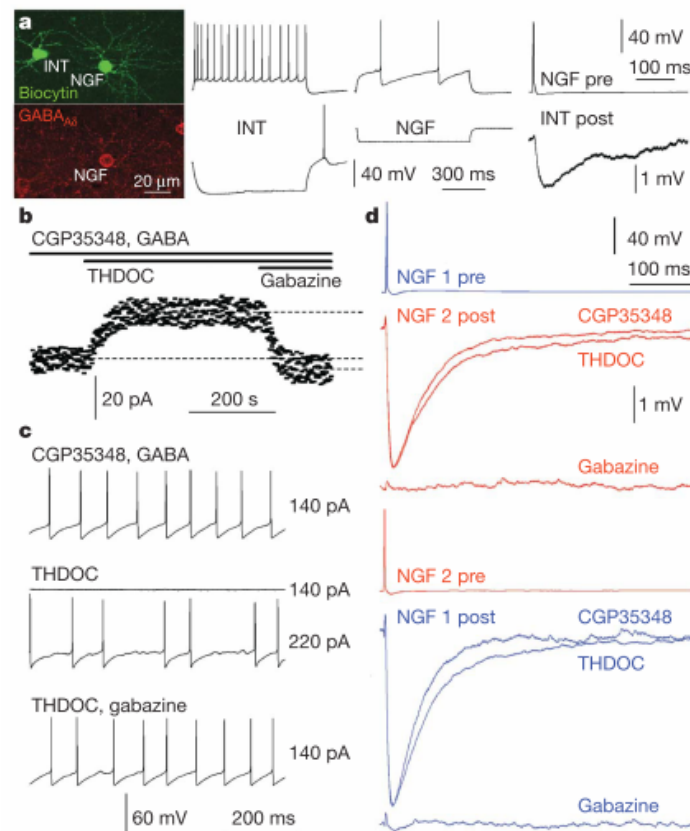


II.1. ábra: Az agykérgi interneuronok között a neurogliaform sejtek kiemelkedő mennyiségben tartalmaznak GABA_{Aδ} receptort. Fent: Az agykéreg szupragranuláris rétegének relatív erős neuropil jelölése mellett az interneuronok egy csoportja igen erős reakciót mutatott a GABA_A receptor delta alegységével szemben, ami a GABA_{Aδ} -/- állatok esetében hiányzott (középen). Lent: A GABA_{Aδ} immunpozitív interneuronok egy része tartalmazott α -actinin2-t, ami az agykérgi neurogliaform sejtek egyik markere, azonban parvalbuminnal, szomatosztatinnal, calretininnel, calbindinnel és vazoaktív intesztinális peptiddel (VIP) nem találtunk átfedést. Az α -actinin2, szomatosztatin, calretinin és parvalbumin kolokalizációk esetében a skálák megegyeznek.



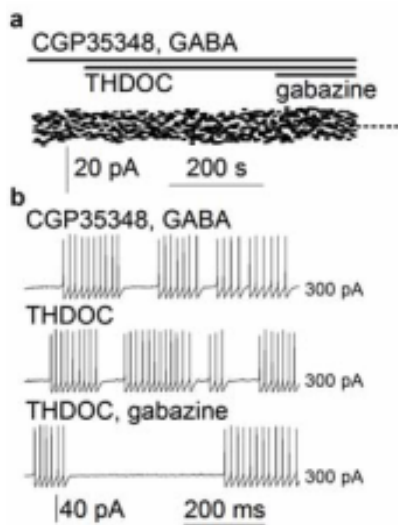
II.2. ábra: A GABA_A receptor delta alegységének hippocampális elhelyezkedését célzó immunreakció. a-b, A CA1-3 régiókkal ellentétben a gyrus dentatus molekuláris rétegében (m) relatíve erős neuropil jelölést találtunk, ami a piramis sejtek és a szemcsesejtek eltérő GABA_{Aδ} receptor tartalmát sejteti. Továbbá, a gyrus dentatus molekuláris rétegében (m) és a stratum radiatum (r) / lacunosum moleculare (lm) határán (valószínűleg a hippocampális neurogliaform sejtek) valamint a stratum pyramidale (p) közelében (feltehetően Ivy sejtek) az interneuronok egy-egy csoportja igen erős GABA_{Aδ} receptor immunreaktivitást mutatott. o, stratum oriens.

Elektrofiziológiásan és anatómiailag is azonosított neurogliaform sejtek valóban mutatták a pozitív GABA_{Aδ} receptor immunreakciót (n = 9), és az egyidejűleg elvezetett posztszinaptikus GABA_{Aδ} -/- interneuronokon rájuk jellemzően kiváltották a lassú IPSP-t (n = 3, **II.3.a ábra**). A GABA_{Aδ} receptorok által mediált tónusos gátlásra feltehetően a stressz-indukált és az ovariális ciklus szteroidjaiból származó neuroszteroidok is hatással vannak (Stell et al., 2003; Farrant és Nusser, 2005; Glykys és Mody, 2007a; Vardya et al., 2008), így ezektől a vegyületektől a neurogliaform sejtek serkentetőségének befolyásolását vártuk. A neuroszteroid tetrahydrodeoxi-kortikoszteron (THDOC) adagolására a tartóáram, ami a sejtek adott membránpotenciálon rögzítéséhez szükséges, a neurogliaform sejtek esetében (n = 7), ellentétben a többi interneuronnal (n = 10, **II.4.a ábra**, (Vardya et al., 2008)), 5 μM GABA és 40 μM GABA_B receptor blokkoló CGP35348 jelenlétében THDOC (100 nM) adagolására 24 ± 5 pA-rel megemelkedett (P<0,03, **II.3.b ábra**). A THDOC által kiváltott áramnövekedés GABA_A receptor blokkoló gabazine (10 μM) hatására megszűnt, sőt a kezdetinél 8 ± 3 pA-rel alacsonyabb értéket mutatott (P<0,05). Továbbá, THDOC jelenlétében (20 nM), ellentétben más interneuronokkal (n = 8; **II.4.b ábra**), a neurogliaform sejtek reobázikus tüzeléséhez nagyobb áraminjekció volt szükséges (n = 6, 234 ± 26 pA, **II.3.c ábra**), mint alapesetben (138 ± 17 pA; P<0,01; 40 mM CGP35348, 5 mM GABA), ami gabazine (10 μM) hatására megszűnt. Mindez azt mutatja, hogy a GABA_{Aδ} receptorok eredményesen tudják befolyásolni a neurogliaform sejtek bemeneti és kimeneti hatékonyságát.



II.3. ábra: Az extraszinaptikus elhelyezkedésű GABA_{Aδ} receptorok neurogliaform sejt eredetű kifejeződése, melyeket a neurogliaform sejtek által felszabadított GABA képes aktiválni. **a**, Bal oldal: GABA_{Aδ} receptor immunreakció egy, a korábbiakban egyidejűleg elvezetett, biocytin töltött neurogliaform sejt (NGF) és poszt-szinaptikus interneuron (INT) párosán. GABA_{Aδ} receptor immunreaktivitást csak a neurogliaform sejt mutatott. Középen: az interneuron és a neurogliaform sejt tüzelési mintázata. Jobb oldal: Neurogliaform sejt által kiváltott lassú IPSP a GABA_{Aδ} receptor immunonegatív poszt-szinaptikus interneuronon. **b-d**, Neuroszteroidok GABA_{Aδ} receptorokon keresztül modulálják a neurogliaform sejtek serkenthetőségét és egymás közti kapcsolatait. **b**, Az az áram (szaggatott vonal), ami szükséges a neurogliaform sejtek azonos membránpotenciálon rögzítéséhez, THDOC neuroszteroid (100 nM) adagolás hatására, 5 mM GABA és 40 mM GABA_B receptor blokkoló CGP35348 jelenlétében, megváltozott. Gabazin (10 mM) hozzáadását követően a THDOC által kiváltott válasz megszűnt: a tartóáram kisebb értéket mutatott, mint a THDOC adagolást megelőzően. **c**, A neurogliaform sejtek reobázikus tüzeléséhez THDOC jelenlétében (20 nM) nagyobb áraminjektálásra volt szükség (140 pA helyett 220 pA), mint alapállapotban (40 mM CGP35348, 5mM GABA), amit gabazin (10 mM) adagolásával vissza lehetett fordítani. **d**, CGP35348 (40 mM) jelenlétében a THDOC (100 nM) megnövelte az egyetlen

akciós potenciállal kiváltott gabazine (10 mM) –érzékeny IPSPk félszélességét az egymással reciprok kapcsolatban álló neurogliaform sejtek között.



II.4. ábra: A neurogliaform sejtektől eltérő interneuronokon a neuroszteroid THDOC hatástalannak bizonyult a tónusos GABA_A áramok szabályozásában. a, A különböző interneuronok esetében a membránpotenciál rögzítéséhez szükséges tartóáram (n = 10, egy gyors tüzelésű kosársejt van feltüntetve) GABA_B receptor blokkoló CGP35348 (40 μM) és GABA (5 μM) jelenlétében, neuroszteroid THDOC (100 nM) vagy gabazine (10 μM) adagolás hatására sem változott. **b,** A neurogliaform sejtektől különböző interneuronok a reobázikus tüzeléshez (n = 8, egy gyors tüzelésű kosársejt van feltüntetve) ugyanakkora pozitív áraminjekciót igényeltek THDOC (20nM) vagy gabazine (10 μM) adagolást követően is, mint alapesetben (40 μM CGP35348 és 5 μM GABA jelenlétében). Az elvezetett sejtek azonosságát biocytinnel történt feltöltést követően fénymikroszkóppal is alátámasztottuk.

Tesztjeink során, hasonlóan korábbi kísérletekhez, ahol a neuroszteroidok tónusos gátlásra kifejtett hatását vizsgálták (Stell et al., 2003; Farrant és Nusser, 2005; Glykys és Mody, 2007a; Vardya et al., 2008), alacsony koncentrációjú GABA adagolást alkalmaztunk a fiziológiás GABA szint megközelítésére. Azonban a neurogliaform sejtek kimenete külső adagolás nélkül, önmagában, képes létrehozni azt a GABA koncentrációt, ami a GABA_{Aδ} receptorok aktivációját eredményezi. CGP35348 (40 μM) jelenlétében a THDOC (100 nM) 48 ± 6 ms-ról 59 ± 10 ms-ra megegyezte a gabazine (10 μM) –érzékeny IPSP-k félszélességét, amelyeket reciprok kapcsolatban álló neurogliaform sejtekből vezettünk el (n = 5, $P < 0,04$; **II.3.d ábra**). A neurogliaform sejtek egymás közötti és önmagukra visszaható gátlásának neuroszteroidok általi szabályozása alátámasztja azt a felvetést, miszerint ők a tónusos gátlásban résztvevő extracelluláris GABA-nak mind forrásai, mind pedig célpontjaiként szerepelnek.

5. DISZKUSSIÓ

Soha nem fordult velem elő, hogy valami legyőzhetetlen akadályt állított volna elé. Nem arról van szó, hogy tudtam a választ, de megvolt az öröm, ahogyan haladtam felé. Amikor érzed ezt az örömet, a megfelelő kísérleteket végzed. Hagyod az anyagnak, hogy elmondja, merre menj, és az minden egyes lépésnél megmutatja a következő lépést amint részévé válsz egy mindent átható, új gondolatvilágnak.

Barbara McClintock

1. Mikrohálózatok és KCC2

Nagyfelbontású immunolokalizációs technikát alkalmazva azt találtuk, hogy a hippokampális principális sejtek axo-szomato-dendritikus tengelyének mentén a KCC2 eloszlása egyenlőtlen. A legalacsonyabb sűrűséget az AIS területén figyeltük meg, ami a sejttesteken keresztül a dendritikus régió felé haladva mind a CA1 piramisisejtek, mind a GD szemcsesejtek esetében növekedett. A dendritfa területén azonban e két sejt típuson eltérő elrendeződést tapasztaltunk: míg a piramisisejtek differenciált, a szemcsesejtek a KCC2 homogén eloszlását mutatták.

A CA1 piramisisejtekre érkező GABAerg szinapszisok sűrűsége a sejtek különböző részein változik (Megias et al., 2001). Érdekes módon a KCC2 eloszlási mintázata a CA1 apikális dendritek mentén hasonlóságot mutat az oda érkező GABAerg szinapszisok eloszlásával (**I.4.A ábra**). A proximális régiókban, a szomatikus és az apikális dendritek plazmamembránján, a KCC2 és a GABAerg szinapszisok normalizált sűrűségeinek aránya közel megegyezik (1 és 1.1). Azonban a disztális területeken, a str. radiatumban és a str. lacunosum moleculareban, a normalizált sűrűségeket összehasonlítva, a KCC2 5-ször valamint 2.5-szer nagyobb mennyiségben van jelen, ami, ha figyelembe vesszük az eltérő felszín-térfogat arányokat, funkcionálisan, még további növekedést jelez (**I.4.C ábra**). Mindez azt sugallja, hogy egy GABAerg szinapsziszra jutó Cl^- ion kipumpáló kapacitás a disztális dendritszakaszokon magasabb lehet, mint proximálisan. A GD szemcsesejtjeire érkező GABAerg bemenetek eloszlásáról nincsenek olyan pontos adataink. Azonban a KCC2 relatív homogén eloszlása a szemcsesejteken és diverz eloszlása a CA1

piramis sejteken arról árulkodik, hogy sejtspecifikus különbségek mutatkozhatnak a különböző dendritszakaszokra érkező GABAerg bemenetek polaritásában.

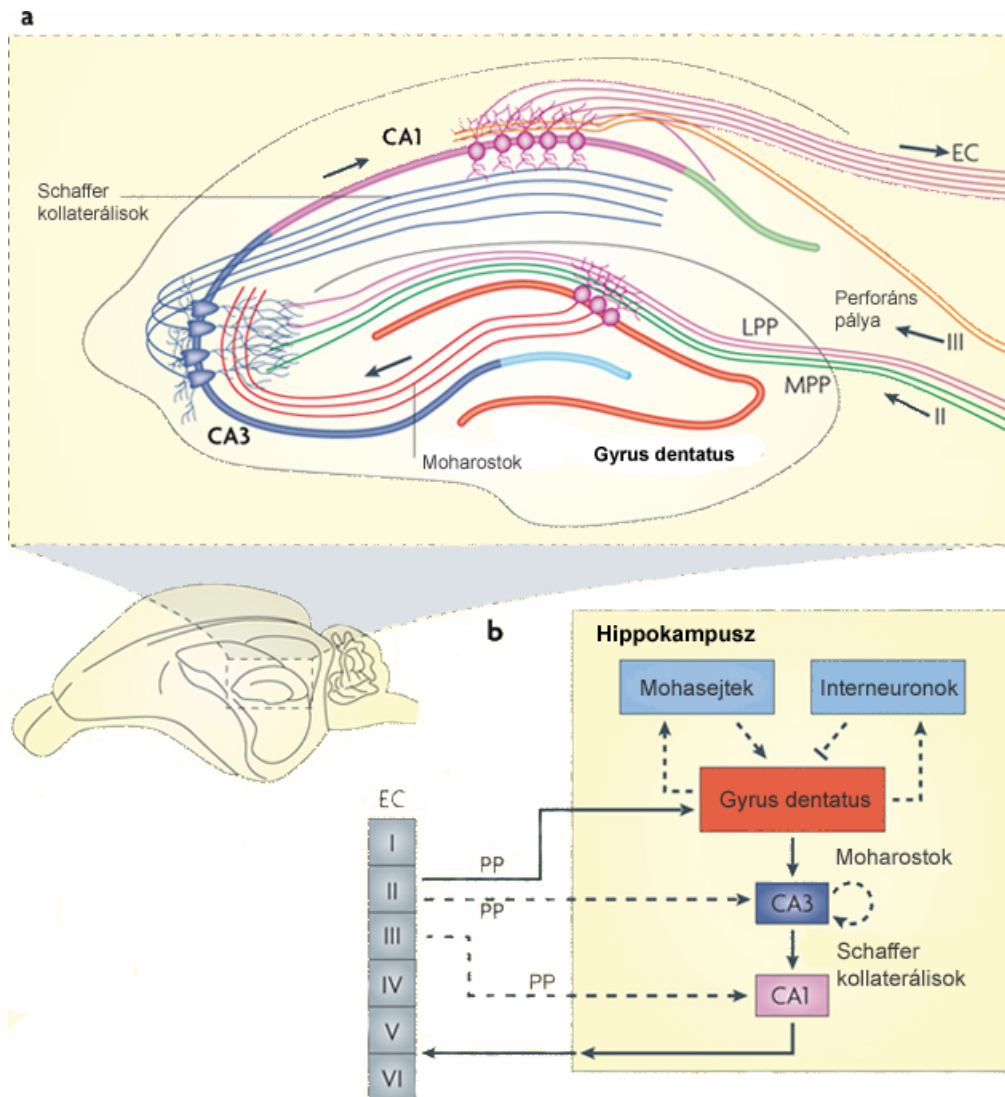
E két sejt típuson a dendritek elektromos tulajdonságai is meglehetősen eltérnek egymástól (**2. táblázat**). A gyrus dentatus szemcsesejtjein végződő bemenetek, a CA1 piramis sejtekkel ellentétben, úgy tűnik, lineárisan összegződnek, és nagy csillapításon esnek át, így az önálló szinapszisoknak nincs nagy hatása a sejtek kimenetére, ami a dendritikus membrán passzív elektromos tulajdonságaira vezethető vissza (Krueppel et al., 2011). A CA1-3 piramis sejtek ellenben igen kifejezett aktív membrántulajdonságokkal bírnak, a feszültségfüggő ioncsatornák változatos elrendeződése jellemző rájuk, és különböző regeneratív feszültségek kialakítására képesek (Magee, 2000; London és Hausser, 2005; Silver, 2010) (**1. ábra**). A gyrus dentatus, és a CA1-3 principális sejtekre érkező periszomatikus gátlás is lényeges eltéréseket mutat. Míg, néhány interneuronnal ellentétben (Banke és McBain, 2006), az egyedfejlődés során mindkét sejt típuson végbemegy a kation-klorid kotranszporterek mennyiségi változásához köthető GABAerg reverzpotenciál változás (Hollrigel et al., 1998; Overstreet Wadiche et al., 2005; Banke és McBain, 2006; Sauer et al., 2012), a nyugalmi membránpotenciál a piramis sejteken valamivel magasabb, a szemcsesejteken lényegesen negatívabb értéket vesz fel, ami a gyrus dentatusban depolarizáló hatást eredményez (Sauer et al., 2012). Interneuronok közötti gyors depolarizáló gátlásról nemrégiben közölték annak szinkronizáló hatását (Vida et al., 2006), és hasonló funkciót feltételezhetünk a szemcsesejtek előreccsatoló gátlását illetően is (Sauer et al., 2012). A hippocampusz területére a legfőbb serkentő bemenet az entorhinális kéregből érkezik. A második réteg látja el a gyrus dentatust és a CA3 régiót, míg a harmadik réteg vetít a CA1 területére (Witter és Amaral, 2004) (**4. ábra**). Az entorhinális kéreg hippocampális kapcsolatának fontos szerepe van a térbeli tájékozódásban és különböző memóriafunkciókban (Moser et al., 2008). A belső hippocampális információáramlás a gyrus dentatus – CA3 – CA1 útvonalon keresztül történik, majd a CA1-ből jut vissza az entorhinális kéreg mélyebb rétegeibe. A CA1-ben tehát integrálódik mind a CA3 által már megszűrt (közvetett), mind az entorhinális kérgi közvetlen bemenet, és egyidejű aktivációjuk, a GABAerg neuronhálózatot elcsendesítve, a dendritikus plató potenciálok kialakulásához, a piramis sejtek borsztölő tüzeléséhez, és a perforáns pálya bemeneteinek megerősödéséhez (LTP) vezet (Takahashi és Magee, 2009). Ekkor a CA1-ben egy korábbi információ találkozik az éppen aktuálissal, ami számos kontextusfüggő esemény-visszahívással foglalkozó modell központi alkotóeleme

(Hasselmo és Eichenbaum, 2005; Lisman és Grace, 2005). Basu és munkatársai (2012) a bemenetek időzítésfüggő plaszticitásának egy másik formáját írták le, amikor is a CA1 piramis sejtekre érkező perforáns pálya bemeneteihez különböző időintervallumokkal társították a proximálisan érkező Schaffer kollaterálisok bemeneteit. A 20 ms-os eltérés a Schaffer kollaterálisok szinapszisainak hosszútávú erőteljes megerősödéséhez (LTP) vezetett, ami feltételezhetően egybeesik az entorhinális kéregből érkező ugyanazon információt hordozó közvetlen és közvetett bemenetek integrációjával. Ehhez azonban szükség van a gátló neuronhálózat pontos működésére is, melyek (jobbára) a GABA_A receptorokon keresztül a posztzinaptikus sejten az ott jelenlévő Cl⁻ ionok koncentrációjának megfelelően hozzájárulnak a sejtválaszt. A KCC2 a GABA_A reverzpotenciálra gyakorolt hatásán keresztül a hippocampus réteges elrendeződésével mutatott változatos elhelyezkedésével hozzájárul a principális sejtek bemenetspecifikus szabályozáshoz.

2. táblázat: A hippocampális principális sejtek dendritikus tulajdonságainak összehasonlítása

Paraméter	CA3 piramisajt (Kim et al., 2012)	CA1 piramisajt	GD szemcsesajt (Krueppel et al., 2011)
Na ⁺ konduktancia sűrűség a távolság függvényében	Növekvő	Konstans (Magee és Johnston, 1997; Kim et al., 2012)	Alacsony
A konduktancia sűrűség a távolság függvényében	Mérsékelten növekvő	Erőteljesen növekvő (Hoffman et al., 1997)	Alacsony
Késői rektifikáló konduktancia sűrűség	Csökkenő	Konstans (Hoffman et al., 1997)	Ismeretlen
Akciós potenciál visszaterjedés, dendritikus akciós potenciál amplitúdó	Mérsékelten csökkenő az első 100 μm-en	Exponenciálisan csökkenő (Spruston et al., 1995)	Erősen csillapított
Akciós potenciál visszaterjedés, időbeli lefutás	Közel konstans az első 100 μm-en	Szélesedő (Spruston et al., 1995)	Közel konstans
Akciós potenciál visszaterjedés, aktivitás függés	Minimális	Van (Jaffe et al., 1992; Spruston et al., 1995)	Minimális
Dendritikus akciós potenciál iniciáció	100 μm-en túli dendritikus elvezetésnél a neuronok 96%-ában	Az idegsejtek ~30%-ában (Golding és Spruston, 1998)	Nincs
Dendritikus akciós potenciál iniciáció, áramküszöb	~500 pA (~300 μm)	3,9 nA (Gasparini et al., 2004)	Nincs

A táblázat Kim és munkatársai (2012) cikkének táblázata alapján készült.



4. ábra: a, A hippocampális sejtálózat illusztrációja. **b,** A hippocampális sejtkapcsolatok sematikus ábrája. Folytonos nyilak jelölik a tradicionális triszinaptikus hurkot (entorhinális kéreg (EC) – gyrus dentatus – CA3 – CA1 – EC). Az entorhinális kéreg II. rétegi idegsejtjei a perforans pályán (PP) keresztül adják bemeneteiket a gyrus dentatusba, magukba foglalják a laterális (LPP) és mediális perforans pályát (MPP) is. A gyrus dentatus a moharostokon keresztül projekciókat küld a CA3 piramissejtekhez. A CA3 piramissejtek a Schaffer kollaterálisokon keresztül szinaptizálnak a CA1 piramissejtekkel, ahonnan az információ az entorhinális kéreg mélyebb rétegeibe továbbítódik. Az entorhinális kéreg direkt bemenetét a CA3 régió a II. rétegből, a CA1 a III. rétegből kapja. A gyrus dentatus további szinapszisokat ad a Hylus mohasejtjeire és interneuronjaira, amelyek serkentő illetve gátló projekciókat küldenek vissza a szemcsesejtekre. Az ábra Deng és munkatársainak összefoglaló cikkéből származik (2010).

A GABAerg gátlásnak hippokampális piramissejteken szerepe van mind a dendritikus Ca^{2+} -függő (Miles et al., 1996), mind az NMDA receptor aktivált regeneratív potenciálok szabályozásában (Collingridge et al., 1988). Azonban, hogy a dendritikus gátlás pontosan milyen formában vesz részt a sejtek bemeneti-kimeneti transzformációjában, még nagyjára ismeretlen. A sejtípusok, mikrohálózatok hatásainak specifikus kísérleti megközelítése manapság válik egyre elérhetőbbé. Lovett-Barron és munkatársainak (2012) optogenetikai és farmakogenetikai módszerek segítségével sikerült elkülönítenie két, a hippokampális CA1 piramissejtekre érkező, interneuronkört, és vizsgálni azok szerepét a Schaffer kollaterálisok egyidejű ingerlésével. Kísérleteikkel a disztális dendritikus régiót gátló szomatosztatin tartalmú, és a periszomatikusan beidegző parvalbumin pozitív interneuronok hatásainak megfigyelését célozták meg. Eredményükben meglepő, hogy megegyező glutamáterg serkentésre a szomatosztatin tartalmú idegsejtek által kiváltott dendritikus gátlás hatékonynak bizonyult a piramissejtek kimenetének csillapításában, azonban ezen gátlás hiányában a periszomatikus GABAerg bemenetek ellenére a sejtek intenzív tüzelését detektálták mindamellet, hogy proximálisan a glutamáterg szinapszisok száma igen csekély (Megias et al., 2001). Mindebből arra következtethetünk, hogy a dendritikusan létrejövő GABAerg sejtválasz sokkal erőteljesebb, mint a szomatikus, képes a helybeli serkentő bemenetek hatását teljesen lecsillapítani, és ezen keresztül a sejtek tüzelési frekvenciáját befolyásolni. A szomatoszenzoros kéregben a szomatosztatin tartalmú neuronok piramissejtek általi hatékony visszacsatoló gátlásáról írtak (Kapfer et al., 2007), míg a parvalbumin pozitív interneuronok az előrecsatoló gátlásukkal a hálózati oszcilláció kialakításában és a tüzelés időzítésében vesznek részt (Cobb et al., 1995; Pouille és Scanziani, 2001; Losonczy et al., 2010). Az eredmények azt mutatják, hogy a dendritikus gátlás csökkenése szükséges a dendritikus elektrogenezis létrejöttéhez, aminek a tüzelési frekvencia meghatározásában elsődleges szerepe van, és a CA1 piramissejtek esetében ez térbeli helyzettől függő mintázatot mutat, ami plasztikusan változik a környezettel (helysejtek) (Leutgeb et al., 2004; Leutgeb et al., 2005). A lokális interneuronhálózatoknak megvan a lehetőségük különböző frekvenciájú oszcillációk generálására, amivel a piramissejtek tüzelésének időzítésére gyakorolnak hatást, és további célsejteket aktiválnak. Az interneuronok elektrotónusosan kompaktabbak, mint a piramissejtek, így gyors időállandójukból fakadóan ugyanarra a serkentő bemenetre időben sokkal precízebb válaszadásra képesek (Mann és Paulsen, 2007).

A KCC2 sűrűségének axo-szomato-dendritikus növekedése mindkét principális sejt esetében azt sugallja, hogy a disztális dendritszakaszokon a GABA_A receptorokon keresztül létrejövő sejtválaszok hiperpolarizálóak (Glickfeld et al., 2009), ráadásul valószínűleg negatívabb reverzpotenciállal, mint a proximális szomatodendritikus szinapszisok. A KCC2 koncentrációjának növekedése és/vagy a KCC2 GABAerg szinapszisokkal szembeni nagyobb aránya közreműködhet a reverzpotenciál különbségekhez, amiket a szomatikus és dendritikus válaszok esetében mértek (Gulledge és Stuart, 2003; Szabadics et al., 2006; Khirug et al., 2008; Woodruff et al., 2009) azonban lásd (Glickfeld et al., 2009). A disztális területek szimmetrikus szinapszisokra nézve magasabb Cl⁻ kipumpáló kapacitása segítségével lehet az intracelluláris Cl⁻ homeosztázis fenntartásában és a GABA_A receptor mediált sejtválasz polaritásának fenntartásában egy tartós GABAerg hatást követően is, ami előfordulhat normál agykérgi funkciók esetén, de patológiás körülmények között is, mint a trauma, ischémia, oxidatív stressz, epilepszia, amikről tudjuk, hogy a KCC2 expresszióját leszabályozzák (Nabekura et al., 2002; Payne et al., 2003; Pond et al., 2006; Wake et al., 2007; Papp et al., 2008)

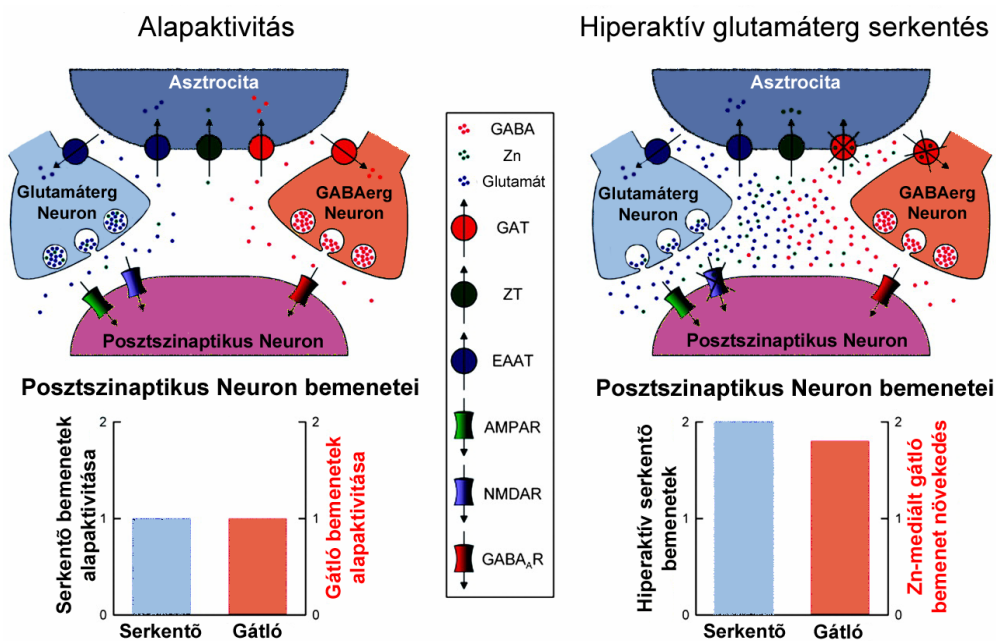
2. KCC2 és glutamáterg bemenetek – serkentő és gátló neurotranszmisszó

Kísérleti eredmények alapján a KCC2 jelenléte, transzporter aktivitása nélkül is, fontos szerepet játszik a dendrittűskék normális kialakulása során (Li et al., 2007; Fiumelli et al., 2012). Serkentő szinapszisok környékén való felhalmozódását megfigyelték már a hippocampusban és a thalamikus relé magvakban is (Gulyas et al., 2001; Bartho et al., 2004). A mi eredményeink alátámasztják a KCC2 jelenlétét a serkentő bemenetekkel ellátott dendrittűskéken, noha annak sűrűsége a CA1 piramissejtek esetében majd a felét teszi ki a nekik megfelelő dendrittörzs felszínén mért KCC2 sűrűségének, ami a hippocampus területén – általánosan – nem rendelkezik serkentő bemenettel. A korábbiakban és a most alkalmazott módszerek eltérő felbontása mellett a különbséget a piramissejtekre érkező különböző beidegzési mintázat valamint a piramissejtek és interneuronok változatos molekuláris struktúrája is eredményezheti. A dendrittűskéken kapott majd fele akkora KCC2 sűrűséget kompenzálhatja a dendrittűskék jóval nagyobb felszín – térfogat aránya, így a kevesebb KCC2 molekula képes lehet fenntartani a dendrittörzshöz hasonló intracelluláris Cl⁻ koncentrációt. Azokon a dendrittűskéken, amelyekre GABAerg bemenet is érkezett, nem fedeztünk fel különbséget a KCC2

mennyiségében, valamint a dendrittörzset ellátó szimmetrikus szinapszisok környékén sem észleltünk specifikus felhalmozódást.

A dendrittüskék hatásosan vesznek részt a különböző feszültség- és ligandfüggő ioncsatornák, receptorok aktivitásfüggő kompartmentalizációjában (Bloodgood és Sabatini, 2007), azonban a szinaptikus kapcsolatokban betöltött elektromos funkciójuk még pontosan ismeretlen. Makara Judit és munkatársainak adatai szerint (2012) a dendrittüskéken a kialakult feszültségválasz 2-45-szörös csillapításon esik át, ami a dendritág kábel tulajdonságaira vezethető vissza és nem a membránkonduktanciákra: kisebb átmérőjű disztális dendritágon kisebb csillapítás észlelhető. Eredményeik arra utalnak, hogy a dendrittüskéknek szerepe van a lokális szinaptikus depolarizációk felerősítésében, ezáltal elősegítik a feszültségfüggő konduktanciák aktivációját, a bemenetek közötti elektromos kölcsönhatások létrejöttét, és ennek következtében a nemlineáris információfeldolgozást, amit a disztális dendritszakaszokra érkező bemenetekről már leírtak (Antic et al., 2010).

A normális dendrittüskék kialakulásához szükséges KCC2 jelenléte összekötő funkciót sejtet a gátló és serkentő jelátvitel között. A hippokampusz területén számoltak be hasonló jelenségről a Zn^{2+} nagymértékű előfordulásával kapcsolatban (Cohen-Kfir et al., 2005; Frederickson et al., 2005). A glutamáterg terminálisokból Ca^{2+} - és impulzusfüggően felszabaduló Zn^{2+} együtt jár a GABAerg gátlás megnövekedésével (Assaf és Chung, 1984; Howell et al., 1984; Beaulieu et al., 1992). Az extracelluláris Zn^{2+} koncentráció 10 nM-ról 300 μ M-ra való megemelkedése (Assaf és Chung, 1984; Howell et al., 1984) hatásosan gátolja a GABA transzporter 4-et (GAT4) (Cohen-Kfir et al., 2005), ezáltal megnövekedik mind a szinaptikus mind az extraszinaptikus GABA koncentráció, ami a gátló neurotranszmisszió erősödéséhez vezet. A megemelkedett glutamáterg aktivitás során felszabaduló Zn^{2+} tehát a GABAerg transzmisszió elősegítésével és a posztzinaptikus NMDA receptorok gátlásán keresztül (Frederickson és Moncrieff, 1994) csökkenti a posztzinaptikus sejt túlzott mértékű aktivitását, azaz neuroprotektív hatással bír (**5. ábra**).



5. ábra: Modell a cink fiziológiai szerepéről. (Fentebb) Az ábra a mohaterminális – CA3 piramisajt szinapszisát ábrázolja normál (**Balra**) és hiperaktív (**Jobbra**) állapotban. A posztzinaptikus sejt egy CA3 hippokampális idegsejt. A glutamáterg terminális a gyrus dentatus szemcsesejtek moharostjaihoz tartozik, a GABAerg terminális lehet mind a GABAerg moharostoké, mind GABAerg interneuronoké. A Zn^{2+} preszinaptikus vezikulákba kerülése egy ismeretlen Zn^{2+} transzporterrel valósul meg. A hiperaktív glutamáterg útvonal a glutamáterg neuronok intenzív serkentésével jön létre. (**Lentebb**) A serkentő és gátló bemenetek megbecsült relatív mennyisége normál (**Balra**) és hiperaktív (**Jobbra**) állapotokban. ZT, Zn^{2+} transzporter; EAAT, serkentő aminosav (glutamát) transzporter; AMPAR, AMPA receptor; NMDAR, NMDA receptor; GABA_AR, GABA_A receptor. Az ábra Cohen-Kfir (2005) cikkének ábrája alapján készült.

3. Tónusos gátlás és a δ alegységgel rendelkező GABA_A receptor

A GABA-mediált tónusos gátlás csökkenti az idegsejtek ingerelhetőségét a konduktanciájuk tartós megemelése által, így hatással van a sejtek tüzelési küszöbpotenciáljára és mintázatára is. A központi idegrendszerben számos alegységgel ($\alpha 1$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\gamma 2$, δ , ϵ) rendelkező GABA_A receptorról leírták, hogy részt vesznek a tónusos áramok szabályozásában (Lindquist és Birnir, 2006; Farrant és Kaila, 2007; Glykys és Mody, 2007a; Belelli et al., 2009; Martin et al., 2009), amik további endogén anyagok kontrollja alatt állnak. A GABA_A $\alpha 5$ receptorok tónusos áramai, melyek a hippokampális piramisajtsejtekre jellemzőek (Caraiscos et al., 2004; Scimemi et al., 2005),

inzulin jelenlétében aktiválódnak (Jin et al., 2011), és jelentős hatást gyakorolnak a kognitív funkciókra (Crestani et al., 2002; Caraiscos et al., 2004; Pavlov et al., 2009; Martin et al., 2010; Prut et al., 2010). A GABA_Aδ receptor mediált tonikus áramok pedig különböző neuro- és kortikoszteroidokra mutatnak érzékenységet (Belelli és Lambert, 2005). Noha a tónusos áramokat vizsgálták már kortikális és hippocampális principális sejteken (Brickley et al., 2001; Nusser és Mody, 2002; Drasbek és Jensen, 2006), viszonylag kevés az ismeretünk az interneuronok tónusos gátlásáról. Első rétegi agykérgi (Keros és Hablitz, 2005) és hippocampális interneuronok tónusos áramai mellett (Semyanov et al., 2003; Glykys és Mody, 2007a) leírtak olyan 2-3. rétegi kérgi szomatosztatin tartalmú interneuronokat, melyeken nem tudták ezeket detektálni, valamint a piramissejtekhez viszonyított fázisos gátlásuk is meglehetősen kicsinek bizonyult (Dumitriu et al., 2007; Vardya et al., 2008). Ezek alapján egy olyan GABAerg hálózatot feltételeznek, ami viszonylag ritka gátló bemenet mellett megbízhatóan, tónusos gátlás okozta csendesítés nélkül, képes az agykérgi piramissejtek visszacsatoló gátlására (Kapfer et al., 2007; Vardya et al., 2008). (Hippocampális szomatosztatin tartalmú interneuronokon is leírták a szinaptikus GABAerg gátlás kismértékű hatását az oriens-lacunosum moleculare sejtek esetében (Maccaferri et al., 2000), míg a kétrétegű sejteknél a fázikus válasz kifejezett (Cobb et al., 1997)). Az általunk végzett GABA_Aδ receptor immunfestés rámutatott annak szomatodendritikus kifejeződésére, ami az interneuronok között nagy szelektivitást mutatott a neurogliaform sejtekre nézve. A neurogliaform sejtek a GABA_A és GABA_B receptorokon kiváltott posztzinaptikus gátlásukon kívül (Tamas et al., 2003) szerepet játszanak a hálózati kommunikáció csökkentésében a preszinaptikus terminálisokon elhelyezkedő GABA receptorok és a tonikus gátlásban részt vevő GABA csatornák nyitásával (Olah et al., 2009). Nagymértékű GABA_Aδ receptor tartalmuk alkalmassá teszi őket a neuroszteroidok általi szabályozásra, amikor elcsendesítésük megváltoztatja a hálózati gátlás eloszlását, lehetőséget teremtve nagyobb lokális aktivitásra, az idegsejtek közötti élénkebb kommunikációra.

Továbbá, az agykérgi felsőbb rétegek intenzív neuropil jelölése, ami jobbra a piramissejtek dendritjeinek köszönhető (Vardya et al., 2008), és a hippocampusz immunfluoreszcens mintázata összhangban áll a korábbi elektrofiziológiai adatokkal, melyek a gyrus dentatus szemcsesejtjein és a molekuláris réteg interneuronjain relative nagy tónusos gátlást mutatnak, a hippocampális piramissejtek kisebb áramaival szemben (Glykys és Mody, 2007a).

6. ÖSSZEFOGLALÓ

Az idegrendszert felépítő neuronok precízen szabályozott ionháztartása az alapja elektromos tulajdonságaiknak, és ezáltal a közöttük fellépő kapcsolatok minőségének. A központi idegrendszer legfőbb gátló neurotranszmittere, a γ -aminovajsav (GABA) az általa aktivált ligandfüggő Cl^- ioncsatornához (GABA_A receptor) kötődve az egyedfejlődés kezdeti szakaszán a posztszinaptikus sejt serkentését (depolarizációját) váltja ki, míg ez a válasz két hét elteltével már gátlóvá (hiperpolarizálóvá) válik (Ben-Ari et al., 1989; Plotkin et al., 1997; Clayton et al., 1998; Rivera et al., 1999; Wang et al., 2002; Dzhalala et al., 2005). Ezt nagyrészt a K^+ - Cl^- kotranszporter KCC2 mennyiségi változása hozza létre, mely működésével elősegíti az alacsony intracelluláris Cl^- ion koncentráció kialakítását (Payne et al., 2003). A szinaptikus GABA_A receptorok aktiválódása vezet gyors posztszinaptikus válaszhoz, míg az extraszinaptikus receptorokon keresztül jönnek létre az időben tartósabb, tónusos áramok, melyek meghatározóak a hálózati aktivitás szabályozásában (Semyanov et al., 2003), és az információfeldolgozásban (Mitchell és Silver, 2003; Chadderton et al., 2004). A $\text{GABA}_A\delta$ receptort számos tulajdonsága teszi hatékonyvá a tónusos gátláshoz való közreműködésében.

A KCC2 mennyiségi eloszlásának a posztszinaptikus GABA_A válaszra gyakorolt hatását kutatócsoportunk már korábbiakban az agykérgi piramisisejtek periszomatikus régióján leírta, miszerint az axon iniciális szegmentumon található elenyésző mennyiségű KCC2 tartalom hozzájárul az axo-axonikus sejt által kiváltott GABA_A depolarizáló válaszhoz. A piramisisejtek dendritikus régiójában a potenciálisan különböző KCC2 tartalom magyarázatot adhat a GABA_A válasz vizsgálatával kapott eltérő eredményekre (Alger és Nicoll, 1979; Andersen et al., 1980; Perkins and Wong, 1997; Gullledge and Stuart, 2003; Glickfeld et al., 2009), ehhez azonban a KCC2 dendritikus eloszlása meghatározásra vár. A patkány hippocampális principális sejtek KCC2 koncentrációjának meghatározására nagy felbontású beágyazás előtti immunolokalizációs módszert alkalmaztunk. Agykérgi piramisisejtekről kapott korábbi eredményeinket alátámasztotta a CA1 piramisisejtjeinek valamint a gyrus dentatus szemcsesejtjeinek axon iniciális szegmentumán mért KCC2 tartalom, ami a megfelelő szomatikus érték $6,4 \pm 11,9\%$ és $6,6 \pm 14,1\%$ -át érte el. A bazális dendritek KCC2 koncentrációja a str. oriensben hasonló a szomatikus koncentrációhoz ($109,2 \pm 48,8\%$). A piramisisejtek apikális dendritjének

mentén a KCC2 komplex eloszlást mutatott. A szomatikus értékekhez viszonyítva (100%) a következő eredményeket kaptuk: $124,5 \pm 15,7\%$ és $79 \pm 12,4\%$ a str. radiatum proximális és disztális részén valamint $98,2 \pm 33,5\%$ a stratum lacunosum moleculareban. A CA1 piramissejtek dendrittüskéi, amelyekre a serkentő bemenetek érkeznek, $39,9 \pm 8,5\%$ -ban tartalmaznak KCC2-t a nekik megfelelő régiókban mért dendrittörzshöz viszonyítva, ahová a GABAerg bemenetek érkeznek. A gyrus dentatus sejt felszíni KCC2 tartalma nagyobb értékeket mutatott a dendriteken ($148,9 \pm 54\%$), mint a szómán (100%), azonban a dendritek mentén nem észleltünk koncentrációgrádiens-t a proximális és disztális régiók között. Összefoglalásképpen tehát megállapíthatjuk, hogy a KCC2 sűrűség a hippokampális principális sejtek axo-szomato-dendritikus tengelyének mentén növekszik, és sejt típus specifikus eloszlást mutat.

A KCC2 sűrűségének axo-szomato-dendritikus növekedése mindkét principális sejt esetében azt sugallja, hogy a disztális dendritszakaszokon a GABA_A receptorokon keresztül létrejövő sejt válaszok hiperpolarizálóak (Glickfeld et al., 2009), ráadásul valószínűleg negatívabb reverzpotenciállal, mint a proximális szomatodendritikus szinapszisok esetében. A KCC2 koncentrációjának növekedése és/vagy a KCC2 GABAerg szinapszisokkal szembeni nagyobb aránya közreműködhet a reverzpotenciál különbségekhez, amiket a szomatikus és dendritikus válaszok esetében mértek (Gulledge and Stuart, 2003; Szabadics et al., 2006; Khirug et al., 2008; Woodruff et al., 2009) azonban lásd (Glickfeld et al., 2009). A disztális területek szimmetrikus szinapszisokra nézve magasabb Cl⁻ kipumpáló kapacitása hozzájárulhat az intracelluláris Cl⁻ ion homeosztázis és a GABA_A receptor mediált sejt válasz polaritásának fenntartásában egy tartós GABAerg neurotranszmissziót követően is, ami előfordulhat normál agykérgi tevékenységek, de patológias körülmények között is, mint a trauma, ischémia, oxidatív stressz, vagy az epilepszia, amikről tudjuk, hogy a KCC2 expresszióját leszabályozzák (Nabekura et al., 2002; Payne et al., 2003; Pond et al., 2006; Wake et al., 2007; Papp et al., 2008).

A GABAerg gátlás neurogliaform sejtek által kiváltott extraszinaptikus hatását vizsgálva szemügyre vettük az ott jelenlévő, tónusos gátlásban résztvevő, delta alegységet tartalmazó GABA_A receptorok elhelyezkedését. Feltérképezésére immunfluoreszcens technikát választottunk. A szupragranuláris rétegek intenzív neuropil festődése mellett, amely nagyrészt a piramissejtek dendritjeinek köszönhető (Vardya et al., 2008), az interneuronok egy része igen erős jelölődést mutatott, ami a GABA_Aδ -/- állatok esetében

hiányzott. A GABA_Aδ immunopozitív interneuronok azonosítására többjelöléses immunreakciókat végeztünk. A GABA_Aδ receptort tartalmazó sejtek 65 ± 12%-a adott α-actinin2-vel kolokalizációt (n = 3 patkány), ami az elektrofiziológiásan azonosított neurogliaform sejtekben megtalálható. További interneuron markerekkel, mint a parvalbumin, szomatosztatin, calbindin, calretinin és vazóaktív intesztinális peptid, nem találtunk átfedést. A hippocampusz CA1-3 területén, a stratum radiatum / lacunosum moleculare határán és a stratum pyramidalehez közel elhelyezkedő interneuronokon észleltünk intenzív festődést a GABA_A receptor delta alegységével szemben. Ezek az interneuronok feltehetően megfelelnek a hippocampális neurogliaform valamint Ivy sejteknek. A hippocampusz immunfluoreszcens mintázata alátámasztja a korábbi elektrofiziológiai adatokat, miszerint a gyrus dentatus szemcsesejtjein és a molekuláris réteg interneuronjain, ellentétben a hippocampális piramisisejtek kisebb áramaival, relatíve nagy tónusos gátlás érvényesül.

Az általunk végzett GABA_Aδ receptor immunfestés rámutatott annak szomatodendritikus kifejeződésére, ami az interneuronok között nagy szelektivitást mutatott a neurogliaform sejtekre nézve. A neurogliaform sejtek a GABA_A és GABA_B receptorokon kiváltott posztzinaptikus gátlásukon kívül (Tamas et al., 2003) szerepet játszanak a hálózati kommunikáció csökkentésében a preszinaptikus terminálisokon elhelyezkedő GABA receptorok és a tónusos gátlásban résztvevő GABA csatornák nyitásával (Olah et al., 2009). Nagymértékű GABA_Aδ receptor tartalmuk alkalmassá teszi őket a neuroszteroidok általi szabályozásra, amikor elcsendesítésük megváltoztatja a hálózati gátlás eloszlását, lehetőséget teremtve nagyobb lokális aktivitásra, az idegsejtek közötti élénkebb kommunikációra.

A tónusosan és fázikusan aktív receptorokon átfolyó áramok aránya mintegy 3-5:1 (Mody and Pearce, 2004; Cavalier et al., 2005), ami jelzi, hogy jelentős befolyással bírnak a sejt bemeneti-kimeneti kapcsolatára (Mitchell and Silver, 2003; Chadderton et al., 2004; Semyanov et al., 2004; Cavalier et al., 2005). A tónusos áramokban bekövetkező változások funkcionális következményeiről egyre több adattal rendelkezünk. Az ovarialis ciklus során változik a GABA_Aδ receptorok expressziója (Maguire et al., 2005; Lovick, 2006), részt vesz a stresszválaszban (Stell et al., 2003), ittas állapotban (Mody et al., 2007), hatással van a kognitív funkciókra (Caraiscos et al., 2004), és egyes epilepszia modelleknek is szereplője (Peng et al., 2004; Zhang et al., 2007).

7. SUMMARY

The precisely regulated ionic homeostasis of the nerve cells is the basis of their electrical properties, and so, of the quality of their connections. Communication between neurons come off partially by synapses. The main inhibitory neurotransmitter in nervous system, the γ -aminobutyric acid (GABA) exerts its effect through the ionotropic GABA_A receptors according to the intracellular Cl⁻ ion concentration, and through the metabotropic GABA_B receptors. Kation-chloride cotransporters regulates neuronal Cl⁻ concentration and between them, K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2 have been reported to be largely responsible for the hyperpolarizing GABAergic responses in mature nerve cells (Payne et al., 2003). Synaptic GABA_A receptors mediate fast postsynaptic effect while extrasynaptic receptors act in tonic inhibition regulating cortical excitability (Semyanov et al., 2003) and information processing (Mitchell and Silver, 2003; Chadderton et al., 2004). δ -subunit containing GABA_A receptors (GABA_A δ) has several properties that promotes its effective participation in tonic inhibition.

Our previous experiments applying high resolution immunolocalization showed the relative lack of KCC2 in the axon initial segment compared to the soma of neocortical pyramidal cells (Szabadics et al., 2006). Low KCC2 levels in the plasma membrane of the axon initial segment of pyramidal cells can contribute to variable reversal potentials for perisomatic GABA_A receptor mediated postsynaptic potentials (Szabadics et al., 2006; Khirug et al., 2008; Glickfeld et al., 2009; Woodruff et al., 2009). Potentially variable KCC2 concentrations in the dendritic region of pyramidal cells might explain some of the diverse results functionally testing the polarity of dendritic GABAergic responses (Alger and Nicoll, 1979; Andersen et al., 1980; Perkins and Wong, 1997; Gullledge and Stuart, 2003; Glickfeld et al., 2009) but the distribution of KCC2 on dendrites of pyramidal cells remains to be established. We applied high-resolution pre-embedding immunolocalization to quantify KCC2 concentrations along dendritic, somatic and axonal regions of rat hippocampal principal cells. Confirming our results on neocortical pyramidal cells, membranes of AIS of CA1 pyramidal cells and dentate granule cells contained $6.4 \pm 11.9\%$ and $6.6 \pm 14.1\%$ of somatic KCC2 concentrations, respectively. Concentrations of KCC2 in basal dendritic shafts of stratum (str.) oriens were similar to somatic levels ($109.2 \pm 48.8\%$). Along apical dendritic shafts of CA1 pyramidal cells, the concentration of KCC2

showed a complex profile: normalized to somatic levels, the density of KCC2 was $124.5 \pm 15.7\%$, $79 \pm 12.4\%$ and $98.2 \pm 33.5\%$ in the proximal and distal part of str. radiatum and in str. lacunosum moleculare, respectively. Dendritic spines of CA1 receiving excitatory inputs contained $39.9 \pm 8.5\%$ of KCC2 concentration measured in shafts of the same dendritic segments targeted by GABAergic inputs. Dendrites of dentate granule cells, the other glutamatergic cell type in hippocampus, showed higher KCC2 concentration compared with the soma ($148.9 \pm 54\%$), but no concentration gradient was detected between proximal and distal dendrites. In conclusion, the density of KCC2 in hippocampal principal cells increases along the axo-somato-dendritic axis with cell type-specific distribution profiles within the dendritic tree.

The axo-somato-dendritic increase in KCC2 density in both principal cell types of the hippocampus suggest that relatively distal dendritic responses through GABA_A receptors are likely to be hyperpolarizing (Glickfeld et al., 2009), possibly with a more negative reversal potential than proximal somatodendritic synapses. Indeed, increasing KCC2 concentrations and/or KCC2 versus GABAergic input ratios in the apical dendrite described here could contribute to the apparent reversal potential difference measured for somatic and dendritic GABAergic signals (Gulledge and Stuart, 2003; Szabadics et al., 2006; Khirug et al., 2008; Woodruff et al., 2009), but see (Glickfeld et al., 2009). Furthermore, the higher Cl⁻ extrusion capacity relative to symmetrical synapses in distal apical or thin basal dendrites might help in keeping intracellular Cl⁻ homeostasis and the polarity of GABA_A receptor mediated response polarity during sustained GABAergic bombardment which can be related to normal cortical function or to pathological conditions such as trauma, epilepsy, oxidative stress, or ischemia known to downregulate the expression of KCC2 (Nabekura et al., 2002; Payne et al., 2003; Pond et al., 2006; Wake et al., 2007; Papp et al., 2008).

Examining the extrasynaptic effects of neurogliaform cells we focused on delta subunit containing GABA_A receptors that act through tonic inhibition. For the localization we used immunofluorescent method on the neocortex. In addition to a robust neuropil labeling in supragranular layers presumably due to dendrites of pyramidal cells, a subset of interneurons was strongly positive for the GABA_Aδ. The identity of strongly GABA_Aδ immunopositive interneurons was initially tested by multiple immunoreactions showing that α-actinin2, known to be expressed by electrophysiologically identified neocortical neurogliaform cells, were present in $65 \pm 12\%$ of GABA_Aδ receptor containing cells.

However, no overlap was found with interneuron markers such as parvalbumin, somatostatin, calbindin, calretinin and vasoactive intestinal polypeptide. In addition, immunocytochemical labeling patterns in the hippocampus were in line with earlier electrophysiological data showing relatively large tonic inhibition in hippocampal granule cells and molecular layer interneurons in the dentate gyrus and weaker currents in pyramidal cells of the hippocampus. In the CA1 and CA3 regions, a subset of interneurons at the border of stratum radiatum and lacunosum moleculare and another population of interneurons close to stratum pyramidale show strong immunolabeling for GABA_Aδ receptors. These interneurons presumably correspond to hippocampal neurogliaform cells and Ivy cells, respectively. Neurosteroids might shift the balance among the sources of ambient GABA by lowering the contribution of neurogliaform cells with a selective increase in tonic inhibition through GABA_Aδ receptors. Varying neurosteroid concentrations during the ovarian cycle and pregnancy and as a result of stress (Stell et al., 2003; Glykys and Mody, 2007a) are expected to modulate the action of neurogliaform cells on network hyperpolarization and in suppressing communication in the local circuit acting on axons of resident neurons or terminals of long-range projections at their arrival (Olah et al., 2009).

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Tamás Gábornak, aki tudásával és bizalmával elindított a kutatói pályán.

Örömmel lehetek részese laborja szellemi és gyakorlati munkájának Dr. Molnár Gábor, Dr. Varga Csaba, Dr. Oláh Szabolcs, Tóth Éva, Komlósi Gergely, Rózsa Márton, Baka Judith, Boldog Eszter, Lovas Sándor, Szemenyei Viktor, Piszár Ildikó, Dr. Kocsis Katalin Ágnes, Dr. Vámos Enikő, és Dr. Füle Miklós társaságában.

És nem utolsó sorban hálával tartozom Barátaimnak és Családomnak szerető közreműködésükért.

9. IRODALOMJEGYZÉK

- Acker CD, Antic SD (2009) Quantitative assessment of the distributions of membrane conductances involved in action potential backpropagation along basal dendrites. *J Neurophysiol* 101:1524-1541.
- Alger BE, Nicoll RA (1979) GABA-mediated biphasic inhibitory responses in hippocampus. *Nature* 281:315-317.
- Andersen P, Dingledine R, Gjerstad L, Langmoen IA, Laursen AM (1980) Two different responses of hippocampal pyramidal cells to application of gamma-amino butyric acid. *J Physiol* 305:279-296.
- Antic SD (2003) Action potentials in basal and oblique dendrites of rat neocortical pyramidal neurons. *J Physiol* 550:35-50.
- Antic SD, Zhou WL, Moore AR, Short SM, Ikonomu KD (2010) The decade of the dendritic NMDA spike. *J Neurosci Res* 88:2991-3001.
- Assaf SY, Chung SH (1984) Release of endogenous Zn²⁺ from brain tissue during activity. *Nature* 308:734-736.
- Baldi R, Varga C, Tamas G (2010) Differential distribution of KCC2 along the axo-somato-dendritic axis of hippocampal principal cells. *Eur J Neurosci* 32:1319-1325.
- Banke TG, McBain CJ (2006) GABAergic input onto CA3 hippocampal interneurons remains shunting throughout development. *J Neurosci* 26:11720-11725.
- Bartho P, Payne JA, Freund TF, Acsady L (2004) Differential distribution of the KCl cotransporter KCC2 in thalamic relay and reticular nuclei. *Eur J Neurosci* 20:965-975.
- Bartos M, Vida I, Jonas P (2007) Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks. *Nat Rev Neurosci* 8:45-56.
- Basu JaS, S. A. (2012) ITDP: A heterosynaptic form of plasticity that integrates excitatory dendritic inputs with the local hippocampal inhibitory microcircuit. In: Janelia Farm Conference. *Dendrites: Substrates for Information Processing.*, p 13.
- Beaulieu C, Dyck R, Cynader M (1992) Enrichment of glutamate in zinc-containing terminals of the cat visual cortex. *Neuroreport* 3:861-864.
- Belelli D, Lambert JJ (2005) Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA(A) receptor. *Nat Rev Neurosci* 6:565-575.
- Belelli D, Harrison NL, Maguire J, Macdonald RL, Walker MC, Cope DW (2009) Extrasynaptic GABAA receptors: form, pharmacology, and function. *J Neurosci* 29:12757-12763.
- Ben-Ari Y, Cherubini E, Corradetti R, Gaiarsa JL (1989) Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *J Physiol* 416:303-325.
- Berod A, Hartman BK, Pujol JF (1981) Importance of fixation in immunohistochemistry: use of formaldehyde solutions at variable pH for the localization of tyrosine hydroxylase. *J Histochem Cytochem* 29:844-850.
- Bianchi MT, Macdonald RL (2003) Neurosteroids shift partial agonist activation of GABA(A) receptor channels from low- to high-efficacy gating patterns. *J Neurosci* 23:10934-10943.
- Bischofberger J, Jonas P (1997) Action potential propagation into the presynaptic dendrites of rat mitral cells. *J Physiol* 504 (Pt 2):359-365.
- Blomfield S (1974) Arithmetical operations performed by nerve cells. *Brain Res* 69:115-124.

- Bloodgood BL, Sabatini BL (2007) Nonlinear regulation of unitary synaptic signals by CaV(2.3) voltage-sensitive calcium channels located in dendritic spines. *Neuron* 53:249-260.
- Brickley SG, Revilla V, Cull-Candy SG, Wisden W, Farrant M (2001) Adaptive regulation of neuronal excitability by a voltage-independent potassium conductance. *Nature* 409:88-92.
- Bright DP, Aller MI, Brickley SG (2007) Synaptic release generates a tonic GABA(A) receptor-mediated conductance that modulates burst precision in thalamic relay neurons. *J Neurosci* 27:2560-2569.
- Caraiscos VB, Elliott EM, You-Ten KE, Cheng VY, Belelli D, Newell JG, Jackson MF, Lambert JJ, Rosahl TW, Wafford KA, MacDonald JF, Orser BA (2004) Tonic inhibition in mouse hippocampal CA1 pyramidal neurons is mediated by alpha5 subunit-containing gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3662-3667.
- Cash S, Yuste R (1999) Linear summation of excitatory inputs by CA1 pyramidal neurons. *Neuron* 22:383-394.
- Cavelier P, Hamann M, Rossi D, Mobbs P, Attwell D (2005) Tonic excitation and inhibition of neurons: ambient transmitter sources and computational consequences. *Prog Biophys Mol Biol* 87:3-16.
- Chadderton P, Margrie TW, Hausser M (2004) Integration of quanta in cerebellar granule cells during sensory processing. *Nature* 428:856-860.
- Chang HT (1951a) Changes in excitability of cerebral cortex following single electric shock applied to cortical surface. *J Neurophysiol* 14:95-111.
- Chang HT (1951b) Dendritic potential of cortical neurons produced by direct electrical stimulation of the cerebral cortex. *J Neurophysiol* 14:1-21.
- Chen WR, Midtgaard J, Shepherd GM (1997) Forward and backward propagation of dendritic impulses and their synaptic control in mitral cells. *Science* 278:463-467.
- Cheng VY, Martin LJ, Elliott EM, Kim JH, Mount HT, Taverna FA, Roder JC, Macdonald JF, Bhambri A, Collinson N, Wafford KA, Orser BA (2006) Alpha5GABAA receptors mediate the amnesic but not sedative-hypnotic effects of the general anesthetic etomidate. *J Neurosci* 26:3713-3720.
- Clark BA, Monsivais P, Branco T, London M, Hausser M (2005) The site of action potential initiation in cerebellar Purkinje neurons. *Nat Neurosci* 8:137-139.
- Clayton GH, Owens GC, Wolff JS, Smith RL (1998) Ontogeny of cation-Cl⁻ cotransporter expression in rat neocortex. *Brain Res Dev Brain Res* 109:281-292.
- 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.
- Cobb SR, Halasy K, Vida I, Nyiri G, Tamas G, Buhl EH, Somogyi P (1997) Synaptic effects of identified interneurons innervating both interneurons and pyramidal cells in the rat hippocampus. *Neuroscience* 79:629-648.
- Cohen-Kfir E, Lee W, Eskandari S, Nelson N (2005) Zinc inhibition of gamma-aminobutyric acid transporter 4 (GAT4) reveals a link between excitatory and inhibitory neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:6154-6159.
- Collingridge GL, Herron CE, Lester RA (1988) Synaptic activation of N-methyl-D-aspartate receptors in the Schaffer collateral-commissural pathway of rat hippocampus. *J Physiol* 399:283-300.
- Cope DW, Hughes SW, Crunelli V (2005) GABAA receptor-mediated tonic inhibition in thalamic neurons. *J Neurosci* 25:11553-11563.

- Crestani F, Keist R, Fritschy JM, Benke D, Vogt K, Prut L, Bluthmann H, Mohler H, Rudolph U (2002) Trace fear conditioning involves hippocampal alpha5 GABA(A) receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8980-8985.
- Debanne D (2004) Information processing in the axon. *Nat Rev Neurosci* 5:304-316.
- Deng W, Aimone JB, Gage FH (2010) New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci* 11:339-350.
- Drasbek KR, Jensen K (2006) THIP, a hypnotic and antinociceptive drug, enhances an extrasynaptic GABA(A) receptor-mediated conductance in mouse neocortex. *Cereb Cortex* 16:1134-1141.
- Dumitriu D, Cossart R, Huang J, Yuste R (2007) Correlation between axonal morphologies and synaptic input kinetics of interneurons from mouse visual cortex. *Cereb Cortex* 17:81-91.
- Dzhala VI, Talos DM, Sdrulla DA, Brumback AC, Mathews GC, Benke TA, Delpire E, Jensen FE, Staley KJ (2005) NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. *Nat Med* 11:1205-1213.
- Emptage N, Bliss TV, Fine A (1999) Single synaptic events evoke NMDA receptor-mediated release of calcium from internal stores in hippocampal dendritic spines. *Neuron* 22:115-124.
- Farrant M, Nusser Z (2005) Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat Rev Neurosci* 6:215-229.
- Farrant M, Kaila K (2007) The cellular, molecular and ionic basis of GABA(A) receptor signalling. *Prog Brain Res* 160:59-87.
- Fatt P, Katz B (1953) The effect of inhibitory nerve impulses on a crustacean muscle fibre. *J Physiol* 121:374-389.
- Fiumelli H, Cancedda L, Poo MM (2005) Modulation of GABAergic transmission by activity via postsynaptic Ca²⁺-dependent regulation of KCC2 function. *Neuron* 48:773-786.
- Fiumelli H, Briner A, Puskarjov M, Blaesse P, Belem BJ, Dayer AG, Kaila K, Martin JL, Vutskits L (2012) An Ion Transport-Independent Role for the Cation-Chloride Cotransporter KCC2 in Dendritic Spinogenesis In Vivo. *Cereb Cortex*.
- Frederickson CJ, Moncrieff DW (1994) Zinc-containing neurons. *Biol Signals* 3:127-139.
- Frederickson CJ, Koh JY, Bush AI (2005) The neurobiology of zinc in health and disease. *Nat Rev Neurosci* 6:449-462.
- Gasparini S, Migliore M, Magee JC (2004) On the initiation and propagation of dendritic spikes in CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 24:11046-11056.
- Glickfeld LL, Roberts JD, Somogyi P, Scanziani M (2009) Interneurons hyperpolarize pyramidal cells along their entire somatodendritic axis. *Nat Neurosci* 12:21-23.
- Glykys J, Mody I (2006) Hippocampal network hyperactivity after selective reduction of tonic inhibition in GABA A receptor alpha5 subunit-deficient mice. *J Neurophysiol* 95:2796-2807.
- Glykys J, Mody I (2007a) Activation of GABA(A) receptors: views from outside the synaptic cleft. *Neuron* 56:763-770.
- Glykys J, Mody I (2007b) The main source of ambient GABA responsible for tonic inhibition in the mouse hippocampus. *J Physiol* 582:1163-1178.
- Golding NL, Spruston N (1998) Dendritic sodium spikes are variable triggers of axonal action potentials in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Neuron* 21:1189-1200.

- Golding NL, Jung HY, Mickus T, Spruston N (1999) Dendritic calcium spike initiation and repolarization are controlled by distinct potassium channel subtypes in CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 19:8789-8798.
- Grichtchenko, II, Choi I, Zhong X, Bray-Ward P, Russell JM, Boron WF (2001) Cloning, characterization, and chromosomal mapping of a human electroneutral Na(+)-driven Cl-HCO₃ exchanger. *J Biol Chem* 276:8358-8363.
- Gulacsi A, Lee CR, Sik A, Viitanen T, Kaila K, Tepper JM, Freund TF (2003) Cell type-specific differences in chloride-regulatory mechanisms and GABA(A) receptor-mediated inhibition in rat substantia nigra. *J Neurosci* 23:8237-8246.
- Gulledge AT, Stuart GJ (2003) Excitatory actions of GABA in the cortex. *Neuron* 37:299-309.
- Gulyas AI, Sik A, Payne JA, Kaila K, Freund TF (2001) The KCl cotransporter, KCC2, is highly expressed in the vicinity of excitatory synapses in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 13:2205-2217.
- Haas KF, Macdonald RL (1999) GABA_A receptor subunit gamma2 and delta subtypes confer unique kinetic properties on recombinant GABA_A receptor currents in mouse fibroblasts. *J Physiol* 514 (Pt 1):27-45.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391:85-100.
- Hao J, Wang XD, Dan Y, Poo MM, Zhang XH (2009) An arithmetic rule for spatial summation of excitatory and inhibitory inputs in pyramidal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:21906-21911.
- Hasselmo ME, Eichenbaum H (2005) Hippocampal mechanisms for the context-dependent retrieval of episodes. *Neural Netw* 18:1172-1190.
- Hausser M, Stuart G, Racca C, Sakmann B (1995) Axonal initiation and active dendritic propagation of action potentials in substantia nigra neurons. *Neuron* 15:637-647.
- Herreras O (1990) Propagating dendritic action potential mediates synaptic transmission in CA1 pyramidal cells in situ. *J Neurophysiol* 64:1429-1441.
- Hodgkin AL, Huxley AF (1952) Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J Physiol* 116:449-472.
- Hoffman DA, Magee JC, Colbert CM, Johnston D (1997) K⁺ channel regulation of signal propagation in dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Nature* 387:869-875.
- Hollrigel GS, Ross ST, Soltesz I (1998) Temporal patterns and depolarizing actions of spontaneous GABA_A receptor activation in granule cells of the early postnatal dentate gyrus. *J Neurophysiol* 80:2340-2351.
- Holthoff K, Zecevic D, Konnerth A (2010) Rapid time course of action potentials in spines and remote dendrites of mouse visual cortex neurons. *J Physiol* 588:1085-1096.
- Howell GA, Welch MG, Frederickson CJ (1984) Stimulation-induced uptake and release of zinc in hippocampal slices. *Nature* 308:736-738.
- Hu H, Martina M, Jonas P (2010) Dendritic mechanisms underlying rapid synaptic activation of fast-spiking hippocampal interneurons. *Science* 327:52-58.
- Jaffe DB, Johnston D, Lasser-Ross N, Lisman JE, Miyakawa H, Ross WN (1992) The spread of Na⁺ spikes determines the pattern of dendritic Ca²⁺ entry into hippocampal neurons. *Nature* 357:244-246.
- Jin Z, Jin Y, Kumar-Mendu S, Degerman E, Groop L, Birnir B (2011) Insulin reduces neuronal excitability by turning on GABA(A) channels that generate tonic current. *PLoS One* 6:e16188.

- Johnston D, Hoffman DA, Colbert CM, Magee JC (1999) Regulation of back-propagating action potentials in hippocampal neurons. *Curr Opin Neurobiol* 9:288-292.
- Kaila K, Lamsa K, Smirnov S, Taira T, Voipio J (1997) Long-lasting GABA-mediated depolarization evoked by high-frequency stimulation in pyramidal neurons of rat hippocampal slice is attributable to a network-driven, bicarbonate-dependent K⁺ transient. *J Neurosci* 17:7662-7672.
- Kamondi A, Acsady L, Buzsaki G (1998) Dendritic spikes are enhanced by cooperative network activity in the intact hippocampus. *J Neurosci* 18:3919-3928.
- Kapfer C, Glickfeld LL, Atallah BV, Scanziani M (2007) Supralinear increase of recurrent inhibition during sparse activity in the somatosensory cortex. *Nat Neurosci* 10:743-753.
- Keros S, Hablitz JJ (2005) Subtype-specific GABA transporter antagonists synergistically modulate phasic and tonic GABA conductances in rat neocortex. *J Neurophysiol* 94:2073-2085.
- Khirug S, Yamada J, Afzalov R, Voipio J, Khiroug L, Kaila K (2008) GABAergic depolarization of the axon initial segment in cortical principal neurons is caused by the Na-K-2Cl cotransporter NKCC1. *J Neurosci* 28:4635-4639.
- Kim HG, Connors BW (1993) Apical dendrites of the neocortex: correlation between sodium- and calcium-dependent spiking and pyramidal cell morphology. *J Neurosci* 13:5301-5311.
- Kim S, Guzman SJ, Hu H, Jonas P (2012) Active dendrites support efficient initiation of dendritic spikes in hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Nat Neurosci*.
- Koch C (1999) *Biophysics of Computation*. New York: Oxford University Press.
- Koch C, Poggio T, Torre V (1983) Nonlinear interactions in a dendritic tree: localization, timing, and role in information processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:2799-2802.
- Kole MH, Letzkus JJ, Stuart GJ (2007) Axon initial segment Kv1 channels control axonal action potential waveform and synaptic efficacy. *Neuron* 55:633-647.
- Kole MH, Ilshner SU, Kampa BM, Williams SR, Ruben PC, Stuart GJ (2008) Action potential generation requires a high sodium channel density in the axon initial segment. *Nat Neurosci* 11:178-186.
- Krueppel R, Remy S, Beck H (2011) Dendritic integration in hippocampal dentate granule cells. *Neuron* 71:512-528.
- Larkman AU (1991) Dendritic morphology of pyramidal neurones of the visual cortex of the rat: III. Spine distributions. *J Comp Neurol* 306:332-343.
- Larkum ME, Nevian T, Sandler M, Polsky A, Schiller J (2009) Synaptic integration in tuft dendrites of layer 5 pyramidal neurons: a new unifying principle. *Science* 325:756-760.
- Leutgeb S, Leutgeb JK, Treves A, Moser MB, Moser EI (2004) Distinct ensemble codes in hippocampal areas CA3 and CA1. *Science* 305:1295-1298.
- Leutgeb S, Leutgeb JK, Barnes CA, Moser EI, McNaughton BL, Moser MB (2005) Independent codes for spatial and episodic memory in hippocampal neuronal ensembles. *Science* 309:619-623.
- Li H, Khirug S, Cai C, Ludwig A, Blaesse P, Kolikova J, Afzalov R, Coleman SK, Lauri S, Airaksinen MS, Keinänen K, Khiroug L, Saarna M, Kaila K, Rivera C (2007) KCC2 interacts with the dendritic cytoskeleton to promote spine development. *Neuron* 56:1019-1033.
- Lindquist CE, Birnir B (2006) Graded response to GABA by native extrasynaptic GABA receptors. *J Neurochem* 97:1349-1356.

- Lisman J, Spruston N (2005) Postsynaptic depolarization requirements for LTP and LTD: a critique of spike timing-dependent plasticity. *Nat Neurosci* 8:839-841.
- Lisman JE, Grace AA (2005) The hippocampal-VTA loop: controlling the entry of information into long-term memory. *Neuron* 46:703-713.
- Llinas R, Sugimori M (1980) Electrophysiological properties of in vitro Purkinje cell dendrites in mammalian cerebellar slices. *J Physiol* 305:197-213.
- London M, Häusser M (2005) Dendritic computation. *Annu Rev Neurosci* 28:503-532.
- Lorincz A, Nusser Z (2008) Cell-type-dependent molecular composition of the axon initial segment. *J Neurosci* 28:14329-14340.
- Losonczy A, Magee JC (2006) Integrative properties of radial oblique dendrites in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Neuron* 50:291-307.
- Losonczy A, Zemelman BV, Vaziri A, Magee JC (2010) Network mechanisms of theta related neuronal activity in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat Neurosci* 13:967-972.
- Lovett-Barron M, Turi GF, Kaifosh P, Lee PH, Bolze F, Sun XH, Nicoud JF, Zemelman BV, Sternson SM, Losonczy A (2012) Regulation of neuronal input transformations by tunable dendritic inhibition. *Nat Neurosci* 15:423-430.
- Lovick TA (2006) Plasticity of GABAA receptor subunit expression during the oestrous cycle of the rat: implications for premenstrual syndrome in women. *Exp Physiol* 91:655-660.
- Lüscher C, Nicoll RA, Malenka RC, Müller D (2000) Synaptic plasticity and dynamic modulation of the postsynaptic membrane. *Nat Neurosci* 3:545-550.
- Maccaferri G, Roberts JD, Szucs P, Cottingham CA, Somogyi P (2000) Cell surface domain specific postsynaptic currents evoked by identified GABAergic neurones in rat hippocampus in vitro. *J Physiol* 524 Pt 1:91-116.
- Magee JC (2000) Dendritic integration of excitatory synaptic input. *Nat Rev Neurosci* 1:181-190.
- Magee JC, Johnston D (1995) Characterization of single voltage-gated Na⁺ and Ca²⁺ channels in apical dendrites of rat CA1 pyramidal neurons. *J Physiol* 487 (Pt 1):67-90.
- Magee JC, Johnston D (1997) A synaptically controlled, associative signal for Hebbian plasticity in hippocampal neurons. *Science* 275:209-213.
- Maguire JL, Stell BM, Rafizadeh M, Mody I (2005) Ovarian cycle-linked changes in GABA(A) receptors mediating tonic inhibition alter seizure susceptibility and anxiety. *Nat Neurosci* 8:797-804.
- Majewska MD, Harrison NL, Schwartz RD, Barker JL, Paul SM (1986) Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science* 232:1004-1007.
- Makara J (2012) Dendritic spines promote electrical compartmentalization and cooperation of excitatory synaptic inputs. In: Janelia Farm Conference. *Dendrites: Substrates for Information Processing*, p 69.
- Maletic-Savatic M, Lenn NJ, Trimmer JS (1995) Differential spatiotemporal expression of K⁺ channel polypeptides in rat hippocampal neurons developing in situ and in vitro. *J Neurosci* 15:3840-3851.
- Mann EO, Paulsen O (2007) Role of GABAergic inhibition in hippocampal network oscillations. *Trends Neurosci* 30:343-349.
- Martin LJ, Bonin RP, Orser BA (2009) The physiological properties and therapeutic potential of alpha5-GABAA receptors. *Biochem Soc Trans* 37:1334-1337.

- Martin LJ, Zurek AA, MacDonald JF, Roder JC, Jackson MF, Orser BA (2010) Alpha5GABAA receptor activity sets the threshold for long-term potentiation and constrains hippocampus-dependent memory. *J Neurosci* 30:5269-5282.
- Martina M, Vida I, Jonas P (2000) Distal initiation and active propagation of action potentials in interneuron dendrites. *Science* 287:295-300.
- Matsuzaki M, Honkura N, Ellis-Davies GC, Kasai H (2004) Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* 429:761-766.
- McCartney MR, Deeb TZ, Henderson TN, Hales TG (2007) Tonicly active GABAA receptors in hippocampal pyramidal neurons exhibit constitutive GABA-independent gating. *Mol Pharmacol* 71:539-548.
- Meeks JP, Mennerick S (2007) Action potential initiation and propagation in CA3 pyramidal axons. *J Neurophysiol* 97:3460-3472.
- Megias M, Emri Z, Freund TF, Gulyas AI (2001) Total number and distribution of inhibitory and excitatory synapses on hippocampal CA1 pyramidal cells. *Neuroscience* 102:527-540.
- Miles R, Toth K, Gulyas AI, Hajos N, Freund TF (1996) Differences between somatic and dendritic inhibition in the hippocampus. *Neuron* 16:815-823.
- Mills LR, Niesen CE, So AP, Carlen PL, Spigelman I, Jones OT (1994) N-type Ca²⁺ channels are located on somata, dendrites, and a subpopulation of dendritic spines on live hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci* 14:6815-6824.
- Milojkovic BA, Radojicic MS, Antic SD (2005a) A strict correlation between dendritic and somatic plateau depolarizations in the rat prefrontal cortex pyramidal neurons. *J Neurosci* 25:3940-3951.
- Milojkovic BA, Wuskell JP, Loew LM, Antic SD (2005b) Initiation of sodium spikelets in basal dendrites of neocortical pyramidal neurons. *J Membr Biol* 208:155-169.
- Mitchell SJ, Silver RA (2003) Shunting inhibition modulates neuronal gain during synaptic excitation. *Neuron* 38:433-445.
- Miyashita T, Kubo Y (1997) Localization and developmental changes of the expression of two inward rectifying K(+) channel proteins in the rat brain. *Brain Res* 750:251-263.
- Mody I, Pearce RA (2004) Diversity of inhibitory neurotransmission through GABA(A) receptors. *Trends Neurosci* 27:569-575.
- Mody I, Glykys J, Wei W (2007) A new meaning for "Gin & Tonic": tonic inhibition as the target for ethanol action in the brain. *Alcohol* 41:145-153.
- Mortensen M, Smart TG (2006) Extrasynaptic alphabeta subunit GABAA receptors on rat hippocampal pyramidal neurons. *J Physiol* 577:841-856.
- Moser EI, Kropff E, Moser MB (2008) Place cells, grid cells, and the brain's spatial representation system. *Annu Rev Neurosci* 31:69-89.
- Moss SJ, Smart TG (2001) Constructing inhibitory synapses. *Nat Rev Neurosci* 2:240-250.
- Mozrzymas JW, Zarnowska ED, Pytel M, Mercik K (2003) Modulation of GABA(A) receptors by hydrogen ions reveals synaptic GABA transient and a crucial role of the desensitization process. *J Neurosci* 23:7981-7992.
- Nabekura J, Ueno T, Okabe A, Furuta A, Iwaki T, Shimizu-Okabe C, Fukuda A, Akaike N (2002) Reduction of KCC2 expression and GABAA receptor-mediated excitation after in vivo axonal injury. *J Neurosci* 22:4412-4417.
- Nevian T, Larkum ME, Polsky A, Schiller J (2007) Properties of basal dendrites of layer 5 pyramidal neurons: a direct patch-clamp recording study. *Nat Neurosci* 10:206-214.
- Nimchinsky EA, Sabatini BL, Svoboda K (2002) Structure and function of dendritic spines. *Annu Rev Physiol* 64:313-353.

- No RL, Condouris GA (1959) Decremental Conduction In Peripheral Nerve. Integration Of Stimuli In The Neuron. *Proc Natl Acad Sci U S A* 45:592-617.
- Nusser Z (2009) Variability in the subcellular distribution of ion channels increases neuronal diversity. *Trends Neurosci* 32:267-274.
- Nusser Z, Somogyi P (1997) Compartmentalised distribution of GABAA and glutamate receptors in relation to transmitter release sites on the surface of cerebellar neurones. *Prog Brain Res* 114:109-127.
- Nusser Z, Mody I (2002) Selective modulation of tonic and phasic inhibitions in dentate gyrus granule cells. *J Neurophysiol* 87:2624-2628.
- Nusser Z, Sieghart W, Somogyi P (1998) Segregation of different GABAA receptors to synaptic and extrasynaptic membranes of cerebellar granule cells. *J Neurosci* 18:1693-1703.
- Nyitrai G, Kekesi KA, Juhasz G (2006) Extracellular level of GABA and Glu: in vivo microdialysis-HPLC measurements. *Curr Top Med Chem* 6:935-940.
- Olah S, Fule M, Komlosi G, Varga C, Baldi R, Barzo P, Tamas G (2009) Regulation of cortical microcircuits by unitary GABA-mediated volume transmission. *Nature* 461:1278-1281.
- Overstreet Wadiche L, Bromberg DA, Bensen AL, Westbrook GL (2005) GABAergic signaling to newborn neurons in dentate gyrus. *J Neurophysiol* 94:4528-4532.
- Palmer LM, Stuart GJ (2006) Site of action potential initiation in layer 5 pyramidal neurons. *J Neurosci* 26:1854-1863.
- Papp E, Rivera C, Kaila K, Freund TF (2008) Relationship between neuronal vulnerability and potassium-chloride cotransporter 2 immunoreactivity in hippocampus following transient forebrain ischemia. *Neuroscience* 154:677-689.
- Pavlov I, Savtchenko LP, Kullmann DM, Semyanov A, Walker MC (2009) Outwardly rectifying tonically active GABAA receptors in pyramidal cells modulate neuronal offset, not gain. *J Neurosci* 29:15341-15350.
- Payne JA, Rivera C, Voipio J, Kaila K (2003) Cation-chloride co-transporters in neuronal communication, development and trauma. *Trends Neurosci* 26:199-206.
- Peng Z, Huang CS, Stell BM, Mody I, Houser CR (2004) Altered expression of the delta subunit of the GABAA receptor in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 24:8629-8639.
- Perkins KL, Wong RK (1997) The depolarizing GABA response. *Can J Physiol Pharmacol* 75:516-519.
- Plotkin MD, Snyder EY, Hebert SC, Delpire E (1997) Expression of the Na-K-2Cl cotransporter is developmentally regulated in postnatal rat brains: a possible mechanism underlying GABA's excitatory role in immature brain. *J Neurobiol* 33:781-795.
- Poirazi P, Brannon T, Mel BW (2003a) Arithmetic of subthreshold synaptic summation in a model CA1 pyramidal cell. *Neuron* 37:977-987.
- Poirazi P, Brannon T, Mel BW (2003b) Pyramidal neuron as two-layer neural network. *Neuron* 37:989-999.
- Polsky A, Mel BW, Schiller J (2004) Computational subunits in thin dendrites of pyramidal cells. *Nat Neurosci* 7:621-627.
- Pond BB, Berglund K, Kuner T, Feng G, Augustine GJ, Schwartz-Bloom RD (2006) The chloride transporter Na(+)-K(+)-Cl- cotransporter isoform-1 contributes to intracellular chloride increases after in vitro ischemia. *J Neurosci* 26:1396-1406.
- Pouille F, Scanziani M (2001) Enforcement of temporal fidelity in pyramidal cells by somatic feed-forward inhibition. *Science* 293:1159-1163.

- Prenosil GA, Schneider Gasser EM, Rudolph U, Keist R, Fritschy JM, Vogt KE (2006) Specific subtypes of GABAA receptors mediate phasic and tonic forms of inhibition in hippocampal pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 96:846-857.
- Price CJ, Scott R, Rusakov DA, Capogna M (2008) GABA(B) receptor modulation of feedforward inhibition through hippocampal neurogliaform cells. *J Neurosci* 28:6974-6982.
- Prut L, Prenosil G, Willadt S, Vogt K, Fritschy JM, Crestani F (2010) A reduction in hippocampal GABAA receptor alpha5 subunits disrupts the memory for location of objects in mice. *Genes Brain Behav* 9:478-488.
- Rall W (1959) Dendritic current distribution and whole neuron properties. *NaMedResInstResRep NM105.01.02:479-525*.
- Rall W (1964) Neuronal Theory and Modelling. In, pp 73-97. Stanford, CA: Stanford University Press.
- Rall W (1977) Cellular Biology of Neurons, Section1. In: Handbook of Physiology. The Nervous system.:39-79.
- Rivera C, Voipio J, Payne JA, Ruusuvuori E, Lahtinen H, Lamsa K, Pirvola U, Saarma M, Kaila K (1999) The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* 397:251-255.
- Rivera C, Voipio J, Thomas-Crusells J, Li H, Emri Z, Sipila S, Payne JA, Minichiello L, Saarma M, Kaila K (2004) Mechanism of activity-dependent downregulation of the neuron-specific K-Cl cotransporter KCC2. *J Neurosci* 24:4683-4691.
- Romero MF, Henry D, Nelson S, Harte PJ, Dillon AK, Sciortino CM (2000) Cloning and characterization of a Na⁺-driven anion exchanger (NDAE1). A new bicarbonate transporter. *J Biol Chem* 275:24552-24559.
- Ruusuvuori E, Li H, Huttu K, Palva JM, Smirnov S, Rivera C, Kaila K, Voipio J (2004) Carbonic anhydrase isoform VII acts as a molecular switch in the development of synchronous gamma-frequency firing of hippocampal CA1 pyramidal cells. *J Neurosci* 24:2699-2707.
- Sauer JF, Struber M, Bartos M (2012) Interneurons provide circuit-specific depolarization and hyperpolarization. *J Neurosci* 32:4224-4229.
- Schiller J, Schiller Y, Stuart G, Sakmann B (1997) Calcium action potentials restricted to distal apical dendrites of rat neocortical pyramidal neurons. *J Physiol* 505 (Pt 3):605-616.
- Schiller J, Major G, Koester HJ, Schiller Y (2000) NMDA spikes in basal dendrites of cortical pyramidal neurons. *Nature* 404:285-289.
- Schmidt-Hieber C, Jonas P, Bischofberger J (2008) Action potential initiation and propagation in hippocampal mossy fibre axons. *J Physiol* 586:1849-1857.
- Scimemi A, Semyanov A, Sperk G, Kullmann DM, Walker MC (2005) Multiple and plastic receptors mediate tonic GABAA receptor currents in the hippocampus. *J Neurosci* 25:10016-10024.
- Semyanov A, Walker MC, Kullmann DM (2003) GABA uptake regulates cortical excitability via cell type-specific tonic inhibition. *Nat Neurosci* 6:484-490.
- Semyanov A, Walker MC, Kullmann DM, Silver RA (2004) Tonically active GABA A receptors: modulating gain and maintaining the tone. *Trends Neurosci* 27:262-269.
- Shu Y, Duque A, Yu Y, Haider B, McCormick DA (2007) Properties of action-potential initiation in neocortical pyramidal cells: evidence from whole cell axon recordings. *J Neurophysiol* 97:746-760.
- Silver RA (2010) Neuronal arithmetic. *Nat Rev Neurosci* 11:474-489.

- Sjostrom PJ, Rancz EA, Roth A, Hausser M (2008) Dendritic excitability and synaptic plasticity. *Physiol Rev* 88:769-840.
- Sloviter RS, Ali-Akbarian L, Horvath KD, Menkens KA (2001) Substance P receptor expression by inhibitory interneurons of the rat hippocampus: enhanced detection using improved immunocytochemical methods for the preservation and colocalization of GABA and other neuronal markers. *J Comp Neurol* 430:283-305.
- Smirnov S, Paalasmaa P, Uusisaari M, Voipio J, Kaila K (1999) Pharmacological isolation of the synaptic and nonsynaptic components of the GABA-mediated biphasic response in rat CA1 hippocampal pyramidal cells. *J Neurosci* 19:9252-9260.
- Spruston N, Jaffe DB, Johnston D (1994) Dendritic attenuation of synaptic potentials and currents: the role of passive membrane properties. *Trends Neurosci* 17:161-166.
- Spruston N, Schiller Y, Stuart G, Sakmann B (1995) Activity-dependent action potential invasion and calcium influx into hippocampal CA1 dendrites. *Science* 268:297-300.
- Staley KJ, Mody I (1992) Shunting of excitatory input to dentate gyrus granule cells by a depolarizing GABA_A receptor-mediated postsynaptic conductance. *J Neurophysiol* 68:197-212.
- Stell BM, Mody I (2002) Receptors with different affinities mediate phasic and tonic GABA(A) conductances in hippocampal neurons. *J Neurosci* 22:RC223.
- Stell BM, Brickley SG, Tang CY, Farrant M, Mody I (2003) Neuroactive steroids reduce neuronal excitability by selectively enhancing tonic inhibition mediated by delta subunit-containing GABA_A receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:14439-14444.
- Stuart G, Spruston N, Sakmann B, Hausser M (1997) Action potential initiation and backpropagation in neurons of the mammalian CNS. *Trends Neurosci* 20:125-131.
- Stuart GJ, Sakmann B (1994) Active propagation of somatic action potentials into neocortical pyramidal cell dendrites. *Nature* 367:69-72.
- Szabadics J, Tamas G, Soltesz I (2007) Different transmitter transients underlie presynaptic cell type specificity of GABA_A,slow and GABA_A,fast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:14831-14836.
- Szabadics J, Varga C, Molnar G, Olah S, Barzo P, Tamas G (2006) Excitatory effect of GABAergic axo-axonic cells in cortical microcircuits. *Science* 311:233-235.
- Takahashi H, Magee JC (2009) Pathway interactions and synaptic plasticity in the dendritic tuft regions of CA1 pyramidal neurons. *Neuron* 62:102-111.
- Tamas G, Lorincz A, Simon A, Szabadics J (2003) Identified sources and targets of slow inhibition in the neocortex. *Science* 299:1902-1905.
- 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.
- Vardya I, Drasbek KR, Dosa Z, Jensen K (2008) Cell type-specific GABA_A receptor-mediated tonic inhibition in mouse neocortex. *J Neurophysiol* 100:526-532.
- Vida I, Bartos M, Jonas P (2006) Shunting inhibition improves robustness of gamma oscillations in hippocampal interneuron networks by homogenizing firing rates. *Neuron* 49:107-117.
- Wake H, Watanabe M, Moorhouse AJ, Kanematsu T, Horibe S, Matsukawa N, Asai K, Ojika K, Hirata M, Nabekura J (2007) Early changes in KCC2 phosphorylation in response to neuronal stress result in functional downregulation. *J Neurosci* 27:1642-1650.

- Wang C, Shimizu-Okabe C, Watanabe K, Okabe A, Matsuzaki H, Ogawa T, Mori N, Fukuda A, Sato K (2002) Developmental changes in KCC1, KCC2, and NKCC1 mRNA expressions in the rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 139:59-66.
- Wardle RA, Poo MM (2003) Brain-derived neurotrophic factor modulation of GABAergic synapses by postsynaptic regulation of chloride transport. *J Neurosci* 23:8722-8732.
- Waters J, Schaefer A, Sakmann B (2005) Backpropagating action potentials in neurones: measurement, mechanisms and potential functions. *Prog Biophys Mol Biol* 87:145-170.
- Williams JR, Sharp JW, Kumari VG, Wilson M, Payne JA (1999) The neuron-specific K-Cl cotransporter, KCC2. Antibody development and initial characterization of the protein. *J Biol Chem* 274:12656-12664.
- Witter MP, Amaral DG (2004) Hippocampal formation. In: *The Rat Nervous System*, Tird Edition, G. Paxinos, ed. San Diego: CA: Academic Press.
- Wohlfarth KM, Bianchi MT, Macdonald RL (2002) Enhanced neurosteroid potentiation of ternary GABA(A) receptors containing the delta subunit. *J Neurosci* 22:1541-1549.
- Woodruff A, Xu Q, Anderson SA, Yuste R (2009) Depolarizing effect of neocortical chandelier neurons. *Front Neural Circuits* 3:15.
- Yamada J, Furukawa T, Ueno S, Yamamoto S, Fukuda A (2007) Molecular basis for the GABAA receptor-mediated tonic inhibition in rat somatosensory cortex. *Cereb Cortex* 17:1782-1787.
- Yang G, Pan F, Gan WB (2009) Stably maintained dendritic spines are associated with lifelong memories. *Nature* 462:920-924.
- Yuste R, Bonhoeffer T (2001) Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 24:1071-1089.
- Zhang N, Wei W, Mody I, Houser CR (2007) Altered localization of GABA(A) receptor subunits on dentate granule cell dendrites influences tonic and phasic inhibition in a mouse model of epilepsy. *J Neurosci* 27:7520-7531.
- Zhou WL, Yan P, Wuskell JP, Loew LM, Antic SD (2008) Dynamics of action potential backpropagation in basal dendrites of prefrontal cortical pyramidal neurons. *Eur J Neurosci* 27:923-936.
- Zhu JJ (2000) Maturation of layer 5 neocortical pyramidal neurons: amplifying salient layer 1 and layer 4 inputs by Ca²⁺ action potentials in adult rat tuft dendrites. *J Physiol* 526 Pt 3:571-587.

II. Cikk