

# FESZÜLTSGFÜGGŐ IONCSATORNÁK SEJTFELSZÍNI ELOSZLÁSA A HIPPOKAMPUSZBAN

**Doktori tézisek**

**Dr. Kirizs Tekla**

Semmelweis Egyetem  
Klinikai Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Nusser Zoltán, az MTA rendes tagja, kutatóprofesszor

Hivatalos bírálók: Dr. L. Kiss Anna, Ph.D., egyetemi docens  
Dr. Halasy Katalin, az MTA doktora, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Enyedi Péter, az MTA doktora, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Schlett Katalin, Ph.D., egyetemi docens  
Dr. Zelles Tibor, Ph.D., egyetemi docens

**Budapest  
2017**

## 1. Bevezetés

Agyunk azon képessége, hogy a folytonosan változó külső és belső környezetből érkező információkat feldolgozza, tárolja és felidézze, illetve hogy hatékonyan végezzen el nagyban különböző funkciókat, az azt felépítő elemek figyelemre méltó sokfélesége (idegsejtek) és az azokat összekötő meglepően komplex, dinamikus kapcsolatok (szinapszisok) eredménye. Az egyes idegsejtek aktivitását más idegsejtektől érkező serkentő és gátló bemenetek formálják. Az egyes bemenetek hatását, a bejövő információk integrálását és azok kimeneti jelekké való alakítását pedig számos, a sejtek plazmamembránjában különböző mintázatokban kifejezett ligand- és feszültségfüggő ioncsatornák összehangolt aktivitása irányítja.

Az utóbbi időben ezen ioncsatornák közül, a feszültségfüggő  $K^+$  csatornák ( $K_v$ ) kitüntetett figyelmet kaptak molekuláris és funkcionális sokszínűségük miatt. A hippokampális piramis sejtek sokféle  $K_v$  csatorna alegységet fejeznek ki plazmamembránjukban, amelyek különböző szubcelluláris kompartmentekben foglalhatnak helyet. Elektrofiziológiai kísérletek azonosították az  $I_K$  áramot piramis sejtek szomato-dendritikus kompartmentjeiben, amelyért nagyrészt a  $K_v2.1$  alegység a felelős. Ezek a csatornák szabályozzák a sejtek serkenthetőségét, és leginkább repetitív, magas frekvenciájú tüzelés alatt felelősek a sejtek repolarizációjáért. Továbbá szerepük lehet a kóros hiperexcitabilitás csökkentésében.  $K_v$  csatornákat szintén leírtak piramis sejtek axonjaiban, ahol az akciós potenciál küszöbének a beállításáért felelősek és befolyásolják annak az alakját, így szabályozva a neurotranszmitter felszabadulását. Különösen fontosak a  $K_v1.1$  alegységű csatornák, mivel ezek diszfunkciója vagy hiánya számos neurológiai betegséggel asszociált (epilepszia, epizodikus ataxia). Azonban, kiemelt fontosságuk és kiterjedt elektrofiziológiai és anatómiai vizsgálatok ellenére

ezeknek az ioncsatornáknak a pontos sejtfelszíni elhelyezkedése és sűrűsége még ismeretlen.

Egy másik érdekes megfigyelés, hogy egy adott idegsejt ugyanazon szubcelluláris kompartmentumban elhelyezkedő serkentő, illetve gátló szinapszisainak az ioncsatorna összetétele, száma, sűrűsége vagy azok térbeli elrendeződése különbözhet. Jelenleg sok kutatás foglalkozik a preszinaptikus (axonvégződéseken elhelyezkedő) feszültségfüggő  $\text{Ca}^{2+}$  csatornákkal ( $\text{Ca}_v$ ), mivel feltételezik, hogy ezeknek a csatornáknak az eloszlásában fellelhető különbségek lehetnek a felelősek a szinaptikus transzmisszió hatékonyságában, időbeli precizitásában és szinaptikus plaszticitásában fellelhető sokszínűségért. Ezen csatornák nyitása után a beáramló  $\text{Ca}^{2+}$  eldiffundál a forrástól (ioncsatorna) a vezikuláris szenzorig (synaptotagmin), majd azt aktiválva kiváltja a neurotranszmitter felszabadulását. Mivel egyetlen csatorna által létrehozott  $\text{Ca}^{2+}$  jel meredeken csökken a távolság függvényében, a  $\text{Ca}_v$  csatornák és a dokkolt vezikulák térbeli elrendeződése fontos meghatározó tényezője a neurotranszmitter felszabadulási valószínűségnek.

Ezek alapján eltérő  $\text{Ca}_v$  csatorna eloszlást feltételeznek a neurotranszmitter felszabadulási valószínűségében fellelhető célsejtfüggő különbségek háttérében. Ismeretes, hogy egyetlen piramisneuron különböző gátló idegsejtekre adott bemenetei között alapvető különbségek vannak: a szomatosztatint és  $\text{mGlu}_{1a}$ -t kifejező hippocampális O-LM és O-Bi sejtekben, illetve az agykéreg "bitufted" sejteiben a kiváltott posztzinaptikus potenciálok (EPSP-k) plaszticitása facilitációt mutat, alacsony kezdeti neurotranszmitter felszabadulási valószínűséggel. Ezzel szemben, markáns depresszió és magas kezdeti felszabadulási valószínűség figyelhető meg a piramisneuron parvalbumin (PV) tartalmú gyorstüzelő gátlósejtekre adott axonvégződéseiben. Annak ellenére, hogy napjainkig nem ismert ezekben a facilitáló szinapszisokban a kezdeti alacsony felszabadulási valószínűség háttérében álló mechanizmus, Rozov *et al.* (2001) egy elegáns

kísérletsorozat alapján előterjesztett egy hipotézist, miszerint a két szinapszisban megfigyelhető eltérő glutamát felszabadulási valószínűségért feltehetőleg a  $Ca_v$  csatornáknak a  $Ca^{2+}$  szenzortól való eltérő távolsága felelős. Hasonló  $Ca^{2+}$  szenzorok és dokkolt vezikula sűrűség esetén, ez azt jelentené, hogy az alacsony felszabadulási valószínűséggel rendelkező axonvégzódésekben kisebb a  $Ca_v$  csatornák sűrűsége, mint a magas felszabadulási valószínűségű végzódésekben. A jövőben ennek a feltételezésnek az igazolásához, magas felbontású immunolokalizációs kísérletekre lesz szükség.

A szinaptikus transzmisszióban bemenetfüggő különbségek is ismeretesek, és hasonló módon a  $Ca_v$  csatornák eloszlásában levő különbségeket feltételeznek a háttérben. Például a kolecisztokinin (CCK), illetve a PV tartalmú kosársejtek hippokampális piramissejtekre menő axonvégzódései között lényeges funkcionális különbségek vannak. Míg a  $PV^+$  bemenetekből az akciós potenciál hatására gyorsan és mindig ugyanakkor, addig a  $CCK^+$  terminálisokból lassan, az akciós potenciál érkezése után változó időintervallummal szabadul fel a GABA. Hefft és Jonas (2005) kísérletei arra utalnak, hogy ezen különbségek alapja az lehet, hogy míg  $PV^+$  gátlósejtekben a neurotranszmitter felszabadulásáért az aktív zónában, szinaptikusan elhelyezkedő  $Ca_v2.1$  (P/Q-típusú) csatornák, addig  $CCK^+$  gátlósejtekben extraszinaptikusan lokalizált  $Ca_v2.2$  (N-típusú) csatornák lehetnek a felelősek. A jövőben ennek a feltételezésnek az igazolásához közvetlen anatómiai bizonyítékra lesz szükség.

## 2. Célkitűzés

Munkám általános célja a feszültségfüggő  $K^+$  és  $Ca^{2+}$  csatornák sejtfelszíni eloszlásának vizsgálata volt, illetve, hogy az ioncsatornák eloszlásában bemenet és célsejtfüggő különbségeket tárjak fel, amelyek különböző funkciókért lehetnek felelősek.

Kísérleteimmel a nagyfelbontású nátrium dodecil szulfát (SDS)-maratott fagyasztva-tört replika jelölés (SDS-FRL) módszerét felhasználva, a következő kérdésekre kerestem a választ:

- (1) Milyen szubcelluláris eloszlást mutatnak a  $K_v1.1$  és  $K_v2.1$  alegységek a CA1 piramis sejtek axo-szomato-dendritikus kompartmentumaiban?
- (2) Kimutathatók-e célsejtfüggő különbségek a feszültségfüggő  $Ca^{2+}$  csatornák eloszlásában és sűrűségében a CA3 piramis sejtek axonvégződéseik között?
- (3) Kimutathatók-e bemenetfüggő különbségek a feszültségfüggő  $Ca^{2+}$  csatornák eloszlásában CA3 piramis sejtekre bemenetet adó kosársejtek axonvégződéseik között?

### Hozzájárulás:

Az immunarany szemcsék eloszlásának vizsgálatához használt szoftvert Szoboszlay Miklós készítette.

### 3. Módszerek

#### 3.1. Szövetek előkészítése

Wistar patkányokat ( $n = 11$ , 30–66 napos felnőtt hím;  $n = 8$ , 15–17 napos fiatal hím), CCK-BAC/DsRedT3 ( $n = 5$ , 19–25 napos hím),  $CB_1^{+/+}$  ( $n = 2$ , 18 és 26 napos nőstény) és  $CB_1^{-/-}$  ( $n = 2$ , 18 napos nőstény, Prof. Andreas Zimmer adománya) egereket elaltattam, majd aortán keresztül perfundáltam. A fénymikroszkópos immunfluoreszcens reakciókhoz az állatokat 0,1 M foszfát pufferben (PB) oldott 4% paraformaldehid (PFA) és 15v/v % pikrinsav (PA) keverékét tartalmazó oldattal vagy 0,1 M nátrium acetátban oldott 2% PFA tartalmazó oldattal perfundáltam 15 percig. Ezt követően 70  $\mu\text{m}$  vastagságú koronális metszeteket készítettem. Egyes metszetek 0,2 mg/ml pepszint tartalmazó 0,2 M HCl-ban oldatban inkubáltam 37°C-on 18–20 percig. Az SDS-FRL-hez az állatokat 0,1 M PB-ben oldott 2% PFA és 15v/v % PA keverékét tartalmazó oldattal perfundáltam 15 percig. Ezt követően 80  $\mu\text{m}$  vastagságú koronális vagy horizontális metszeteket készítettem. A fagyasztáshoz kis szövet darabokat metszettem ki a dorzális CA1 régióból, illetve a dorzális és ventrális CA3 régióból. A szövet darabokat krioprotekció céljából 30% glicerol oldattal kezeltem. A  $Ca_v2.2^{+/+}$  ( $n = 1$ , 18 napos) és  $Ca_v2.2^{-/-}$  egerekből ( $n = 1$ , 9 hónapos, Prof. Yasuo Mori adománya) készült replikákat Prof. Ryuichi Shigemoto adományozta.

#### 3.2. Fluoreszcens immunhisztokémia

A szabadon úszó metszeteket többször 0,1 m PB-ben, majd Tris-pufferelt sóoldatban (TBS) mostam. Ezt követően a metszeteket 10% normál kecske szérummal (NGS) blokkoltam 1 órán át, majd az elsődleges ellenanyagokat tartalmazó oldatban inkubáltam egy éjszakán át. Másnap újabb mosást követően, a szeleteket 2 órán át a másodlagos ellenanyagokat tartalmazó oldatban inkubáltam. A fénymikroszkópos képeket konfokális pásztázó lézer mikroszkóppal (FV1000; Olympus) készítettem.

### **3.3. SDS-FRL**

A kis szövet darabokat magas-nyomású fagyasztó készülékkel lefagyasztottam, majd fagyasztva-törő készülékben eltörtem. Az elhasított szövet felszínén szén (5 nm), platina (2 nm) és szén (20 nm) réteggel gőzöltettem. Az így nyert replikát 80°C-on 18 órát emésztettem 2,5% SDS és 20% szukroz keverékét tartalmazó TBS-ben. Mosást (TBS) követően a replikákat 0,1%–5% marha szérum fehérjét (BSA) tartalmazó TBS oldatban blokkoltam 1 órán át, majd a blokkoló oldatban hígított elsődleges ellenanyagokkal inkubáltam egy vagy négy éjszakán át. Másnap a replikákat 2 órán át 5, 10 vagy 15 nm méretű arany szemcséhez kötött másodlagos ellenanyagot és 5% BSA-t tartalmazó TBS oldatban inkubáltam. Az elsődleges ellenanyagok intracelluláris epitópokat ismertek fel, ezért a specifikus immunarany jelölés a protoplazmatikus felszínen (PF) volt látható. A nem specifikus háttér jelölést az extracelluláris felszínen (EF) mértem. Végül a replikákat transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltam (JEM-1011, JEOL Ltd).

### **3.4. A $K_v1.1$ és $K_v2.1$ aleggységeket jelölő immunarany szemcsék kvantitatív elemzése patkány CA1 régióban**

A  $K_v1.1$  és  $K_v2.1$  aleggységet jelölő arany szemcséket a CA1 piramis sejtek sejttestén, az axon kezdeti szakaszán, 11 különböző dendritikus kompartmentumban, az axon iniciális szegmentumban és axonvégződéseknél kvantifikáltam a CA1 hat rétegében ( $n = 3$  patkány aleggységenként): stratum oriens (SO), stratum pyramidale (SP), proximális (0–120  $\mu\text{m}$ ), középső (120–240  $\mu\text{m}$ ) és disztális stratum radiatum (240–360  $\mu\text{m}$ ), stratum lacunosum-moleculare (SLM; 360  $\mu\text{m}$  felett), amelyeket a SP-től való távolságuk alapján azonosítottam. Ezekben a rétegekben vizsgáltam az apikális, járulékos dendriteket, tüskéket és axonvégződéseket. A járulékos dendriteket kis átmérőjük és legalább egy tüske jelenléte alapján azonosítottam. Az axonvégződéseket vagy a SNAP-25 immunarany jelölés

alapján azonosítottam vagy az aktív zóna jelenléte alapján, amellyel szemben megfigyelhető volt egy posztzinaptikus denzitás, tüske vagy dendrit EF-en. Az axon iniciális szegmentumokat az SP-ban és SO-ben fotóztam. A  $Ca_v2.1$  alegység kvantifikálásához az axon iniciális szegmentumot a pan-Neurofascin jelölés alapján azonosítottam ( $n = 3$  patkány).

### ***3.5. A $Ca_v2.1$ és $Ca_v2.2$ alegységeket jelölő arany szemcsék kvantitatív elemzése patkány CA3 piramis sejt K $_v3.1b$ vagy mGlu $_{1a}$ pozitív sejtre menő axonvégződéseiben***

A  $Ca_v2.1$  és  $Ca_v2.2$  alegységeket jelölő arany szemcsék az SO-ben található  $K_v3.1b^+$  és  $mGlu_{1a}^+$  sejtre menő aktív zónákban való kvantifikálásához a „tükör replika” módszerét alkalmaztam. Az egyik replikán a  $K_v3.1b$  és az  $mGlu_{1a}$  jelölésével azonosítottam a gátlósejt dendriteket, míg a tükör replikán vagy a  $Ca_v2.1$  vagy pedig a  $Ca_v2.2$  alegységet jelöltem. Az aktív zónákat a PF-en az intramembrán partikulumok (IMP) klasztereződése alapján azonosítottam. Az IMP klasztert nem tartalmazó axonvégződéseket kihagytam az analízisből, mivel ez a gátló terminálisokra jellemző tulajdonság. Ahhoz, hogy kiküszöböljem a  $Ca_v$  csatorna jelölési erősségben potenciálisan jelenlevő reakciók közötti variabilitást, a szinaptikus, extraszinaptikus és háttér  $Ca_v$  alegység sűrűségeket az  $mGlu_{1a}^+$  sejtre menő aktív zónákban mért átlagos  $Ca_v$  alegység sűrűségére normalizáltam.

### ***3.6. A $CB_1$ , Rim1/2, $Ca_v2.1$ és $Ca_v2.2$ alegységek kvantifikálása piramis sejt sejttestjére menő axonvégzésekben patkány és egér disztális CA3 régiójában***

A  $CB_1$ , Rim1/2,  $Ca_v2.1$  és  $Ca_v2.2$  alegységek kvantifikálását piramis sejt sejttestének EF-éhez tapadt axonvégzések membránrészleteinek PF-ein végeztem. Ehhez elektronmikroszkópos felvételeket készítettem egy patkány és két egér disztális CA3 régiójából. Az analízist olyan rátapadt membránrészletekre korlátoztam, amelyek területe  $> 0,01$  és  $< 0,21 \mu m^2$  volt, amely értékek megfelelnek a Holderith N. 3D



elektronmikroszkópos rekonstrukciós kísérleteiből származó aktív zónák méreteinek. Kiszámoltam az arany szemcsék sűrűségét ezekben a rátapadt membránrészekben, anélkül, hogy feltételeztem volna, hogy ezek teljes területe az aktív zónának felel meg. Közvetetten bizonyítottam, hogy a  $Ca_v2.1$  és  $Ca_v2.2$  alegységek az aktív zónákban helyezkednek el. Először Rim1/2 jelölés segítségével megmutattam, hogy a sejtestekre rátört axonvégződés 31,7%, illetve 23,6%-a tartalmaz aktív zónát patkányban, illetve egérben. Ugyanakkor a  $Ca_v2.1$  és  $Ca_v2.2$  alegységek kettős jelölés esetén a jelölést tartalmazó axonvégződés aránya igen csak hasonló volt (43% és 19,8%).

### **3.7. Fehérjéket jelölő arany szemcsék eloszlásának vizsgálata**

Ahhoz, hogy megvizsgáljam, hogy az adott fehérjék eloszlása véletlenszerű vagy sem az egyes szubcelluláris kompartmentumokban a Szoboszlay M. kollegám által létrehozott GoldExt nevű szoftvert használtam. Először megmértem az összes arany szemcse legközelebbi szomszédjától való átlagos távolságát (“nearest neighbor distance”,  $\overline{NND}$ ). Majd ezt az értéket hasonlítottam random kontrolokból számolt  $\overline{NND}$  értékhez, amelyeket ugyanarra a területre az arany számával megegyező számú pont véletlenszerű elhelyezésével hoztam létre (200 vagy 1000 ismétlés). A második mérés esetén meghatároztam a 2D autókorrelációs függvényt (2D ACF) Veatch *et al.* (2012) alapján, amely megadja annak a valószínűségét, hogy egy adott ponttól egy bizonyos ( $r$ ) távolságon belül egy másik pont is található. Ennek  $g(r)$  értéke 1 random mintázatok esetén, míg ha  $> 1$  értékek térbeli inhomogenitásra utalnak. A kísérleteimben meghatároztam az  $\overline{g(r)}$   $r < 80$  nm távolságokra, a kísérleti adat és a hozzátartozó random kontrolok esetén. Mindkét mérésnél a kísérleti adat és annak kontrolljainak  $\overline{NND}$ , illetve  $\overline{g(r)}$  értékeit a Wilcoxon-féle előjeles rang próbával (WP) hasonlítottam össze.

## 4. Eredmények

### 4.1. A $K_v1.1$ alegység szubcelluláris eloszlása a hippocampális CA1 régióban

Először fénymikroszkópos immunfluoreszcens reakciókban vizsgáltam a  $K_v1.1$  alegység eloszlását felnőtt patkány CA1 régiójában. Azért, hogy meggyőződjem, hogy kísérleti körülményeim között a  $K_v1.1$  immunjelölés specifikus ellenanyag-antigén kötődés eredménye, két elsődleges ellenanyaggal végeztem immunjelölést, amelyek a  $K_v1.1$  alegység két eltérő, nem átfedő epitópja ellen lettek termeltetve. A két ellenanyag által adott azonos jelölés bizonyítja a reakció specificitását. Korábbi eredményekkel megegyezően, kis nagyításon, az SO-ben és SR-ban erős, homogén neuropil jelölés volt megfigyelhető, amely vagy axonvégződésekből vagy dendritikus tüskékből származhat. Nagy nagyításon mielinizált axonok juxta-paranodális régióinak és axon iniciális szegmentumok jelölését figyeltem meg. Ezt megerősítette, hogy a  $K_v1.1$  alegység jelölése kolokalizált ismert axon iniciális szegmentum markerekkel (Ankyrin-G és pan- $Na_v$ ) kettős immunfluoreszcens reakciókban. Ahhoz, hogy minden kétséget kizáróan meghatározzam a neuropil jelölés eredetét az SO-ben és SR-ban és, hogy meghatározzam a  $K_v1.1$  alegység sűrűségét CA1 piramis sejtek 18 axo-szomato-dendritikus kompartmentjében, elvégeztem a  $K_v1.1$  alegység SDS-FRL jelölését.

A replika elektronmikroszkópos tanulmányozása során az SP-ban és az SO-ben erősen jelölt, hosszúkás struktúrákat figyeltem meg, amelyeket majd, mint axon iniciális szegmentumot azonosítottam a pan-Neurofascinnel való immunjelölés alapján. Az axon iniciális szegmentumokban, a  $K_v1.1$  alegységet jelölő arany szemcsék elkerülték az axo-axonikus GABA-erg szinapszisok posztszinaptikus membránját. Az alveusban az arany szemcsék bedúsultak olyan struktúrákon, amelyeket keresztbetört mielin hüvely vett körbe, ami arra utal, hogy ezek a struktúrák mielinizált axonok juxta-paranodális

régióinak felelnek meg. Ezek után vizsgáltam a neuropil jelölés eredetét. Posztszinaptikus denzitást tartalmazó tüske vagy dendrit EF-el szemben levő kis PF membránok következetesen jelölve voltak. A  $K_v1.1$  alegység és az axonvégzódésekben kizárólagosan jelen levő SNAP-25 elleni kettős immunjelölés megmutatta, hogy a kis PF membránok axonvégzódések.

**1. Táblázat. A  $K_v1.1$  és  $K_v2.1$  alegységeket jelölő immunaranysemcsék sűrűsége különböző szubcelluláris kompartmentumban patkány CA1 régióban.** A sűrűség értékek aranysemcsce/ $\mu m^2$  átlag  $\pm$  SD-ban (állatok között) vannak megadva. A zárójelben levő számok a kvantifikált aranysemcsék számát jelzik. A háttérnél szignifikánsan nagyobb értékeket félkövér számok jelzik. # jelzi, hogy az axon iniciális szegmentumban az aranysemcsék sűrűségét külön kettős immunreakcióban mértem meg, ahol ezen struktúrát a  $K_v1.1$  alegység elleni immunjelölés alapján azonosítottam. Ebben a reakcióban a háttér jelölés  $0,6 \pm 0,1$  aranysemcsce/ $\mu m^2$  volt.

Kvantifikált alegység	$K_v1.1$	$K_v2.1$
SO axonvégződés	<b>4,0</b> $\pm$ 1,2 (195)	1,1 $\pm$ 0,5 (47)
Axon iniciális szegmentum	<b>26,2</b> $\pm$ 4,9 (2758)	<b>11,5</b> $\pm$ 1,8 (900) #
SP sejttest	0,7 $\pm$ 0,2 (704)	<b>10,3</b> $\pm$ 1,1 (10501)
SR proximális apikális dendrit	0,7 $\pm$ 0,2 (98)	<b>9,4</b> $\pm$ 0,5 (3868)
SR középső apikális dendrit	0,5 $\pm$ 0,2 (80)	1,6 $\pm$ 0,1 (377)
SR disztális apikális dendrit	0,6 $\pm$ 0,4 (107)	1,1 $\pm$ 0,1 (415)
SR proximális járulékos dendrit	0,5 $\pm$ 0,3 (30)	1,4 $\pm$ 0,2 (126)
SR középső járulékos dendrit	0,9 $\pm$ 0,1 (50)	1,0 $\pm$ 0,1 (95)
SR disztális járulékos dendrit	0,8 $\pm$ 0,4 (39)	1,2 $\pm$ 0,1 (97)
SR proximális tüske	0,5 $\pm$ 0,6 (2)	1,2 $\pm$ 1,0 (10)
SR középső tüske	0,8 $\pm$ 0,7 (4)	0,5 $\pm$ 0,9 (2)
SR disztális tüske	0,2 $\pm$ 0,3 (2)	1,1 $\pm$ 0,2 (8)
SR proximális axonvégződés	<b>4,0</b> $\pm$ 0,5 (128)	1,4 $\pm$ 0,4 (42)
SR középső axonvégződés	<b>3,6</b> $\pm$ 0,7 (158)	1,3 $\pm$ 0,2 (45)
SR disztális axonvégződés	3,2 $\pm$ 0,6 (137)	1,6 $\pm$ 0,6 (42)
SLM dendritbojt	1,1 $\pm$ 0,6 (74)	1,4 $\pm$ 0,2 (221)
SLM dendritbojt tüske	0,7 $\pm$ 0,7 (10)	1,3 $\pm$ 0,2 (22)
SLM axonvégződés	3,2 $\pm$ 0,6 (104)	1,1 $\pm$ 0,2 (42)
Háttér	0,3 $\pm$ 0,1 (97)	0,7 $\pm$ 0,1 (333)

Ezen kvalitatív elemzés után, meghatároztam a  $K_v1.1$  alegységet jelölő aranysemcsék sűrűségét 18 szubcelluláris kompartmentumban (1. táblázat). Az aranysemcsék sűrűsége nem volt szignifikánsan magasabb a háttérnél piramissejtek sejttestén, apikális és járulékos dendritjein, a dendritbojton, illetve a tüskéken sem ( $P < 0,001$  One-way ANOVA (OWA),  $P$

= 0,999 Dunnett próba;  $n = 3$  patkány). Ezzel szemben, az SO-ben és a proximális és középső SR-ban levő axonvégződésekből az arany szemcsék sűrűsége szignifikánsan magasabb volt a háttérnél ( $P < 0,001$  OWA,  $P < 0,05$  Dunnett próba;  $n = 3$  patkány). A disztális SR-ban és az SLM-ben levő axonvégződésekből nagyon hasonló volt az arany szemcsék száma, de a háttértől való különbség nem érte el a szignifikancia szintet ( $P < 0,001$  OWA,  $P = 0,07$  Dunnett próba;  $n = 3$  patkány). Az axonvégződésekből megfigyelt arany szemcsék sűrűsége 7-8-szor volt kisebb, mint az axon iniciális szegmentumban (arányok számolása háttér kivonása után;  $P < 0,001$  OWA,  $P < 0,001$  Dunnett próba;  $n = 3$  patkány).

#### **4.2. A $K_v2.1$ alegység szubcelluláris eloszlása a hippocampális CA1 régióban**

A  $K_v2.1$  alegységet a CA1 régióban két eltérő, nem átfedő epitóp ellen termeltetett elsődleges ellenanyaggal jelöltem, így biztosítva, hogy az immunjelölés specifikus antigén-antitest interakció eredménye. Kis nagyításon erős immunjelölés volt megfigyelhető az SP-ben és a proximális SR-ban korábbi eredményekkel megegyezően. Nagy nagyításon a piramis sejtek sejttestén, proximális apikális és bazális dendritjein volt plazmamembrán-szerű immunjelölés megfigyelhető. A  $K_v2.1$  és  $Na_v1.6$  alegységek elleni kettős immunjelölés klaszterezett  $K_v2.1$  jelölést mutatott axon iniciális szegmentumokban, megerősítve a Sarmiere *et al.* (2008) eredményeit. Érdekes módon az axon iniciális szegmentumokban a  $K_v2.1^+$  klaszterek nem fedtek át az  $Na_v1.6$  jelölést tartalmazó részekkel.

SDS-FRL segítségével erős  $K_v2.1$  alegység elleni immunjelölést detektáltam piramis sejtek sejttestén és proximális apikális dendritjein, ami szignifikánsan nagyobb volt, mint a háttér (1 táblázat;  $P < 0,001$  OWA,  $P < 0,001$  Dunnett próba;  $n = 3$  patkány). A jelölés elszórt és klaszterezett arany szemcsékből állt. Mind a  $\overline{NND}$  és a  $\overline{g(r)}$  mérések azt

mutatták, hogy a  $K_v2.1$  alegység eloszlása szignifikánsan eltér véletlenszerű elrendeződésektől (WP  $P < 0,001$ ,  $n = 21$  szoma 1 patkányból), ami irreguláris eloszlásra utal. Továbbá a  $K_v2.1^+$  klaszterek laza IMP klasztereket jelöltek, amelyek akár GABA-erg periszomatikus szinapszisoknak is megfelelhetnek. Ezért a következőkben molekulárisan azonosítottam a gátló szinapszisokat. Ehhez kettős reakcióban jelöltem  $K_v2.1$  alegységet és a neuroligin-2-t (NL-2), ami egy gátló szinapszis marker. Azt találtam, hogy a  $K_v2.1$  és NL-2 klaszterek nem fedtek át, de néha közel ( $< 1\mu\text{m}$ ) helyezkedtek el egymáshoz. Az irreguláris  $K_v2.1$  alegység eloszlás jellemző volt axon iniciális szegmentumokra is (amelyeket az  $Na_v1.6$  vagy  $K_v1.1$  alegység elleni immunreaktivitás alapján azonosítottam), de a  $K_v2.1$  klaszterek nem fedtek át axo-axonikus GABA-erg szinapszisokkal és elkerülték az  $Na_v1.6$  és  $K_v1.1$  jelölésben gazdag területeket. Az arany szemcsék sűrűsége axon iniciális szegmentumokban  $11,5 \pm 1,8$  arany szemcsé/ $\mu\text{m}^2$  volt, ami nem tért el szignifikánsan a sejttesteken megfigyelt értéktől ( $P = 0,97$ , páratlan t-próba), de magasabb volt a háttérnél ( $P < 0,01$  OWA,  $P < 0,01$  Dunnett próba;  $n = 3$  patkány).

A  $K_v2.1$  alegység sűrűsége a középső és disztális SR-ban található apikális dendriteken, az SLM dendritbojtjain, járulékos dendriteken, dendritikus tüskéken és axonvégződéseiben nem volt szignifikánsan magasabb a nem specifikus háttér jelölésnél ( $P < 0,001$  OWA,  $P > 0,26$  Dunnett próba;  $n = 3$  patkány).

#### ***4.3. Feszültségfüggő $Ca^{2+}$ csatornák célsejtfüggő lokalizálása CA3 piramissejtek axonvégződéseiben***

A következőkben teszteltem azt a hipotézist, miszerint az aktív zónán belüli eltérő  $Ca_v$  csatorna sűrűség áll a szinapszisokban megfigyelhető különböző glutamát felszabadulási valószínűség háttérében. Kísérleteimben a CA3 régió piramissejtjeinek SO-ben elhelyezkedő axonvégződéseit vizsgáltam, amelyek gyorsüzelő  $PV^+$  gátlósejtekre magas kezdeti felszabadulási valószínűségű, rövidtávon depressziót

mutató szinapszisokat adnak. Ezzel szemben, ugyanazon axon egy másik végződése, alacsony kezdeti felszabadulási valószínűséget és rövidtávon facilitációt mutat, ha a posztszinaptikus sejt  $mGlu_{1a}$ -t és szomatosztatint fejez ki. Ezeknek a kapcsolatoknak a funkcionális jellemzését a laborunkban Éltes T. és Holderith N. végezte el. Ahhoz, hogy kvalitatívan összehasonlítsam a  $Ca_v$  csatorna alegységek sűrűségét a két gátlósejt típusra menő aktív zónákban, a „tükör replika” módszerét alkalmaztam. Ez azt jelenti, hogy a kettőtört membrán mindkét egymást kiegészítő felszínén végeztem immunjelölést. Az egyik replikán a  $K_v3.1b$  és az  $mGlu_{1a}$  jelölésével azonosítottam az gátlósejt dendritek típusát, mivel ezek morfológia alapján nem beazonosíthatóak. A tükör replikán pedig  $Ca_v$  csatorna alegységeket jelöltem, és minden struktúrát mindkét replikán beazonosítottam. Az  $mGlu_{1a}$  receptor transzmembrán fehérje, amely hippokampális gátlósejtek szomato-dendritikus kompartmentjeiben van jelen és ellene specifikus ellenanyagok elérhetőek. A PV egy citoplazmatikus fehérje, amelyet az SDS-FRL-el nem lehet detektálni. Így a gyorstüzelő  $PV^+$  gátlósejteket a szomato-dendritikus kompartmentükben kifejeződő  $K_v3.1b$  alegység alapján azonosítottam. Ezekre a jelölt dendritekre számos axonvégződés EF membrán részletei vannak tapadva. Azonban a  $Ca_v$  csatorna alegységeket felismerő ellenanyagok citoplazmatikus epitópot ismernek fel, így a tükör replikán lehet ezeket a fehérjéket jelölni. Mivel ezekben axonvégzésekben a glutamát felszabadulás  $Ca_v2.1$  vagy  $Ca_v2.2$  alegységet tartalmazó csatornák kontrolja alatt áll, mindkét alegységet kvantifikáltam. A nyúlban termeltetett anti- $Ca_v2.1$  ellenanyag azonos jelölést adott, mint a tengerimalacban termeltetett anti- $Ca_v2.1$ , amelynek specificitását  $Ca_v2.1^{-/-}$  egérből származó szöveten korábban tesztelték. A  $Ca_v2.2$  immunjelölés specificitását  $Ca_v2.2^{+/+}$ , illetve  $Ca_v2.2^{-/-}$  egérből származó replikákon bizonyítottam.

Patkányban az azonosított dendritekre tapadt PF-ek gyakran tartalmaztak  $Ca_v2.1$  alegység elleni jelölést, amely

IMP-k klasztereződése által jelzett aktív zónákban volt jelen. Az aktív zónákban az arany szemcsék normalizált sűrűsége nagyobb volt, mint a háttér ( $P < 0,0001$  Kruskal–Wallis próba (KW),  $P < 0,0001$  *post hoc* Mann-Whitney  $U$  próba (MW) Bonferroni korrekcióval), míg az axonvégződés extraszinaptikus membránterületein mért sűrűség hasonló volt a háttérhez ( $P < 0,0001$  KW,  $P > 0,05$  *post hoc* MW Bonferroni korrekcióval). Ezeket a méréseket öt állatban végeztem el, és összesen 112  $K_v3.1b^+$ , illetve 172  $mGlu_{1a}^+$  sejtre menő aktív zónát analizáltam a CA3 régió SO-ben. A két szinapszis populáció összehasonlítása megmutatta, hogy a  $K_v3.1b^+$  sejtekre menő aktív zónákban 1,15-ször nagyobb a  $Ca_v2.1$  alegység sűrűsége, mint az  $mGlu_{1a}^+$  dendritekre menő aktív zónákban. ( $P < 0,0001$  KW,  $P < 0,001$  *post hoc* MW Bonferroni korrekcióval; lásd 2. táblázat a nem normalizált arany szemcsé sűrűségeikért). A  $K_v3.1b^+$  ( $n = 52$ ) és  $mGlu_{1a}^+$  ( $n = 114$ ) gátlósejtekre tapadt PF-ek ugyancsak tartalmaztak  $Ca_v2.2$  alegység elleni jelölést. Az arany szemcsék szintén az aktív zónában helyezkedtek el, ahol sűrűségük szignifikánsan nagyobb volt, mint a háttér esetén ( $P < 0,0001$  KW,  $P < 0,0001$  *post hoc* MW Bonferroni korrekcióval). A  $Ca_v2.2$  alegység sűrűsége 1,20-szor volt magasabb a  $K_v3.1b^+$  sejtekre menő aktív zónákban, mint amikor  $mGlu_{1a}^+$  sejt volt a posztzinaptikus partner. Ez a különbség azonban nem érte el a szignifikancia küszöböt ( $P < 0,0001$  KW,  $P > 0,02$  *post hoc* MW Bonferroni korrekcióval; lásd 2. táblázat a nem normalizált arany szemcsé sűrűségeikért).

Végül megvizsgáltam, hogy a  $Ca_v$  alegységek eloszlása véletlenszerű-e vagy sem az aktív zónákban. Ehhez 43  $K_v3.1b^+$  és 72  $mGlu_{1a}^+$  sejtre menő (teljes egész) szinapszisban kiszámoltam az  $\overline{NND}$  és a  $\overline{g(r)}$  értékeket és összehasonlítottam azokat random eloszlásokból kapott értékekkel (lásd Módszerek). Mindkét mérés azt mutatta, hogy a kísérleti adat szignifikánsan eltér a random kontroloktól ( $P < 0,0001$  WP). Hasonló eredményt kaptam  $Ca_v2.2$  alegységre 21 ( $K_v3.1b$ ), illetve 40 ( $mGlu_{1a}$ ) aktív zónában ( $P < 0,0001$  WP). Mindkét

$Ca_v$  alegység esetén a random eloszlásokhoz képest kisebb  $\overline{NND}$  és a nagyobb  $\overline{g(r)}$  értékek azt mutatják, hogy az arany szemcsék inhomogéne helyezkednek el  $K_v3.1b^+$  és  $mGlu_{1a}^+$  sejtre menő aktív zónákban.

**2. Táblázat. A  $Ca_v$  immunreakciók tulajdonságai  $K_v3.1b^+$  és  $mGlu_{1a}^+$  sejtre menő axonvégződéseken.** Az arany szemcse sűrűség értékeket 5 ( $Ca_v2.1$ ), illetve 4 ( $Ca_v2.2$ ) patkányból származó medián értékből számoltam. Az NND mérésekhez csakis teljes egészükben meglévő aktív zónákat használtam fel.

	$K_v3.1b^+$ sejtre menő axonvégzödések				$mGlu_{1a}^+$ sejtre menő axonvégzödések			
	Átlag	SD	Medián	n	Átlag	SD	Medián	n
$Ca_v2.1$ alegység sűrűsége az aktív zónában ( $arany/\mu m^2$ )	373	47	370	112	321	46	325	172
$Ca_v2.2$ alegység sűrűsége az aktív zónában ( $arany/\mu m^2$ )	151	30	139	52	130	39	130	114
$Ca_v2.1$ alegység sűrűsége extraszinaptikus membránokon ( $arany/\mu m^2$ )	2,14	2,46	2,21	93	2,88	2,64	2,23	174
$Ca_v2.2$ alegység sűrűsége extraszinaptikus membránokon ( $arany/\mu m^2$ )	2,69	3,15	2,35	48	1,02	1,26	0,75	113
$Ca_v2.1$ alegység háttér sűrűsége ( $arany/\mu m^2$ )	2,27	1,93	2,94	132	2,27	1,93	2,94	132
$Ca_v2.2$ alegység háttér sűrűsége ( $arany/\mu m^2$ )	0,66	0,33	0,62	104	0,66	0,33	0,62	104
$Ca_v2.1$ NND távolság (nm)	24,7	4,0	23,3	43	24,3	4,6	23,1	72
$Ca_v2.2$ NND távolság (nm)	32,1	7,2	30,3	21	32,0	8,3	28,7	40

#### **4.4. Feszültségfüggő $Ca^{2+}$ csatornák bemenetfüggő lokalizálása CA3 piramis sejtekre menő kosárcsejt axonvégzödéseken**

Végül megvizsgáltam a  $Ca_v$  csatornák eloszlását CA3 piramis sejtek sejttestére szinapszist adó gátlósejt axonvégzödéseken. A piramis sejtek szomatikus régiója csakis kizárólag PV vagy CCK/CB<sub>1</sub> tartalmú sejtektől kap bemenetet. Korábbi alegység-specifikus  $Ca_v$  csatorna blokkolókkal végzett kísérletek azt mutatták, hogy CCK/CB<sub>1</sub><sup>+</sup> axonvégzödéseken az N-típusú ( $Ca_v2.2$ ), míg PV<sup>+</sup> axonvégzödéseken P/Q-típusú ( $Ca_v2.1$ ) csatornák felelősek a GABA felszabadulásért. Azonban nem létezik még anatómiai bizonyíték ennek a feltevésnek a



megerősítésére. Ezért kísérleteimben a  $Ca_v2.1$  és  $Ca_v2.2$  alegységeket lokalizáltam SDS-FRL segítségével felnőtt patkány CA3 piramissejtek sejttestére menő axonvégződésekből. Mivel ellenanyagaim citoplazmatikus epitópot ismertek fel a célfehérjéken, ezért EF sejttest membránhoz tapadt PF axonvégződés részleteket vizsgáltam. A két axonvégződés típust elkülönítéséhez a  $CB_1$  jelölést használtam: azokat az axonvégződéseket, amelyek tartalmaztak  $CB_1$  jelölést CCK tartalmúként, míg a jelölés nélkülieket  $PV^+$ -ként azonosítottam. Ezt úgy bizonyítottam, hogy  $CB_1$  és VGAT elleni kettős jelölésben megmutattam, hogy az EF szomához tapadt PF axonvégzések PF részletei két csoportra oszlanak: a kettős jelölést, illetve a csak VGAT jelölést (feltehetőleg  $PV^+$ ) tartalmazó axonvégzések csoportjára. A  $CB_1$  immunjelölés specificitását  $CB_1^{+/+}$  és  $CB_1^{-/-}$  egerekből származó replikákon bizonyítottam.

A  $CB_1$  és  $Ca_v2.2$  alegység elleni kettős reakciók vizsgálata során, azt találtam, hogy az EF szomához tapadt  $CB_1$  immunopozitív PF axonvégzések tartalmazták a  $Ca_v2.2$  alegységet, de a  $Ca_v2.2^+$  struktúrák szinte kizárólagosan (94%-ban)  $CB_1^+$  voltak. A  $CB_1$  és  $Ca_v2.1$  alegység kettős reakciókban a  $CB_1^+$  PF axonvégzések ritkán (5%-ban) tartalmaztak  $Ca_v2.1$  alegységet jelölő aranyzemcséket. Végül a  $Ca_v2.1$  és  $Ca_v2.2$  együttes jelölése megerősítette ezen alegységek szegregációját piramisajt sejttestre menő axonvégzések membránrészletein: az axonvégzések 89%-a vagy csak a  $Ca_v2.1$  vagy pedig a  $Ca_v2.2$  alegységet tartalmazta. Összességében ezek a kísérletek anatómiai bizonyítékot szolgáltatnak a  $Ca_v2.1$  és  $Ca_v2.2$  alegységek kizárólagos szerepére  $PV^+$  and  $CCK^+$  kosársejtek axonvégzéseiben. Fontos kiemelni, hogy ez a szegregáció egérben is megfigyelhető volt (az EF sejttesthez tapadt PF membránok 92%-a vagy csak  $Ca_v2.1$  vagy csak  $Ca_v2.2$  jelölést tartalmazott), ahol a  $Ca_v$  ellenanyagok specificitásának validálása történt.

Megfigyelhető volt, hogy a  $Ca_v2.1$  és  $Ca_v2.2$  alegységeket jelölő arany szemcsék az axonvégzések egy kisebb részére sűrűsödtek be, amely terület az aktív zónának felelhet meg. Azonban ellentétben serkentő szinapszisokkal, ahol az aktív zóna helyét az IMP-k nagy sűrűsége is jelzi, itt nem volt megfigyelhető ilyen morfológiai jel. Ez azt vonja maga után, hogy ezekben az axonvégzésekben az aktív zóna csakis molekuláris markerek immunjelölésével azonosítható. Ezért immunjelöltem a Rim1/2 fehérjét, amely jelen van serkentő és gátló axonvégzések aktív zónájában. Eredményeim megmutatták, hogy a szomatikus EF-re tört membrán PF-ek 32%-a tartalmaz aktív zónát ( $n = 1$  patkány; ez az arány 24% volt egérben); minden esetben az IMP-k besűrűsödése nélkül. Továbbá a Rim1/2 immunjelölt aktív zónák nagy variabilitást mutattak méretben, alakban és számban, hasonlóan a  $Ca_v2.2$  tartalmú területekhez. Ezek a tulajdonságok megegyeznek Holderith N. 3D elektronmikroszkópos rekonstrukciós kísérleteiből származó  $CCK^+$  periszomatikus aktív zónák sajátosságaival. Ugyanakkor  $Ca_v2.1$  és  $Ca_v2.2$  kettős immunjelölési kísérletekben a jelölt profilok százaléka nagyon hasonló volt a Rim1/2 jelölés esetén találhatóhoz (43% patkányban és 20% egérben), megerősítve azt a hipotézist, hogy a  $Ca_v$  csatornák az aktív zónán belül helyezkednek el.

A Rim1/2 marker fehérje és  $CB_1$  együttes jelölésekor ugyancsak megfigyelhető volt a két fehérje kolokalizációja, ami arra enged következtetni, hogy a  $CB_1$  jelen van preszinaptikus aktív zónákban. Az immunreakciókban az is megfigyelhető volt, hogy a Rim1/2 jelölt aktív zónák különböző mennyiségben tartalmazták a  $CB_1$ -t: voltak erősen immunjelöltek, és olyanok is amelyek kisebb mennyiségben vagy nem tartalmazták ezt a receptort.

## 5. Következtetések

Disszertációm első két részében feltártam két funkcionálisan eltérő  $K^+$  csatorna alegység egyedi sejtfelszíni eloszlási mintázatát CA1 piramissejtekben. Megmutattam, hogy a  $K_v1.1$  alegység jelen van CA1 piramissejtek axon iniciális szegmentumában és ahhoz viszonyítva nyolcszor kisebb sűrűségben axonvégződéseken. Ezzel szemben, a  $K_v2.1$  alegység hasonló sűrűségben található meg CA1 piramissejtek sejttestén, proximális apikális dendritjein és axon iniciális szegmentumiban. Ez az alegység inhomogén eloszlást mutat, de a fellelhető  $K_v2.1$  klaszterek nem fednek át gátló szinapszisokkal. Továbbá leírtam, hogy  $K_v1.1/Na_v1.6$  és  $K_v2.1$  alegységek az axon iniciális szegmentumban szegregálódnak, azt mutatva, hogy az axon iniciális szegmentum molekuláris összetétele a korábban vártnál összetettebb. Ezek az eredmények arra utalnak, a különböző  $K^+$  csatornák kompartmentfüggő módon képesek szabályozni az idegsejtek ingerelhetőségét.

Ezt követően kimutattam, hogy mind a  $Ca_v2.1$  (P/Q-típusú), mind pedig a  $Ca_v2.2$  (N-típusú)  $Ca^{2+}$  csatorna alegységek jelen vannak CA3 piramissejtek funkcionálisan különböző,  $K_v3.1b^+$  illetve  $mGlu_{1a}^+$  sejtekre menő axonvégződéseiben. Mindkét populációban, a  $Ca_v$  alegységek az aktív zónában helyezkednek el, és eloszlásuk nem véletlenszerű. Továbbá, a  $K_v3.1b^+$  sejteket beidegző, magas felszabadulási valószínűséggel rendelkező axonvégzések aktív zónájában az SDS-FRL ~15%-al nagyobb  $Ca^{2+}$  csatorna sűrűséget detektált, mint az  $mGlu_{1a}^+$  dendritekre menő alacsony felszabadulási valószínűséggel rendelkező aktív zónákban. Ez a különbség jóval kisebb, mint az Éltes T. és Holderith N. funkcionális kísérletei által perdiktált kétszeres eltérés. Összességében eredményeink arra utalnak, hogy a két axon végződés között levő funkcionális különbségek háttérben vagy a csatornák funkciójának céljsetfüggő modulálása vagy pedig eltérő alegység összetétele áll.

Végül leírtam, hogy a CA3 piramisisejtek sejttestére szinapszist adó CCK/CB<sub>1</sub><sup>+</sup> kosársejtek axon végződéseiben a Ca<sub>v</sub>2.2 alegység, míg PV<sup>+</sup> kosársejtekében a Ca<sub>v</sub>2.1 van jelen. Továbbá, mindkét alegység az aktív zónában fordul elő, arra utalva, hogy ezen axon végződés típusok közötti szinaptikus transzmisszióban felellhető különbségekért az aktív zónán belüli Ca<sup>2+</sup> csatorna elrendeződésében előforduló apró, de fontos különbségek lehetnek felelősek. Ugyancsak megfigyeltem, hogy a CB<sub>1</sub><sup>+</sup> kosársejtek aktív zónái tartalmazzák a CB<sub>1</sub>-et változó mennyiségben nanométerekre az ők célmolekulájuktól, a Ca<sub>v</sub>2.2 alegységtől, ami az endokannabinoid-mediálta GABA felszabadulás modulációjában fellelhető heterogenitás alapja lehet.

Összességében, kísérleteimmel feltártam két funkcionálisan eltérő K<sup>+</sup> csatorna alegység egyedi sejtfelszíni eloszlási mintázatát, illetve bemenet- és célsejtfüggő különbségeket tártam fel a Ca<sup>2+</sup> csatornák eloszlásában. Ezen eredmények hozzájárulnak az ioncsatornák eloszlásának megértéséhez, illetve az eltérő eloszlási mintázatok funkcionális következményeinek feltárásához.

## 6. Saját publikációk jegyzéke

1. **Kirizs T**, Kerti-Szigeti K, Lorincz A, Nusser Z. (2014) Distinct axo-somato-dendritic distributions of three potassium channels in CA1 hippocampal pyramidal cells. *Eur J Neurosci*, 39: 1771–1783.
2. Lenkey N, **Kirizs T**, Holderith N, Máté Z, Szabó G, Vizi ESz, Hájos N, Nusser Z. (2015) Tonic endocannabinoid-mediated modulation of GABA release is independent of the CB1 content of axon terminals. *Nat Commun*, 6: 6557.
3. Éltés T<sup>1</sup>, **Kirizs T**<sup>1</sup>, Nusser Z, Holderith N. (2017) Target cell type-dependent differences in Ca(2+) channel function underlie distinct release probabilities at hippocampal glutamatergic terminals. *J Neurosci*, 37: 1910–1924.

<sup>1</sup> = egyenlő hozzájárulás