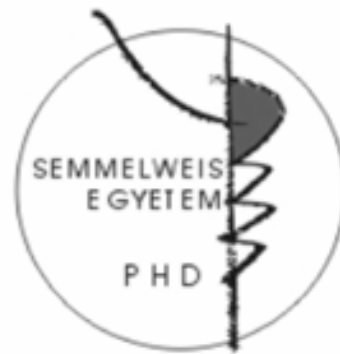


Serkentés és gátlás a talamuszban

Doktori tézisek

Rovó Zita

Semmelweis Egyetem
Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Acsády László Ph.D, tudományos tanácsadó, az MTA Doktora

Hivatalos bírálók: Dr. Puskár Zita, egyetemi docens, Ph.D

Dr. Kisvárdai Zoltán, egyetemi docens, Ph.D

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Halász Béla, egyetemi tanár, Ph.D

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Karmos György, egyetemi tanár, Ph.D

Dr. Dobolyi Árpád, egyetemi docens, Ph.D

Budapest
2014

1. BEVEZETÉS

A talamokortikális információáramlás esszenciális szereppel bír a kortikális funkciók megőrzésében: ezért a talamusz működésének megértése elengedhetetlen az agykérgi mechanizmusok megértéséhez. PhD munkám során a talamusz alapvető szerveződési elvét, illetve működési mechanizmusát vettem górcső alá két modell állaton. A „driver teória” alapjául szolgáló serkentő óriásterminálisok eloszlását a makákók talamuszában térképeztem fel, míg a szinaptikus gátlás szerepét a talamokortikális ritmusokban egy transzgen egértörzsön vizsgáltam.

1.1. A talamusz szerveződése

A talamusz a legfőbb reléállomás az agyban, kapuként funkcionál a külvilág és az agy belső környezete között. Szinte minden a külvilágból tudatosult információ a talamuszon keresztül jutott a tudatunkra. A talamusz viszonylag kis méretű struktúra az agy közepén. Területe számos sejtsoporra vagy „magra” felosztható, attól függően, hogy milyen eredetű jel továbbítását végzik a relésejtjei (vizuális, auditoros, szomatoszenzoros, kisagyi, stb.) a megfelelő kérgi régiók felé. A talamusz működése szorosan összefügg a kéreg legnagyobb hánydát kitevő neokortex működésével.

1.2. A driver teória

Sherman és Guillery nevéhez köthető a driver teória megalkotása, ami elsősorban a talamokortikális relék működésének morfológiai és funkcionális alapjait írja le. Elméletük szerint az idegsejtek aktivitását nem lehet egyértelműen kiszámolni a szinapszisaiknak száma alapján. Hanem az idegsejtek aktivitását specializált nagy méretű serkentő axonvégzódások határozzák meg, melyek többszörös szinaptikus kapcsolatot alakítanak ki a talamokortikális relésejtek proximális dendritjeivel és hűséges információ-továbbítást biztosítanak.

Sherman and Guillery a talamuszt nagyjából fele-fele arányban két részre osztotta attól függően, hogy honnan érkezik az adott régióba driver bemenet. A elsőrendű talamikus relék szubkortikális központok felől kapják a driver bemeneteiket (retina, gerincvelő, kisagy), és ennek megfelelően vizuális, szomatoszenzoros, motoros információt közvetítenek, míg a magasabbrendű talamikus relék kérgi ötödik rétegi piramisisejtek felől kapják a driver bemenetüket, és a talamuszon át történő kortiko-kortikális információ-közvetítésben vesznek részt. Az eredeti elképzelés szerint a kérgi és kéreg alatti driverek szinaptikus tulajdonságai hasonlóak, de driverek által közvetített információ-tartalom a driverek eredetétől függ. Végül, az sem világos, hogy a serkentő óriásterminálisok homogen populációt alkotnak-e a talamuszban vagy esetleg magonként változik a megjelenésük.

A kortikális és szubkortikális driverek pontos térbeli eloszlása a talamuszban nem ismert. Nem tudjuk, hogy a kortikális és szubkortikális driverek egymástól élesen elkülönülve érkeznek a célterületükre, vagy keverednek egymással. Eddig még nem vizsgálták, hogy vajon minden talamikus terület rendelkezik-e serkentő óriásterminálissal.

Habár pályakövető vizsgálatok nagyban hozzájárultak ahhoz, hogy a talamokortikális kör működését megértsük, ezzel a módszerrel lehetetlen egyszerre egy adott régió összes rostját megjelölni. Így mi két jól karakterizált neurokémiai markert, nevezetesen a

vezikuláris glutamát transzporter 1-es és 2-es típusát használtuk ahhoz, hogy megjelenítsük a thalamus kortikális és szubkortikális glutamáterg végződéseit.

1.3. Szinaptikus vs. extraszinaptikus gátló receptorok hozzájárulása a fázisos gátláshoz a talamuszban

A reciprok retikulotalamikus összeköttetés szerepének és összetett szinaptikus elrendezésének működési mechanizmusa mindmáig forrón kutatott terület. Számos megválaszolatlan kérdés vár még tisztázásra. PhD munkám második felében az nRT-ből érkező, szinaptikus GABA_A receptor független, mégis fázisos eseményhez köthető gátlási típust vettem górcső alá. Továbbá azt vizsgáltuk, hogy a fázisos gátlás során aktiválódó extraszinaptikus GABA_A receptoroknak mekkora szerepük van a talamokortikális oszcillációk hangolásában.

Az egészséges agyban viselkedési állapottól függően oszcillációk irányítják az idegsejthálózatok aktivitását térben és időben. A kortikális, hippokampális és talamikus GABAerg sejtek szerepét a különféle ritmusok időzítésében nagy mennyiségű adat támasztja alá. Ezeken az agyterületeken alkalmazott farmakológiai GABA_A receptor blokkolás felborítja a normális oszcillációt és aberráns epilepszia-szerű állapotot idéz elő.

A GABA_A receptorok pentamer struktúrája a különféle α , β , γ , δ , ϵ , θ , π és ρ alegységek felhasználásával elméletileg korlátlan kombinációban fordulhat elő. Az emlős idegrendszerben azonban csak néhány tucat variációt írtak le, melyek alapvetően két elkülönülő típusba rendeződnek: szinaptikus és extraszinaptikus receptorok. A receptorok szinaptikus klaszterizációjához a $\gamma 2$ alegység nélkülözhetetlen. A $\gamma 2$ alegység tartalmú receptorok gyors kinetikával és a GABA iránti alacsony szenzitivitással, valamint gyors deszenzitizációval jellemezhetőek. Mindezen tulajdonság a gyors gátló posztzinaptikus áramok vezetésének kedvez, amilyen tipikusan a fázisos gátlás. A γ helyett δ alegységet kifejező GABA_A receptorok az extraszinaptikus plazmamembránban dúsulnak fel, a GABA iránt nagyobb szenzitivitással rendelkeznek, és az extraszinaptikus térben állandóan jelen levő GABA által aktiválódnak. Ezek az extraszinaptikus receptorok felelősek elsősorban a lassú, tónusos klorid áramért.

Egyre több bizonyíték van arra vonatkozólag, hogy a GABA_A receptorok által közvetített gátlási formáknak egy harmadik típusa is van. Ez a spillover jelensége. Ilyenkor a GABA a szinaptikus részből kidiffundálva nem csak a szinaptikus, de a szinapszis körüli extraszinaptikus receptorokat is aktiválja, mely egy lassú kinetikával jellemezhető fázisos gátlást eredményez. Ilyen nem szinaptikus, fázisos gátlással rendelkeznek a kérgeben, hippokampuszban, illetve amygdalában található neurogliaform sejtek, de a talamuszban is leírták már a jelenséget. Még nem ismert, hogy ennek a három fajta gátlási formának mi a szerepe a hálózatos oszcillációk kialakításában.

Elméletileg, kinetikáját tekintve a $\gamma 2$ alegység tartalmú GABA_A receptorok a legalkalmasabbak az oszcillációk kontrollálására, habár a lassú GABA_A áramoknak, sőt a tónusos gátlásnak is elengedhetetlen szerepe van a normális ritmusos aktivitás fenntartásában. A klasszikus farmakológiai és génkiütéses módszerek nem alkalmasak a szinaptikus GABA_A receptorok szerepének tisztázására a beavatkozások alegység és régió specifikuságának hiánya miatt. Ebben a tanulmányban mi lokálisan, vírus segítségével ütöttük ki a GABA_A receptorok $\gamma 2$ alegységét a talamuszban azért, hogy feltárjuk a szinaptikus vs. extraszinaptikus gátló receptorok szerepét a fázisos gátlásban. A talamokortikális sejtek

a GABA_A receptor alegységekből csupán néhányat variációt fejeznek ki a membránjukon. A szinaptikus receptorok elsősorban $\alpha 1$, $\beta 2/3$, $\gamma 2$ kombinációjából állnak, míg a nem szinaptikus receptorok $\alpha 4$, $\beta 2/3$ és δ alegységet tartalmaznak. Ennek megfelelően a $\gamma 2$ alegység régióspecifikus kiütésével meg tudtuk határozni a szinaptikus vs. extraszinaptikus gátlás hozzájárulását a talamokortikális oszcillációkhoz. A talamokortikális sejtek legfőbb gátló bemenetét szolgáltató nucleus reticuláris thalami sejtjei alvás során burst módban, ébrenlét során tónusos módban tüzelnek. Ez a jelenség lehetővé tette számunkra, hogy megvizsgáljuk, milyen posztszinaptikus receptor-populációkat érint a két különféle tüzelési mód.

2. CÉLKITŰZÉSEK

1. A főemlős talamusz serkentő óriásbemeneteinek fénymikroszkópos feltérképezése.
2. A kortikális és szubkortikális eredetű driver bemenetek konvergenciájának, szegregációjának tanulmányozása.
3. A talamusz különböző régióiból származó RL-típusú terminálisok elektronmikroszkópos vizsgálata.
4. A szinaptikus GABA_A receptor γ 2-es alegységének vírusmediált kiütése a γ 2 floxolt egerek talamuszából.
5. A GABA_A receptor γ 2 alegység eliminálódásának fénymikroszkópos módszerekkel történő igazolása.
6. A GABA_A receptor γ 2 alegység eliminálódásának *in vitro* elektrofiziológiai módszerrel történő igazolása akut egér agyszeleteken.
7. A szinaptikus vs. extraszinaptikus gátlás hozzájárulásának meghatározása a talamokortikális oszcillációkban.
8. A posztzinaptikus gátló receptor-populációk preszinaptikus tüzelési mód specifikus aktiválódásának tanulmányozása.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Minden majom és egér kísérletet az MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézetének és a Lausanne-i egyetem etikai bizottsága által kiállított előírásának (22.1/77/001/2010) megfelelően végeztünk. A majom kísérletekhez összesen hét felnőtt nőstény makákót (*Macaca mulatta*) áldoztunk fel.

3.1. A majom kísérletek módszerei

Az anatómiai vizsgálatokat az általános fény- és elektronmikroszkópos protokollokat követve végeztük. Fixáló oldattal történő perfúzió után az agyakat eltávolítottuk, és a talamuszt 50 μm vastag koronális metszetekre vágtuk vibratom segítségével. A megfelelő előkészítések után (krioprotektív kezelés, natrium-borohidrides mosás, aspecifikus kötőhelyek blokkolása) az alábbi primer antitesteket használtuk az immunfestésekhez mind fény-, mind elektronmikroszkópos szinten: tengerimalac-anti-vGLUT1 (1:5000–1:10000; Millipore Bioscience Research Reagents), nyúl-anti-vGLUT1 (1:10,000; Synaptic Systems), egér-anti-vGLUT2 (1:3000–1:4000; Millipore Bioscience Research Reagents) és nyúl-anti-vGLUT2 (1:3000–1:4000; Synaptic Systems), monoklonális egér-anti-calbindin (1:2000, Swant), nyúl-anti-calbindin (1:2000, K. G. Baimbridge ajándéka, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada).

Másodlagos ellenanyagként fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz a biotinilált-kecske-anti-nyúl (BGAR, Vector Laboratories), biotinilált-kecske-anti-tengerimalac (BGAGp, Vector Laboratories), biotinilált-kecske-anti-egér (BGAM, Vector Laboratories) használtunk (1:300, 2 óra), majd avidin-biotinilált tormaperoxidáz komplexszel (ABC, 1:300, 2 óra, Vector Laboratories) kezeltük, végül nikkel-intenzifikált 3,3'-diaminobenzidin (DABNi, fekete csapadék) jelenítettük meg az antitesteket. A metszeteket ezt követően dehidráltuk, posztfixáltuk és Durcupánba (ACM; Fluka) ágyaztuk.

Három majom esetében pályakövető anyag injektálása történt a motoros kéregbe, illetve a capsula internába. A BDA-val jelölt oldal rostjainak megjelenítése ABC, majd DABNi használatával történt. Kettős immuncitokémiai reakciót alkalmaztunk a vGLUT2, illetve a jelölt rostok együttes előfordulásának kimutatására. A pályakövető anyag előhívását követően a szeleteket nyúl-anti-vGLUT2 antiszérummal, majd BGAR másodlagos ellenanyaggal kezeltük, végül ABC-DAB reakcióval hívtuk elő, ami barna csapadékot eredményez.

Kettős immunfestést alkalmaztunk az együttesen előforduló vGLUT1 és vGLUT2 terminálisok fénymikroszkópos térképezésére. Ekkor a vGLUT1-nél BGAGp-t, a vGLUT2-nél biotinilált anti-nyúl ImmPRESS antitestet (1:2 TBS-ben, 2 óra, Vector Laboratories) használtunk szekunder antitestként és DABNi reakcióval hívtuk elő, hogy fénymikroszkópos vizsgálatokkal elkülöníthessük a kétféle idegvégződést. Az ezt követő posztfixálás során 7%-os cukor oldatban hígított OsO_4 oldatot használtunk, hogy a barna és fekete csapadék színbeli különbségét megőrizzük, míg a többi lépés megegyezett a korábban leírtakkal.

Arany jelölés ezüst intenzifikálással fénymikroszkópos és elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz is alkalmas. Ekkor a nagyobb töménységben alkalmazott primer antitestet (vGLUT1 1:5000) blokkolás, majd arany-konjugált szekunder követett. Ezután 1%-os glutáraldehid kezelés jött, hogy az arany szemcséket rögzítsük, majd az ezüsthíváshoz használt Aurion R-GENT LM intenzifikáló kit saját hívóoldatával jelenítettük meg az im-

munjelet. Ezt követően a vGLUT2-t ABC-DAB reakcióval hívtuk elő. A beágyazás előtti immunarany és DAB reakcióval láthatóvá tett terminálisok térképezése után Durcupanba ágyaztuk a kiválasztott területeket, majd ultramikrotommal 60 nm-es sorozatmetszetet készítettünk. Minden második griden beágyazás utáni GABA immunreakciót végeztünk (nyúl-anti-GABA, 1:2000, 1:6000 TBS-ben, Somogyi Péter ajándéka, University of Oxford, UK).

A kettős immunfluoreszcens metszetek tanulmányozásához a tracer és a két vGLUT együttes fluoreszcens kimutatására a metszeteket anti-nyúl-vGLUT1 (1:5000, 0,5% Triton X-100-at tartalmazó TBS-ben) és anti-egér-vGLUT2 (1:3000) primer ellenanyagokkal kezeltük, amit CY3-konjugált számar-anti-nyúl (1:500, Jackson ImmunoResearch), Cy5-konjugált számar-anti-egér (1:500, Jackson Immunoresearch) és streptavidin-konjugált Alexa Fluor 488 (1:2000, Invitrogen) követett.

A félvékony metszetek fluoreszcens megjelenítéséhez a metszeteket OsO_4 kezelés nélkül dehidráltuk 1%-os. A megfelelőnek ítélt területekről az elektronmikroszkópos technikához hasonlóan átágyazást végeztünk. A blokkból 500 nm vastagságú, ún. félvékony meszeteket készítettünk ultramikrotommal, melyeket tárgylemezen levő vízcseppekbe szedtünk és egy éjszakán át szárítottuk, majd nátrium-etanoláttal kimarattuk. A tárgylemezre szárított metszeteket ezt követően nedves kamrába tettük. Az immunreakciókat nedves kamrában végeztük a fentiekkel megegyező módon (vGLUT2R – A488-DAR, zöld; vGLUT1Gp – Cy3-DAGp, piros; 1:300).

A talamusz maghatárainak, körvonalának megrajzolása camera lucida segítségével történt. A talamusz ventrális és kaudomediális határát a talamuszra jellemző sűrű vGLUT1 jelölés alapján húztam meg. Az így kapott rajzokat digitalizáltuk. A vGLUT2, illetve a vGLUT1 pozitív területek határainak kijelöléséhez kis nagyítású, nagy felbontású fényképeket készítettem a metszetekről. Ezt követően nagy nagyítású objektívvel (40x, 63X) az erek alapján tájékozódva Adobe Photoshop CS2 szoftver segítségével berajzolható az egyes területek határa. Munkám során a teljes majom talamuszt (500 μm -ononként vett 50 μm -os metszeteken) vGLUT2 és vGLUT1 festődés alapján feltérképeztem a hét majom esetén. Az így kapott térképeket a megfelelő sztereotaxis koordináták alapján összevetettük egymással. A határvonalak helyességét elektronmikroszkópos metszetekkel validáltuk.

A talamusz maghatárainak, körvonalának megrajzolása camera lucida segítségével történt. A talamusz ventrális és kaudomediális határát a talamuszra jellemző sűrű vGLUT1 jelölés alapján húztam meg. Az így kapott rajzokat digitalizáltuk. A vGLUT2, illetve a vGLUT1 pozitív területek határainak kijelöléséhez kis nagyítású, nagy felbontású fényképeket készítettem a metszetekről. Ezt követően nagy nagyítású objektívvel (40x) az erek alapján tájékozódva Adobe Photoshop CS2 szoftver segítségével berajzolható az egyes területek határa. Munkám során a teljes majom talamuszt (500 μm -ononként vett 50 μm -os metszeteken) vGLUT2 és vGLUT1 festődés alapján feltérképeztem a hét majom esetén. Az így kapott térképeket a megfelelő sztereotaxis koordináták alapján összevetettük egymással. A határvonalak helyességét elektronmikroszkópos metszetekkel validáltuk.

Elektronmikroszkópos szinten a terminálisok keresztmetszeti felszíne tűnt a terminális méretére vonatkozó legjobb paraméternek, amit összesen 695 terminális esetén mérünk meg. Ahhoz, hogy a különböző régiókból származó óriás axonterminálisokat összehasonlítsuk a következő kritériumoknak kellett megfelelnie a végződéseknél: többszörös

aktív zóna vagy puncta adherentia jelenléte és minimum négy mitokondrium keresztmetszet. A kritériumainknak megfelelő terminálisok keresztmetszetének felszínét NIH ImageJ szoftver segítségével mértük le.

3.2. Az egér kísérletek módszerei

Vírusinjektáláshoz felnőtt GABAAR γ 277Ilox floxolt egereket használtam mindkét nemből. Kétféle vírust használtam a talamikus bilaterális beadásokkor: AAV2/1-CMV-eGFP-t (titer: 10^{12} GC/ml, Vector Biolabs) és AAV2/1 CMV-Cre-t (titer: 10^{12} GC/ml, Vector Biolabs) fele arányban keverve a AAV2/1-CMV-eGFP vírussal. Az egerek injektálásának folyamata megegyezett az anatómiára és *in vivo* elektrofiziológiára használt egerek műtétével.

A whole-cell patch clamp elvezetésekhez az egereket 1 - 3 héttel (P26-P41) az injektálást követően feláldoztuk. Horizontális ($300\ \mu\text{m}$ vastagságú) szeletekre vágtuk az agyakat, és azokat a szinteket használtuk, mely tartalmazta a VB-t és az nRT-t. A méréseket szobahőmérsékleten végeztük, kivéve a kiváltott IPSC-k mérését, ahol 34°C -on vezetünk el. A kiváltott IPSC-khez a monopoláris stimuláló elektródot az nRT-ba helyeztük. A monofázisos IPSC-t $0,2\ \text{Hz}$ -es és $10\ \text{Hz}$ -es frekvenciával váltottuk ki $250\ \mu\text{A}$ stimuláló intenzitással. A kiváltott burst IPSC-k mérését $-30\ \text{mV}$ tartófeszültségen végeztük, ahol a serkentő és gátló áramokat glutamáterg blokkoló nélkül is el lehetett különíteni. A burst IPSC-eket $30 - 60$ másodpercenként váltottuk ki $250\ \mu\text{A}$ stimuláló intenzitással.

A tónusos GABA áram meghatározásához a drog (gabazine $10\ \mu\text{M}$) bemosódása előtt és alatt egy-egy 20 másodperces szakasz amplitúdó értékeiből hisztogramot készítettünk, amire Gauss-görbét illesztettünk. A sejtre jellemző tónusos áram a két görbe csúcsa közti érték. A spontán IPSC-k analíziséhez MiniAnalysis 6.0 (Synaptosoft) szoftvert használtunk. A kiváltott IPSC-k analíziséhez Clampfit V.10.2 szoftvert használtunk. Az analízishez minimum négy egymást követő választ átlagoltunk, az amplitúdót az alaponallal korrigáltuk. A $10 - 90\%$ rise-time helyett a csúcsig eltelt időt használtuk, mivel a burst IPSC multifázisos áram. A burst IPSC-k lecsengési idejének meghatározásához monoexponenciális görbét illesztettünk.

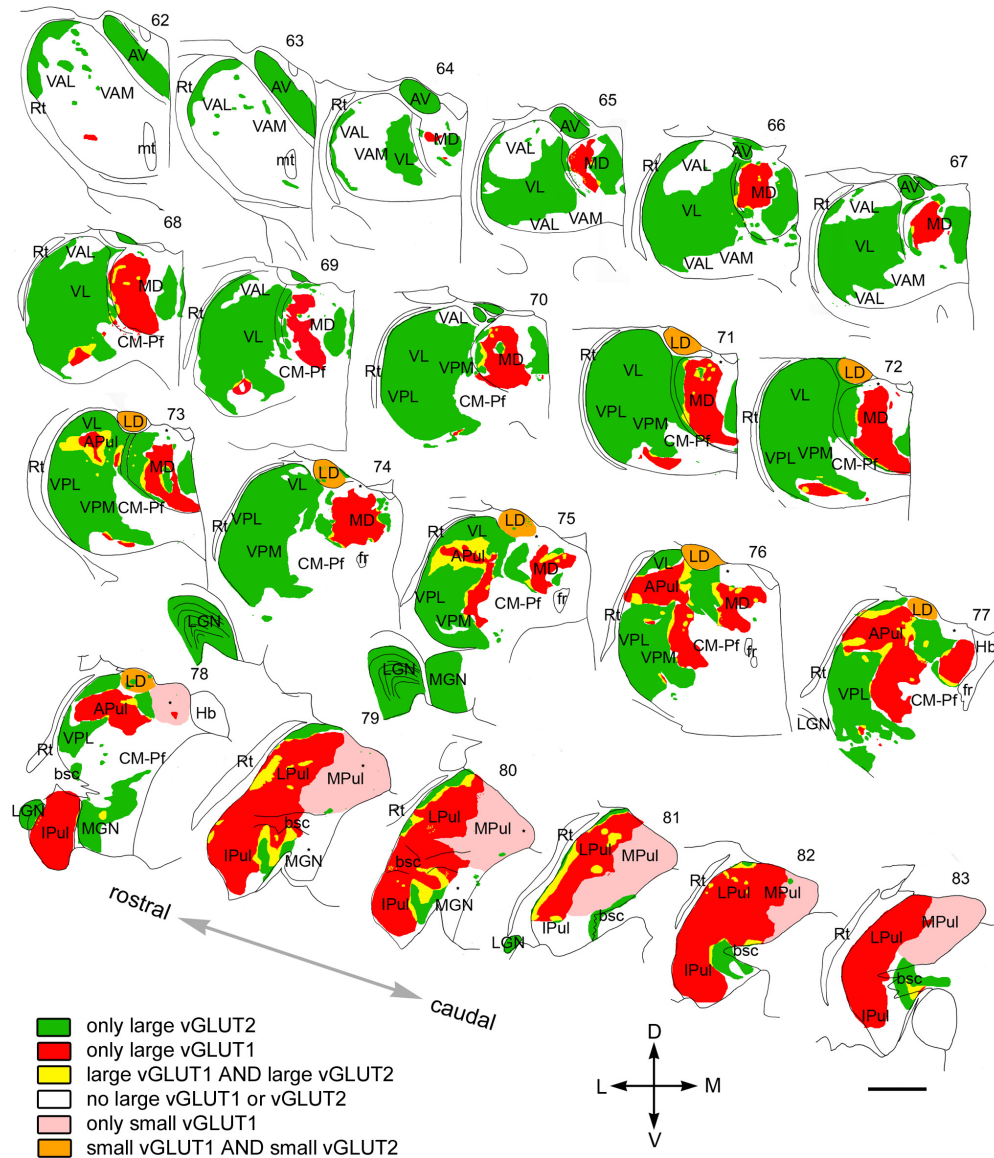
Az egér kísérletekhez az alábbi primer ellenanyagokat használtuk: egér-anti-Cre (1:30000, Millipore), nyúl-anti-Cre (1:5000, Covance), egér-anti-NeuN (1:3000, Chemicon), egér-anti-gephyrin (1:1000, Synaptic System), nyúl-anti- γ 2 (1:4000 Synaptic System), nyúl-anti- α 1, (1:500), nyúl-anti- α 4 (1:500), a két utóbbi antitest Werner Sieghart ajándéka, tengerimalac-anti-vGAT (1:6000, Synaptic System). Másodlagos antitestnek az azonos állat ellen termeltetett fluoroforral (Alexa 488, CY3) konjugált szamar-antitesteket használtuk.

4. EREDMÉNYEK I.

4.1. A talamusz drivertérképe

A fény- és elektronmikroszkópos eredményeink alapján a vizsgált hét majom adatait figyelembe véve elkészítettük a makákó talamuszának teljes drivertérképét (1. ábra). A térképen megjelenik a driverek eredete (kortikális vs. szubkortikális), a mérete (nagy vagy közepes), illetve a különböző eredetű driverek konvergenciája és szegregációja. Mindezeket figyelembe véve a majom talamuszban hat különböző típusú driver előfordulást különítettünk el: (1) kizárólag vGLUT2-tartalmú óriásbemenettel rendelkező régiók - zölddel jelölve a 1. ábrán, (2) kizárólag vGLUT1-tartalmú óriásbemenettel rendelkező régiók - piros színnel jelölve az ábrán, (3) vGLUT2- és vGLUT1-pozitív drivereket egyaránt tartalmazó, konvergens régiók - sárga színnel jelölve az ábrán, (4) RL-típusú végződéseket nélkülöző területek - fehérrel jelölve az ábrán, (5) kizárólag kis méretű vGLUT1-pozitív RL-típusú végződéseket tartalmazó régiók - rózsaszín színnel jelölve az ábrán, (6) kis méretű vGLUT1-es és kis méretű vGLUT2-es RL-típusú végződéseket tartalmazó régiók - narancssárga színnel jelölve az ábrán. Az így kapott régiók alapvetően, de nem minden tekintetben, megegyeznek a korábban megállapított talamikus maghatárokkal. A térkép jelentős klinikai alkalmazási lehetőségeket rejt magában, hisz általa jól elkülöníthetőek a motoros talamusz cerebello-recipientis és bazális ganglion-recipientis régiói, vagy például a pulvinar az azt körülvevő szenzoros és motoros talamusztól. Ezzel szemben a bemenet alapú térképezés nem teszi lehetővé, hogy a VPL zónáját elkülönítsük a VPM-től vagy a motoros VL magtól. Illetve azt sem tudjuk meg, hogy egy adott vGLUT1 vagy vGLUT2 tartalmú terminális valójában honnan ered.

1. Bebizonyítottuk, hogy nagy talamikus régiók kizárólag szubkortikális eredetű driverek irányítása alatt állnak. Emellett magasabbrendű talamikus területek is rendelkeznek jelentős szubkortikális driver beidegzéssel. Végül kiterjedt talamikus területekről hiányzik a szubkortikális serkentő driver bemenet, vagyis nem állnak kéregalatti irányítás alatt.
2. Kimutattuk, hogy nagy talamikus régiók a pulvinarban és a mediodorsal magban kizárólag kortikális irányítás alatt állnak, területükre csak ötödik rétegi driver bemenetek érkeznek. Mindemellett kitűnt, hogy mind a mediodorsal mag, mind a pulvinar driver bemeneteit tekintve igen heterogén struktúra.
3. A driverek eloszlásában alapvetően a különböző eredetű bemenetek szegregációja dominál. Mindemellett a határzónákat alaposan szemügyre véve kimutattuk, hogy egyes talamikus területeken elképzelhető a kortikális és szubkortikális driver bemenetek keveredése, ezáltal megvalósulhat a kétféle bemenet integrációja az adott relésejteken.
4. A korábbi megfigyeléseinkkel összhangban alátámasztottuk azt a tényt, hogy a bazális ganglion-recipientis talamuszban nincsenek sem kortikális, sem szubkortikális driver bemenetek. Szerepüket feltehetőleg a hasonló megjelenéssel bíró gátló óriásvégzések vehették át.
5. A különböző régiókból származó driver bemenetek méreteit összehasonlítva kimutattuk, hogy jelentős méretbeli változatosságot mutathatnak az RL-típusú végzések a régiók között.



1. ábra.

6. Az intralamináris magkomplexről bebizonyítottuk, hogy magasabbrendű funkciói ellenére nagyon kevés kortikális driver bemenettel rendelkeznek, ellenben a rostrális intralaminaris magokat kis méretű subkortikális driverek idegzik be.
7. Végezetül a birtokunkban levő eredmények alapján egy a klinikumban is jól használható driver bemeneteken alapuló térképet hoztunk létre a majom thalamusról.

5. EREDMÉNYEK II.

5.1. A vírus hatékonyan eliminálja a szinaptikus $\gamma 2$ alegységeket

A vírussal nem fertőzött thalamikus félen a $\gamma 2$ immunfestés sűrű pontszerű jelölést eredményezett, ami az alegység szinaptikus elhelyezkedésére utal. Ezzel szemben, az AAV-

1. ábra. A driver bemenetek mozaikossága a főemlősök talamuszában. A térképen a kéreg felől és a kéreg alatti struktúrákból érkező serkentő óriásterminálisok eloszlása látható a teljes majom talamuszban 22 koronális metszeten (500 μm közökkel) anterior-posterior irányban feltüntetve. A térkép mind a hét majom eredményeit figyelembe veszi. Hat különféle beidegzés különíthető el a fény- és elektronmikroszkópos megfigyeléseink alapján. Kiterjedt régiók kizárólag szubkortikális (vGLUT2, zöld), vagy kortikális driver bemenettel (vGLUT1, piros) rendelkeznek. A kétféle óriásterminális konvergenciája csak a határzónákra korlátozódik. A basal ganglion recipiens mag (VA) nem rendelkezik semmilyen RL-típusú bemenettel (fehér). Kis méretű RL-típusú butonok jellemzik a mediális pulvinart és a CM-Pf komplexet (rózsaszín). Végül a laterodorsal magában kis méretű kortikális és szubkortikális driverek keveredését figyeltük meg (narancssárga). Egyes talamikus magokban, mint a pulvinar és a mediodorsal mag, a driver bemenetek eloszlása heterogén. Skála: 2 mm.

Cre-fertőzött területeken $\gamma 2$ -immunoreaktív jelölődést nem láttunk. Ezt követően megvizsgáltuk a szinaptikus $\alpha 1$ alegység és az extraszinaptikus $\alpha 4$ alegység expresszióját. A $\gamma 2$ jelöléssel ellentétben nem láttunk különbséget a fertőzött és nem fertőzött régiók között.

5.2. A $\gamma 2$ alegység eltávolítására eltűnnek a gyors IPSC-k

Glutamát receptor antagonisták (DNQX 40 μM , D,L-APV 100 μM) jelenlétében minden kontroll talamokortikális relésejtre jellemző volt a gyors spontán IPSC-k jelenléte $1,33 \pm 0,89$ Hz frekvenciával. Ezzel szemben a gyors IPSC-k szinte teljesen eltűntek a $\gamma 2^{-/-}$ VB sejtekből.

Az nRT rostok aktivációjával megbízható módon lehetett gyors IPSC-eket kiváltani a kontroll sejtekből ötből négy esetben. Ellenben a $\gamma 2^{-/-}$ VB sejtek esetén ez csak hatból egy esetben sikerült.

Az AAV-GFP-fertőzött kontroll sejtek magas klorid ion tartalmú intracelluláris oldattal történt mérésekor alkalmazott GABA_A receptor antagonista (gabazine, 10 μM) a tartó áram outward irányú elmozdulásával járt ($\Delta I = 53 \pm 19$ pA, $n = 7$), ami a tónusos áram jelenlétére utal. A $\gamma 2^{-/-}$ VB sejtekben viszont a tónusos áram szignifikánsan kisebbnek bizonyult (30 ± 14 pA, $n = 9$, $p < 0,05$). Ezen felül a $\gamma 2^{-/-}$ sejteket nagyobb input rezisztencia is jellemezte (255 ± 110 M Ω vs. 177 ± 84 M Ω , $n_{\text{control}} = 12$, $n_{\text{AAV-Cre}} = 27$, $p < 0,05$).

5.3. A burst közvetítette IPSC-k fennmaradnak a szinaptikus GABA_A receptorok hiányában is *in vitro*

Az nRT sejtei spontán módon burstölnek *in vitro*. Ilyen körülmények között nRT eredetű, nagy multikomponensű IPSC-eket (burst IPSC-eket) lehet elvezetni a posztzinaptikus talamokortikális sejtekből. Érdekes módon nem csak a kontroll sejtekben, de a $\gamma 2^{-/-}$ VB sejtekben is megfigyeltünk nagy amplitúdójú gátló áramokat gyors spontán IPSC-k hiányában is. Ezek a gátló áramok tipikusan ritkán fordultak elő, egyesével vagy 2 - 4 esemény csoportjaként néhány száz ms intervallummal, ami az nRT repetitív burst tüzelésére

utal.

A kontroll sejtekben az áramok a burst IPSC-k tipikus jegyeit viselték, azaz több komponensű gyors áramokat lehetett elkülöníteni egy lassú felfutású áramon. Ezzel ellentétben, a $\gamma 2^{-/-}$ talamokortikális sejtekben a burst IPSC mindössze csak a lassú áramból állt, az individuális IPSC-k hiányoztak.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

Az első tanulmányban megállapítottuk, hogy a talamusz legfőbb bemenetét jelentő driverek szerveződése igen változatos. Habár az az általánosan elfogadott nézet, hogy a talamusz legfőbb tulajdonsága a perifériás (szenzoros) információ agykéreg felé történő relézése, eredményeinkből az látszik, hogy a főemlős talamusz igen nagy hányadáról hiányoznak az ehhez szükséges szubkortikális driver bemenetek. Ezen felül eredményeinkből az látszik, hogy nem minden talamokortikális relésejt kizárólagosan driver bemenetek irányítása alatt áll, hanem léteznek olyan régiók, ahol a serkentő és gátló afferensek együttesen határozzák meg a relésejtek tüzelését. Mivel a relésejtek által közvetített üzenet a driver terminálisok méretétől és eredetétől függ, és ez eredményeink alapján igen változatos, ezért úgy gondoljuk, hogy a relésejtek jelfeldolgozása is változatos lesz. Eredményeink keretet adnak a korábbi és jövőbeni talamuszt érintő főemlős kutatásoknak, és mindemellett a talamuszt érintő humán neurológiai kórképek morfológiai leírásának.

A bemutatott második tanulmányban egy eleddig fel-nem-ismert kisülésmód-specifikus gátló mechanizmust tártunk fel egy régóta tanulmányozott szinapszisban. A vizsgált struktúra fő feladata a talamokortikális sejtek szinkronizálása oszcilláció során. Eredményeink összetett szinaptikus elrendezésre utalnak, ahol finoman hangolt együttműködés figyelhető meg a különböző $GABA_A$ receptorok között preszinaptikus kisülésmódnak megfelelően. A talamik $GABA_A$ receptorok molekuláris összetevőinek megismerése elengedhetetlen ahhoz, hogy az alvás során tapasztalt talamokortikális szinkronizáció mechanizmusát megértsük, mivel köztudottan a $GABA_A$ receptorok jelentik a nyugtató és altató drogok fő célmolekuláját. Eredményeink elegáns bizonyítékkal szolgálnak a $GABA_A$ receptorok specifikus szerepére egyes viselkedési állapotokban, és így egy új, célzott gyógyszerkutatási irányba mutatnak. Az ez alapján kifejlesztett altató egyedülálló módon csak az alvás során tapasztalható talamik gátlást fokozná, míg az ébrenlét során jelentkező fázisos gátlás nem szenvedne kárt, tehát a nem-kívánt mellékhatások száma is jelentősen csökkenne.

7. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK

A doktori disszertáció alapját képező publikációk

1. **Rovó Z**, Ulbert I, Acsády L. (2012) Drivers of the Primate Thalamus. *J Neurosci.* 32(49):17894–17908
2. Bodor ÁL, Giber K, **Rovó Z**, Ulbert I, Acsády L. (2008) Structural Correlates of Efficient GABAergic Transmission in the Basal Ganglia–Thalamus Pathway. *J Neurosci.* 28(12):3090–3102

Egyéb publikációk

1. Wimmer RD, Astori S, Bond CT, **Rovó Z**, Chatton J-Y, Adelman JP, Franken P, Lüthi A. (2012) Sustaining Sleep Spindles through Enhanced SK2-Channel Activity Consolidates Sleep and Elevates Arousal Threshold. *J Neurosci.* 32(40):13917–13928
2. Cazzin C, Piccoli L, Massagrande M, Garbati N, Michielin F, Knaus HG, Ring CJ, Morrison AD, Merlo-Pich E, **Rovó Z**, Astori S, Lüthi A, Corti C, Corsi M. (2011) rKv1.2 overexpression in the central medial thalamic area decreases caffeine-induced arousal. *Genes Brain Behav.* 10(8):817-27.
3. Bíró A, **Rovó Z**, Papp D, Cervenak L, Varga L, Füst G, Thielens NM, Arlaud GJ, Prohászka Z. (2007) Studies on the interactions between C-reactive protein and complement proteins. *Immunology.* 121(1):40-50