

Molekuláris jelátviteli útvonalak a fejlődő idegsejthálózatok GABAerg és glutamáterg szinapszisaiban

Doktori értekezés

Dr. Cserép Csaba

Semmelweis Egyetem
Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Nyiri Gábor, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. habil L. Kiss Anna, D.Sc., egyetemi docens
Dr. Kisvárday Zoltán, D.Sc., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Csillag András, D.Sc., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Dobolyi Árpád, Ph.D., tud. főmunkatárs
Dr. Rácz Bence, Ph.D., egyetemi docens

Budapest, 2013
MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet

Édesanyám, Cserépné Bendik Ildikó emlékére

"Az emberiség figyelmének el kell fordulnia a gépektől és az élettelen anyag világtól, s az ember lelkére kell irányulnia, azokra a szerves és szellemi folyamatokra, amelyek megteremtették a gépeket s Newton és Einstein világegyetemét." – Alexis Carrel

"Az ember anatómiájának s fiziológiájának alapos ismerete nem vezet a materializmus lejtőjére s egy felsőbb, megfoghatatlan erő létezését nem zárja ki; ellenkezőleg: tudásunk és képességeink korlátolt voltának beismerésére kényszerít." – Lenhossék Mihály

I.TARTALOMJEGYZÉK

I. Tartalomjegyzék.....	4
II. Rövidítések jegyzéke.....	7
III. Előszó.....	9
IV. Bevezetés.....	11
IV.1. Az agy fejlődése – általános áttekintés, a „GABA-váltás”, hálózati aktivitásminták kialakulása.....	11
IV.1.1. Az agy, azon belül a hippocampusz fejlődésének rövid összefoglalása.....	11
IV.1.2. A szinaptikus bementek kialakulása, a „GABA-váltás”, a depolarizáló GABAerg jelátvitel fontossága a neuronális fejlődésben.....	16
IV.1.3. Az agyi aktivitásmintázatok fejlődése, az első szinaptikus szinkron hálózati aktivitás és szerepe.....	23
IV.2. Az NMDA receptorok szerepe a neuronális hálózatok fejlődése során.....	28
IV.2.1. Az NMDA receptorokról általában.....	28
IV.2.2. Az NMDAR-k szerepe a fejlődésben.....	31
IV.2.3. Jelen ismereteink az NMDAR-k elhelyezkedéséről a fejlődő agyban.....	34
IV.3. Az NO-jelátviteli útvonal szerepe a neuronális hálózatok fejlődése során.....	35
IV.3.1. Az NO-jelátviteli útvonalról általában.....	35
IV.3.2. Az NO-jelátviteli útvonal szerepe a fejlődésben.....	38
IV.3.3. Jelen ismereteink az NO-jelátviteli útvonal elemeinek elhelyezkedéséről a fejlődő agyban.....	39
IV.4. A posztnatális hippocampusz.....	40
IV.4.1. A hippocampusz felépítése.....	40
IV.4.2. A hippocampusz felépítése a korai posztnatális periódusban.....	42
V. Célkitűzések.....	45
VI. Módszerek.....	47
VI.1. Etikai állásfoglalás.....	47

VI.2. Vizsgálati időszak kiválasztása.....	47
VI.3. Állatok kezelése, szövetek előkészítése az anatómiai kísérletekhez.....	47
VI.4. Fiziológiai szeletek készítése.....	48
VI.5. Antitestek.....	49
VI.6. Immunfluoreszcens jelölés és konfokális lézer-pásztázó mikroszkópia.....	54
VI.7. Beágyazás előtti immun-elektronmikroszkópia.....	55
VI.8. Beágyazás utáni immun-elektronmikroszkópia.....	58
VI.9. In vitro elektrofiziológia.....	59
VI.10. Multineuron kalcium képalkotás.....	60
VI.11. Drogok.....	61
VI.12. Analízis.....	61
VII. Eredmények.....	63
VII.1. NMDA-receptorok vizsgálata a posztantális agyban.....	63
VII.1.1. Konfokális mikroszkópia alapján mind a glutamáterg, mind pedig a GABAerg szinapszisok rendelkeznek NMDA-receptorokkal a fejlődés során.....	63
VII.1.2. Beágyazás előtti immun-elektronmikroszkópia igazolja az NMDA receptorok három alegységének posztszinaptikus jelenlétét mind a glutamáterg, mind pedig a GABAerg szinapszisokban a fejlődés során.....	65
VII.1.3. A kvantitatív beágyazás utáni immunarany módszer eredményei alapján kicsi a különbség a glutamáterg illetve a GABAerg szinapszisokban található NMDA receptorok számában.....	68
VII.2. A NO rendszer vizsgálata a posztnatális agyban.....	72
VII.2.1. Az nNOS a glutamáterg és a GABAerg szinapszisokban is jelen van posztszinaptikusan a fejlődés során.....	72
VII.2.2. A nitrogén-monoxid receptorának mind α 1-es, mind pedig β 1-es alegysége kimutatható a GABAerg végkészülékekben a fejlődés alatt.....	74
VII.2.3. Az NO-receptor aktiválása cGMP termeléshez vezet a GABAerg végkészülékekben a fejlődés során.....	75
VII.2.4. A nitrogén-monoxid NOsGC-függő módon csökkenti a GABAerg posztszinaptikus áramokat a fejlődés alatt.....	78

VII.2.5. A nitrogén-monoxid NOsGC-függő módon csökkenti a glutamáterg posztzinaptikus áramokat a fejlődés alatt.....	80
VII.2.6. A nitrogén-monoxid jelátviteli rendszer befolyásolása hatással van a fejlődő hippocampusz szinkron hálózati aktivitására.....	82
VIII. Megbeszélés.....	85
VIII.1. „A fejlődő agy nem egy kicsi felnőtt agy”.....	85
VIII.2. Szinaptikus transzmisszió, szinkron aktivitás és a GABA-NMDA együttműködés szerepe a neuronális hálózatok kialakulásában.....	86
VIII.3. Retrográd jelátvitel a fejlődő agy szinapszisaiban.....	89
VIII.4. A posztzinaptikus fehérjeszerkezethez való lehetséges kapcsolódási pontok.....	93
VIII.5. A molekuláris jelátviteli útvonalak ligandjainak lehetséges forrásai.....	96
IX. Következtetések.....	99
X. Összefoglalás/Summary.....	101
XI. Irodalomjegyzék.....	103
XII. Saját közlemények jegyzéke.....	129
XIII. Köszönetnyilvánítás.....	130

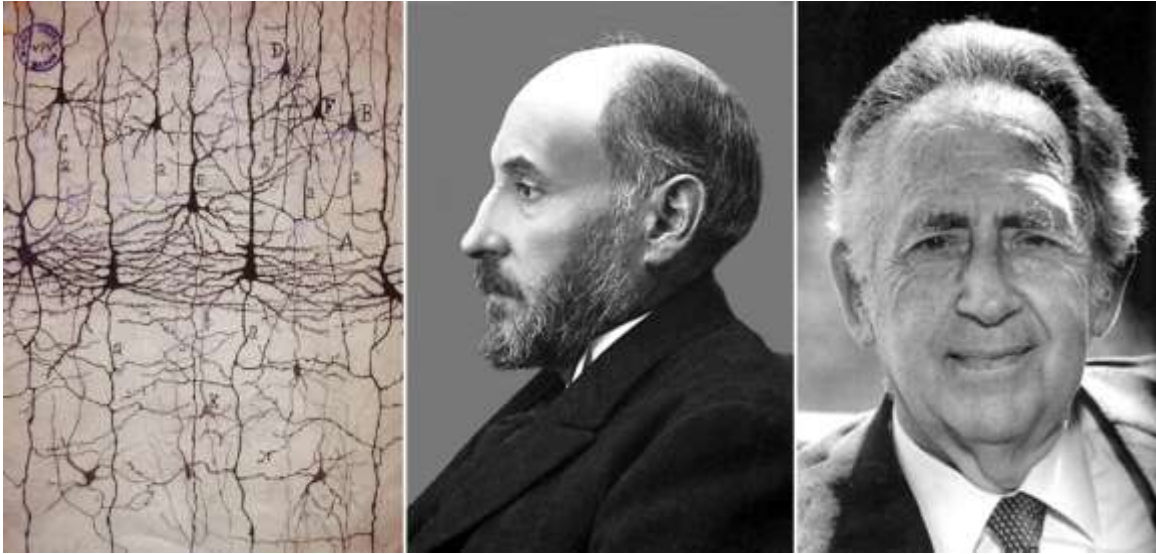
II. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ABC	avidin-biotin komplex
ACSF	mesterséges agy-gerincvelői folyadék
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazol-propánsav
Br-cGMP	8-bróm-ciklikus guanozin-monofoszfát
CA1-3	cornu ammonis (ammon-szarv) 1-3-as régiója
cGMP	ciklikus guanozin-monofoszfát
CNG	ciklikus nukleotid-gátolt csatorna
CT-domén	C-terminális domén
DAB	3,3-diaminobenzidin
EDRF	endothelium-derived relaxing factor
GABA	γ -amino-vajsav
GABA _A R	A-típusú GABA-receptor
GABA _A R-PSC	GABA _A R-függő posztszinaptikus áram
GABA _B R	B-típusú GABA-receptor
GAD	glutaminsav-dekarboxiláz
GD	gyrus dentatus
GDP	óriás depolarizáló potenciál
GluN	NMDA-típusú glutamát-receptor alegysége
GluR-PSC	glutamát-receptor-függő posztszinaptikus áram
GRIP1	glutamate-receptor interacting protein 1
GTP	guanozin-trifoszfát
HSA	humán szérumalbumin
IBMX	3-izobutil-1-metilxantint
iGluR	ionotróp glutamát-receptor
KCC2	klorid-kálium-kotranszporter
KL	kérgi lemez
KO	génkiütött állat
LGD	laterális gangliondomb
LK-domén	ligandkötő domén
L-NAME	N-omega-nitro-L-arginin-metil-észter-hidroklorid

LTP	hosszútávú potencírozódás (long term potentiation)
MGD	mediális gangliondomb
mGluR	metabotróp glutamátreceptor
mRNS	hírvivő (messenger) ribonukleinsav
NKCC1	nátrium-kálium-klorid-kotranszporter
NMDA	N-metil-D-aszpartát
NMDAR	N-metil-D-aszpartát-típusú glutamátreceptor
nNOS	neuronális nitrogén-monoxid szintáz
NO	nitrogén-monoxid
NOsGC	nitrogén-monoxid szenzitív guanilát cikláz
NT-domén	N-terminális domén
ODQ	oxadiazolo-quinoxalin-one
PB	foszfát-puffer
PDE	foszfodieszteráz
PKG	protein-kináz-G
PSC	posztzinaptikus áram
PSD	posztzinaptikus denzitás
ROI	vizsgálni kívánt terület (region of interest)
SE	szinkron esemény
SNP	nátrium-nitroprusszid
SPA	spontán plató aktivitás
SPW	éles-hullám aktivitás
SSA	spontán szinkron aktivitás
SSCAM	synaptic scaffolding molecule
TB	tris-puffer
TBS	tris-pufferelt sóoldat
TM-domén	transzmembrán domén
vGAT	vezikuláris GABA-transzporter
vGluT	vezikuláris glutamát-tarnszporter
VZ	ventrikuláris zóna
WMP-próba	Wilcoxon matched pairs test

III. ELŐSZÓ

Az emberi agy az anyagi világ legösszetettebb és legmagasabb szintű szerkezete, az emberi észlelés, a tudat, a lélek és a szellem anyagi szubsztrátuma. Minden emberi érzelemhez, érzéshez, gondolathoz, és döntéshez szükséges az emberi agy. A leghétköznapibbnak tűnő feladataink elvégzését folyamatos információfeldolgozással biztosítja, nem beszélve a kiemelkedő emberi teljesítmények létrejöttében betöltött szerepéről (pl.: művészeti alkotások, tudományos felfedezések, élsportolók teljesítménye). Nincs a világon olyan természetes vagy mesterséges szerkezet, mely felérhetne az agyhoz, akár annak hihetetlen hatékonyságát, akár az új helyzetekhez és feladatokhoz való alkalmazkodását tekintjük. Nincsen más olyan struktúra, mely képes lenne ilyen magas hatásfokkal új információkat és képességeket szerezni, megérteni más élőlények cselekedeteit, nyelveken keresztül kommunikálni, vagy megkísérelni önmaga megismerését. Ezen hihetetlen teljesítmény háttérében egy szinte felfoghatatlanul bonyolult szerkezet áll: az emberi agyat a mérések szerint közel 100 milliárd (10^{11}) idegsejt, és ugyanennyi gliasejt építi fel (Azevedo és mtsai 2009), míg csak az agykéregben több, mint 160 billió (1.6×10^{14}) a szinapszisok száma (Tang és mtsai 2001). A neuron doktrína megalkotása, Ramón y Cayal (1. ábra, bal oldali és középső panel) kora óta az idegtudomány mind nagyobb és nagyobb erőfeszítéseket tesz azért, hogy jobban beleláthasson az emberi agy felépítésébe, működésébe. Pontosan ugyanennyire érdekes és fontos kérdés azonban az is, vajon milyen folyamatok, szabályozó és vezérlő rendszerek teszik lehetővé, hogy az egyedfejlődés során egyetlen vékony sejtrétegből kialakulhasson egy annyira összetett és magas szintű funkciókat ellátó szerv, mint az agy. Értekezésemben az agy posztnatális fejlődésében alapvető szerepet játszó jelátviteli mechanizmusok vizsgálata során elért eredményeinket foglalom össze. Mielőtt azonban rátérnék a részletes bevezetésre, szükségesnek érzem, hogy legalább egy mondattal fejet hajtsak Szentágothai János (1912-1994) nagysága előtt, aki megteremtett egy olyan neurobiológiai iskolát, mely mind a mai napig a világ élvonalában tartja a magyar idegtudományt. (1. ábra, jobb panel) "Az anatómia számomra nem csupán minden orvosi gondolkodás és cselekvés elidegeníthetetlen alapja, hanem az anyag és a lét örök szépségének és harmóniájának egyik legmagasabb rendű megnyilvánulása" - Szentágothai 1971.



1.ábra. Piramissejtek, Santiago Ramón y Cajal és Szentágothai János

Cajal rajza kortikális piramissejteket ábrázol. (Cajal Múzeum, Cajal Intézet, Madrid, Spanyolország). Santiago Ramón y Cajal (1852 – 1934) spanyol anatómus, munkásságával nagy mértékben hozzájárult a neuron doktrína és a modern neurobiológia kialakulásához. Szentágothai János (1912 – 1994) kimagasló anatómus, a magyar idegtudományt a világ élvonalába emelő iskolát teremtett.

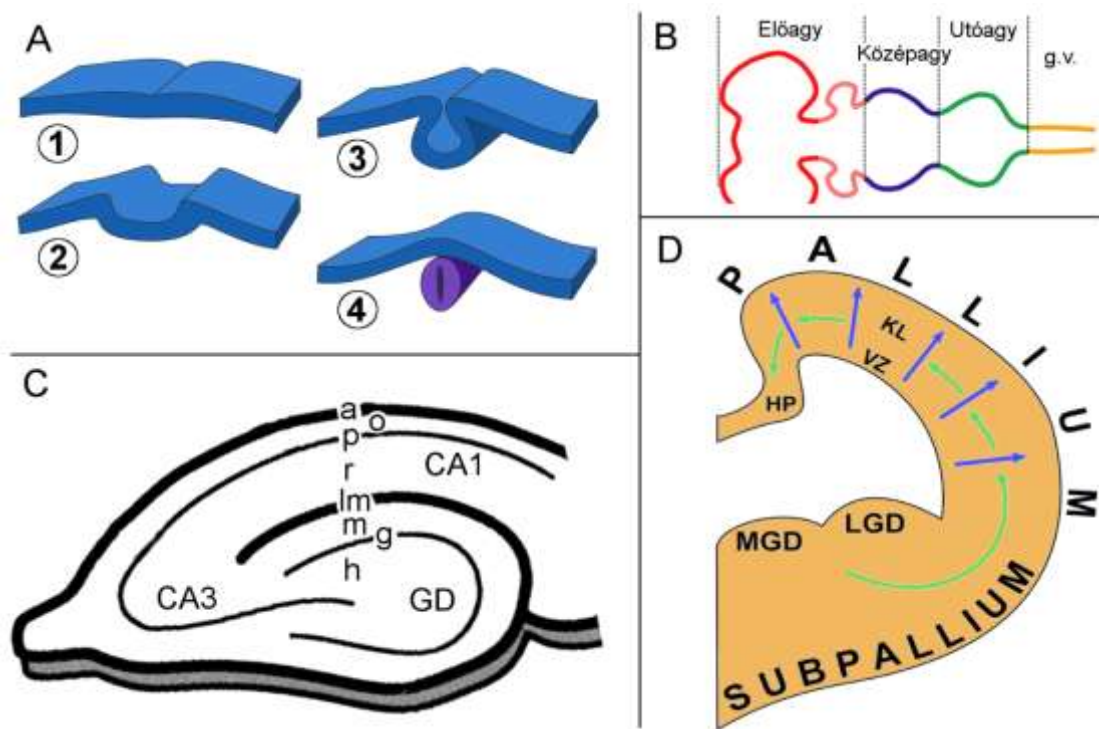
IV. BEVEZETÉS

IV.1. Az agy fejlődése – általános áttekintés, a „GABA-váltás”, hálózati aktivitásminták kialakulása

IV.1.1. Az agy, azon belül a hippokampusz fejlődésének rövid összefoglalása

Az emlős agy egyedfejlődése egymást időben követő, egymást meghatározó események sorozata, melyek során egy egyszerű, néhány sejtből álló szövetsomóból kifejlődik a létező legmagasabb szintű és legösszetettebb anyagi struktúra. Ezen események szabályozása, egymáshoz képest meghatározott időbeli viszonya, egymásra hatása erőteljes hasonlóságot mutat különböző emlős fajok között, azaz a törzsfajlás során nagyon magas fokon megőrződött. Ennek az egyik legerőteljesebb bizonyítéka, hogy a központi idegrendszer egyedfejlődése során lejátszódó események – bár fajról fajra eltérő időpontban következnek be – egymáshoz viszonyított szigorú időbeliségük miatt elhelyezhetők olyan általános modellekben, melyekben az egyes időszakok pontosan megfeleltethetők egymásnak különböző fajok között (Clancy és mtsai 2007; Workman és mtsai 2013). Az agy fejlődése tehát – eltekintve a nyilvánvaló, egyes fajokra jellemző egyedi eltérésektől – egy fajokon átívelő általános sémát követ, melynek során több egymást követő, de időben sokszor átfedő, aktivitásfüggő részfeladatot kell megoldania a fejlődő rendszernek. Először létre kell jönnie a megfelelő számú sejtnek, azoknak a sejt-vándorlás során el kell jutniuk rendeltetési helyükre, ott ki kell alakítaniuk a feladatuk ellátásához szükséges bonyolult térbeli formájukat, és a szinaptogenezis folyamata során létre kell hozniuk a rájuk jellemző szinaptikus kapcsolatrendszert. Mindezen események szabályozása nagyon sokrétű, az örökítőanyagban rögzített program és a külvilág felől érkező információ hatása egymást kiegészítve, támogatva teszi lehetővé zavartalan végbemenetelüket. Először a központi idegrendszer általános fejlődését fogom röviden összefoglalni, majd a hippokampusz kialakulását tekintem át. Mivel – amint feljebb említettem – a fejlődés általános sémája megőrzött a fajok között, az agy fejlődésének leírása során az egyes események egérrre jellemző időpontjait adom meg, a humánra jellemző időpontokat csak a dolgozat szempontjából kiemelten fontos történések esetében említem meg.

A megtermékenyítést (0. nap) követő sejtosztódások során a 2-4. napon megtörténik a zigóta barázdálódása, majd a 4. napon a sejtcsomó belsejében üreg képződik, kialakul a blasztociszta (Brison és Schultz, 1997; Yamanaka és mtsai 2006). A blasztociszta belsejében egy sejtcsoport elkülönül, ez adja a belső sejtömeget (embrioblast), míg a hólyag fala lesz az ún. külső sejtömeg (trophoblast). Az ötödik napra a belső sejtömegeből kialakul a kétrétegű embriópajzs, mely epi- és hypoblasztok rétegéből áll. Az epiblasztsejtek a hetedik napon – emberben a harmadik héten – egy primitív csíknak nevezett befűződésen keresztül az epiblaszt-réteg alá fordulnak, és kialakul a háromrétegű embriópajzs (Sadler, 2005). A gasztrulációnak nevezett folyamat során tehát létrejön az embrió három csírarétege: az ekto-, a mezo- és az endoderma. Az idegrendszer szinte teljes egészében az ektoderma származéka, mely alól a mesodermális eredetű mikroglia sejtek kivételek (Ginhoux és mtsai 2013). Egérben a 7-8. napon, emberben a 18. napon indul meg a neuruláció az ún. velőlemez megjelenésével (Downs és Davies, 1993; Jacobson és Tam, 1982; Sadler, 1999a). A velőlemez az ektoderma cipőkanál alakú megvastagodása, mely két szélének erőteljes kiemelkedésével létrehozza a velőredőket. A velőredők kialakulása összetett módon szabályozott folyamat, melynek molekuláris hátterét kiválóan foglalja össze Stuhlmiller (Stuhlmiller, 2012). A velőredők középvonalban egymás felé fordulva összenőnek, kialakítva a velőcsövet (2. ábra, A). A velőcső folyamatosan záródik mind feji, mind pedig farki irányban haladva. A feji végen a 8-9. napon, a farki végen pedig a 10-11. napon záródik véglegesen – ezek időpontja emberben a 25. illetve a 27. napra esik (Ybot-Gonzalez és mtsai 2007). A velőcső feji végén három tágulat jelentkezik, ezek az elsődleges agyhólyagok: az előagy, a középagy (mesencephalon), és az utóagy (2. ábra, B). Az előagy később tovább tagolódik telencephalon-ra és diencephalon-ra, az utóagy pedig metencephalon-ra és myelencephalon-ra. A telencephalon származékai a nagyagykéreg és egyes kéreg alatti dúcok, a diencephalon származékai a thalamusz, hipothalamusz, epithalamusz, és szubthalamusz. A mesencephalon alakítja ki a középagy magvait, a metencephalon-ból alakul ki a híd és a kisagy, míg a myelencephalon adja a nyúltvelőt (Sadler, 1999b). A továbbiakban anagyagykérgének fejlődésének példáján tekintem át a proliferáció és sejtjárási folyamatokat, majd vizsgálati területünk, ahippokampusz fejlődését ismertetem.



2. ábra. Az agy korai fejlődésének morfológiai viszonyai

Az A-panelen a neuruláció folyamata figyelhető meg. Az elsődleges agyhólyagok egymáshoz való viszonyát ábrázolja a B-panel (g.v.-gerincvelő). A hippocampusz fő részei és rétegei figyelhetők meg a C-panelen. CA1-3- cornu ammonis 1-3, GD-gyrus dentatus, a-alveus, o-oriens, p-pyramidale, r-radiatum, lm-laconosum-moleculare, m-moleculare, g-granulosum, h-hilus. A telencephalon-hólyag keresztmetszete látható az ábra D-részén. MGD-mediális gangliondomb, LGD-laterális gangliondomb, HP-hippocampális primordium, VZ-ventrikuláris zóna, KL-kérgi lemez, kék nyilak-radiális migráció, zöld nyilak-tangenciális migráció.

A nagyagykéreg 6 rétegből áll (bár a kéreg bizonyos területein egyes rétegek nagyon vékonyak, esetleg hiányozhatnak is), a különböző rétegek kívülről befelé haladva követik egymást az elsőtől a hatodikig. A hippocampusz ősi kérgi terület, leginkább két, egymásba forduló C-alakkal írható le szerkezete. A nagyobbik C-forma az ammon-szarv, mely CA1-CA3 területekre osztható, a kisebbik C-forma pedig a gyrus dentatus. A hippocampusz alapvető felépítését és rétegeit a 2. ábra C-része illusztrálja. (részletesebben a Bevezetés IV.4.1.-es fejezetében ismertetem; lásd még: 10. ábra). Mind a nagyagykéreg, mind pedig a hippocampusz a telencephalon-hólyagból fejlődnek ki. A telencephalon-hólyag középső, felső és oldalsó fala az úgynevezett pallium, míg az alsó fala a szubpallium (2. ábra, D). A kérgi fejlődés során a glutamát ingerületátvivő-anyagot felszabadító (glutamáterg) idegsejtek, a γ -amino-vajsavat

(GABA) ürítő (GABAerg) idegsejtek, és a gliasejtek külön progenitor-klónokból alakulnak ki (Luskin és mtsai 1993). A glutamáterg idegsejtek a palliumban, míg a GABAerg idegsejtek a szubpalliumban jönnek létre, ami azt is előrevetíti, hogy a sejt vándorlás során eltérő útvonalakat járnak be. A következőkben részletezett folyamatokat kiválóan foglalja össze munkatársaival Pasko Rakic (Bystron és mtsai 2008). A pallium fala a 9. napon az 1-2 sejtréteg vastagságú kamrai vagy ventrikuláris zóna, mely az idegsejtek és gliasejtek elő-sejtjeiből, a progenitorsejtekből épül fel. Ezek a neuroepitélisejtek eleinte csak önfenntartó módon, szimmetrikusan osztódnak, majd a 10. napon (emberben a 33. napon) elkezdnek differenciálódni, azaz aszimmetrikusan osztódnak. Ennek során létrehozzák a szubventrikuláris zónát, melyben a továbbiakban megtörténnek a végső szimmetrikus osztódások, idegsejt-párokat illetve gliasejt-párokat létrehozva. Ezt követően további rétegek alakulnak ki, bentről kifelé haladva: ventrikuláris-, szubventrikuláris-, átmeneti zóna, kérgi lemez, és a határoló zóna. Megjelennek a radiális gliák, melyek nyúlványai átérrik a fejlődő kéreg teljes vastagságát. A kérgi idegsejtek a szubventrikuláris zónából radiális sejt vándorlás során – mintegy a radiális gliák nyúlványain kúszva – haladnak a határoló zóna irányába, és elfoglalják helyüket a kérgi lemezben (2. ábra, D). Ezen a módon – fordított sorrendben – belülről kifelé haladva hozzák létre a kéreg rétegeit, azaz az először kialakuló 6. rétegen keresztülhaladó sejtek alakítják ki az 5. réteget, majd a 6. és 5. rétegen áthaladó sejtek a 4. réteget, és így tovább. A radiális sejt vándorlás összetetten szabályozott folyamat, neurokémiai gradiensek, sejtek közötti adhéziós molekulák és egyéb faktorok is részt vesznek irányításában. A radiális gliák és a vándorló neuronok közti réskapcsolatok is fontos szerepet játszanak a radiális migrációban - érdekes módon azonban csak mint adhéziós molekulák, a csatornafunkció nem szükséges ezen feladatuk ellátásához (Elias és mtsai 2007). Jelenlegi ismereteinket a sejt vándorlás molekuláris szabályozásáról Solecki kimerítően összegzi (Solecki, 2012).

Ezekkel a folyamatokkal párhuzamosan a szubpalliumban kialakul a gangliondomb. Feji irányban laterális és mediális részre oszlik, melyek farki irányba haladva a kaudális gangliondombban egyesülnek. A gangliondombban helyet foglaló interneuronális progenitorsejtek többek között az Nkx2.1, Dlx1 és Lhx6 homeobox géneket fejezik ki (Welagen és Anderson, 2011), melyek szerepet játszanak a GABAerg idegsejt irányába történő elköteleződésükben. Végső osztódásuk után tangenciális

vándorlásba kezdenek, és a szubventrikuláris-, az átmeneti- és a határoló zónákban haladnak rendeltetési helyük felé a telencephalon-hólyag oldalsó, felső és középső falának irányában (2. ábra, D; Tanaka és Nakijama, 2012). Útjuk legvégső szakaszát, melynek során a megfelelő kérgi rétegbe jutnak, radiális migrációval teszik meg. Az interneuronok vándorlása is összetetten szabályozott folyamat, melyről Marin ad részletes összefoglalót (Marin, 2013).

A hippocampusz ősi kérgi terület, a pallium származéka. Fejlődése alapvetően ugyanazt az elvet követi, mint a nagyagykéregé, azonban a dolgozat szempontjából kiemelt jelentőségére való tekintettel röviden külön ismertetem. A fogantatás utáni 14. napon a telencephalon-hólyag középső fala elkezd a kamrába boltosulni, ez a hippocampális primordium (2. ábra, D). A primordium neuroepitéliuma folytonos a telencephalon ventrikuláris zónájának azonos sejtrétegével. A progenitorsejtek osztódása során létrejövő ideg- és gliasejtek radiális vándorlással jutnak helyükre, a fősejtek először a CA1 régiót kezdik el felépíteni. A növekvő fősejt-réteg a 20-21. napon éles kanyart vesz, és a CA3 régiót kialakítva a CA1 alá fordul. Eközben a gyrus dentatus felépülése is megindul a neuroepitéliumból kivándorló sejtekből. Végül a bedomborodó hippocampusz a kamra jelentős részét elfoglalva a telencephalon-hólyag felső fala alá fekszik (Bayer, 1980, Altman és Bayer, 1990). A hippocampusz interneuronjai a kérgi interneuronokhoz hasonlóan szubpalliális, azaz gangliondomb eredetűek. A telencephalon hólyag egészén végigvándorolva a hippocampusz oriens és radiatum rétegeiben haladnak rendeltetési helyük felé, majd rövid radiális vándorlással jutnak a megfelelő rétegbe (Danglot és mtsai 2006).

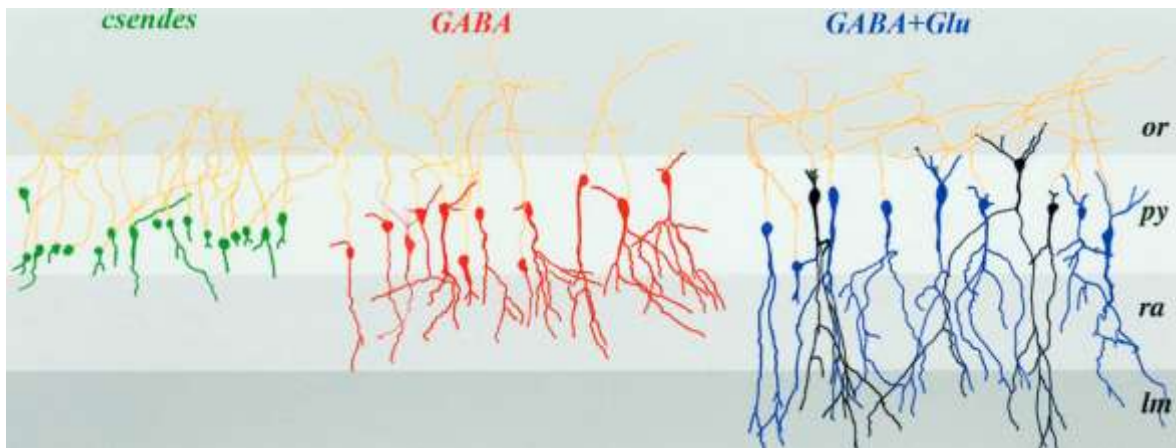
A sejtek embrionális proliferációja a 10. naptól körülbelül a 18. gesztációs napig tart(emberben a 33. naptól körülbelül a 175. gesztációs napig; Götz és Huttner, 2005; Pescosolido és mtsai 2012). Ezt követően általában az emlős agyban – két kivételtől eltekintve – nem jönnek létre új idegsejtek. A szaglógumóban és a hippocampusz gyrus dentatus nevű területén azonban az ott jelenlevő progenitorsejtekből folyamatosan születnek új idegsejtek, melyek be is épülnek a már meglévő hálózatba, bár az emberben egyedülálló módon a szaglógumóban nincs ilyen neurogenesis (Bergmann és mtsai 2012; Bergmann és Frisén, 2013). A folyamatról – melyet felnőtt neurogenesisnek nevezünk – több, részletes összefoglaló munka is elérhető (Ming és Song, 2005, 2011; Bergmann és Frisén, 2013). A felnőtt neurogenesisre a későbbiekben

többször fogok utalni, mivel ezeknek a felnőttben újonnan születő sejteknek a fejlődése, hálózatba való beépülése szinte a legapróbb részleteiben is megegyezik az embrionális fejlődés során lejátszódó folyamatokkal.

Miután az egyes idegsejtek elérték rendeltetési helyüket, hamarosan befejeződik az összetett térszerkezetük kialakulása, mellyel párhuzamosan lejátszódik a szinaptogenezis is. Ezen folyamatokról részletesebben a következő fejezetben írok. Általánosságban azonban mindenképpen ki kell emelnem, hogy a proliferációtól kezdve a sejt-vándorlás, dendrit-és axonarborizáció kialakításán keresztül egészen a szinaptogenezisig tartó folyamatok alapvető jellemzője az aktivitás-függőség. Ez szükségessé teszi egy belső, spontán neuronális aktivitás létét, melynek formáit, kialakulását és jelentőségét a későbbiekben részletesen tárgyalom.

IV.1.2. A szinaptikus bementek kialakulása, a „GABA-váltás”, a depolarizáló GABAerg jelátvitel fontossága a neuronális fejlődésben

A proliferáció és sejt-vándorlás folyamataival párhuzamosan megkezdődik az idegsejtek összetett térszerkezetének kifejlődése (dendritikus és axonális arborizáció), és a szinaptikus kapcsolatrendszerük kialakulása is. A kilencvenes évek végén derült fény arra a kimondottan érdekes jelenségre, miszerint egy adott sejt a különféle típusú szinaptikus bemenetei nem párhuzamosan, esetleg véletlenszerűen alakulnak ki, hanem szigorú sorrendben követik egymást. A kérgi területek két legfőbb jelátvivő anyagát, a glutamátot és a GABA-t felszabadító végkészülékek hozzák létre a két fő szinapszis-típust. Bebizonyosodott, hogy a fejlődő idegsejthálózatokban egy adott sejt először GABAerg szinaptikus bemeneteket fog kapni, majd ezt követően jelennek meg rajta a glutamáterg kapcsolatok (3. ábra), melyek először csak N-metil-D-aszpartát (NMDA) típusú glutamát-receptorokat tartalmaznak, az α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazol-propánsav (AMPA) típusú glutamát-receptorok csak később jelennek meg bennük. Ez a séma teljesen általános érvényűnek bizonyult, hiszen jelenlétét igazolták rágcsálóban (Tyzio és mtsai 1999), főemlősben (Khazipov és mtsai 2001), sőt, még a felnőtt neurogenesis során is a gyrus dentatusban (Esposito és mtsai 2005; Ge és mtsai 2006). A receptorok megjelenésének ezt a sorrendjét később anatómiai munkákkal is bizonyították humán mintákon is (Herlenius és Lagercrantz, 2001), illetve az ultrastruktúrális vizsgálatok is ezt a sorrendet támasztják alá (Fiala és mtsai 1998).



3. ábra. A piramissejtekre érkező szinaptikus bementek megjelenésének sorrendje a posztnatális fejlődés során

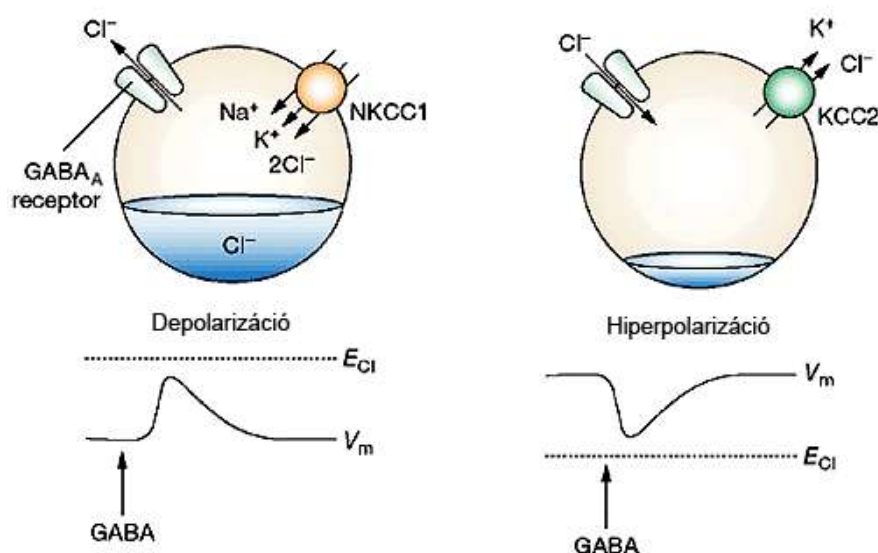
In vitro elvezetett és feltöltött piramissejtek kamera lucidá-val készült rekonstrukciói újszülött rágcsáló hippocampusból. A sejtek szinaptikus bemeneteik alapján vannak csoportosítva. Az idegrendszer fejlődése alatt, az idegsejtek hálózati integrációja során először a GABAerg szinaptikus bemenet jelenik meg, majd ezt követően kezdenek csak el megjelenni a glutamáterg szinaptikus bemenetek. (Tyzio és mtsai *J Neurosci*, 1999, a kiadó engedélyével, módosítva)

A felnőtt agykéregben a GABA a fő gátló, míg a glutamát az elsődleges serkentő jelátvivő anyag. Felmerül a kérdés, hogy ha egy intenzíven fejlődő hálózatban először gátló szinapszisok alakulnak ki egy sejten, akkor az a sejt hogyan tudja a saját fejlődéséhez, éréséhez elengedhetetlen aktivitást biztosítani? A válasz az, hogy a fejlődés ideje alatt a GABA nem gátló hatást fejt ki, hanem ezzel ellenkezőleg, depolarizálót, és csak később, a hálózat éretté válása során válik hiperpolarizáló, azaz gátló hatásúvá. A folyamatot – melyet „GABA-váltás”-nak nevezünk – dolgozatomban betöltött alapvető fontosságára való tekintettel az alábbiakban részletesen ismertetem, majd összefoglalom a GABAerg depolarizáció idegi hálózatok fejlődésben betöltött kiemelt szerepét.

A GABA a preszinaptikus végkészülékben szintetizálódik glutaminsav-dekarboxiláz (GAD) enzimek segítségével glutamátból, majd vezikuláris GABA-transzporter (vGAT) szállítja a szinaptikus hólyagocskákba. Innen akciós potenciál

hatására ürül a szinaptikus részbe, ahol receptoraihoz kapcsolódva fejti ki hatását. A sejten kívüli térből különböző GABA-transzporterek veszik vissza mind az idegsejtekbe, mind pedig a gliasejtekbe. A GABA-receptorok két fő csoportra oszthatók, az ionotróp GABA_A-, és a metabotróp GABA_B-receptorokra. Korábban használatban volt a GABA_C-receptor elnevezés egy kizárólag a retinában jelenlévő ionotróp GABA-receptorra, de szerencsésebb ezt a csatornát a GABA_A-receptorokhoz sorolni (Barnard és mtsai 1998). A hét transzmembrán doménnel rendelkező GABA_B-receptorok kálium-csatornák aktiválásán keresztül okoznak hiperpolarizációt, azonban a fejlődés korai szakaszában csak a preszinaptikus GABA_B-receptorok tudnak hatni ezekre a csatornákra, ezért a posztzinaptikus GABA_B-függő gátló hatás hiányzik (Gaiarsa és mtsai 2011). A GABA_A-receptorok öt alegységből álló ioncsatornák, melyek elsősorban klorid-ionokat (Cl⁻) engednek át, kisebb mértékben azonban bikarbonát-ionokat is (Kumamoto és Murata, 1995). A felnőtt idegrendszerben a sejten belüli Cl⁻-koncentráció (~7 mM) sokkal kisebb a sejten kívülinél (~140 mM), ezért a GABA_A-receptorok aktiválása Cl⁻-beáramlást, ezáltal hiperpolarizációt okoz. 1978-ban Obata és munkatársai figyelték meg először, hogy a fejlődés során a GABA a várákozásokkal ellentétben depolarizációt okoz (Obata és mtsai 1978). Azóta több száz tanulmány írta le ugyanezt a jelenséget a legkülönbözőbb fajokban, az idegrendszer szinte minden vizsgált területén a gerincvelőtől kezdve a kisagyon, a thalamuszon, az agykérgen át egészen a retináig (összefoglalva: Ben-Ari, 2007; Blankenship és Feller, 2010). Ma már tudjuk, hogy mi áll ezen jelenség hátterében. A fejlődő sejtek belső Cl⁻-koncentrációja sokkal magasabb (~20-25 mM), mint az érett sejteké (~7 mM), de még mindig kevesebb, mint a sejten kívüli Cl⁻-koncentráció (a fejlődés alatt is ~140 mM). Szét kell azonban választanunk a koncentráció-gradiens és az elektrokémiai gradiens fogalmát. Az előbbit csak az adott ion koncentrációja határozza meg, míg utóbbit az összes jelenlévő ion koncentráció- és töltésviszonyai együttesen szabják meg. Így fordulhat elő, hogy a Cl⁻ esetében ez a néhány millimol koncentráció-különbség (~20-25 vs. 7 mM) már elegendő az elektrokémiai gradiens megfordításához (Staley és Smith, 2001). Bár az ioncsatorna ugyanúgy működik – aktiváció hatására klorid-ionokat enged át – a megfordult elektrokémiai gradiens miatt a GABA_A-receptorok nyitására a sejtekből kifelé fog a klorid áramlani, ezáltal depolarizációt okozva. A magas belső Cl⁻-koncentráció hátterében az áll, hogy a fejlődés során a sejtek nagy számban

rendelkeznek sejt felszíni nátrium-kálium-klorid-kotranszporter 1-gyel (NKCC1, ami kloridot pumpál a sejtbe), melynek szintje az érés során fokozatosan csökken, miközben megjelenik a klorid-kálium-kotranszporter 2-es fehérje (KCC2, mely kloridot pumpál ki a sejtől; 4. ábra). A klorid-szállítófehérjék kifejeződésében bekövetkező váltás gyakorlatilag a „GABA-váltás”, mely egérben a születés utáni 12.-14. nap környékén játszódik le. Ennek a folyamatnak a törzsfajlás során való nagyon magasfokú megőrzöttségét jól illusztrálja, hogy az emberi agy fejlődése során is lezajlik, (a 8. terhességi hónapban kezdődik, és a születés utáni 4. hónapban fejeződik be; Dzhala és mtsai 2005; Vanhatalo és mtsai 2005), illetve a felnőtt neurogenesis során a gyrus dentatusban születő sejtekben is pontosan a leírt módon játszódik le (Karten és mtsai 2006; Ge és mtsai 2006).



4. ábra. A sejtek klorid-háztartása és a GABA-váltás a posztnatális fejlődés alatt

Az ábra bal oldalán egy fejlődő idegsejt látható, mely az NKCC1 klorid

importert fejezi ki. Ennek következményeként a sejtben magas klorid-koncentráció épül ki, és a klorid egyensúlyi potenciálja pozitív a nyugalmi membránpotenciálhoz viszonyítva. A $GABA_A$ -receptorok aktiválása így itt depolarizációt okoz. A jobb oldalon egy érett idegsejt látható, melyen az NKCC1 klorid importer helyét átvette a KCC2 klorid exporter. Ennek következményeként a sejtben alacsony klorid-koncentráció alakul ki, és a klorid egyensúlyi potenciálja negatív a nyugalmi membránpotenciálhoz viszonyítva. A $GABA_A$ -receptorok aktiválása hiperpolarizációt okoz. (Kahle és mtsai *Nature Clinical Practice*, 2008., a kiadó engedélyével, módosítva; V_m -membránpotenciál, E_{Cl} -klorid egyensúlyi potenciál)

A váltás a különböző agyterületeken nem egyszerre történik meg, az egyszerűbb, de létfontosságú életfunkciókat ellátó területeken – pl.: gerincvelő, nyúltvelői légzési- és keringési központok – sokkal hamarabb megy végbe, és a legmagasabb szintű funkciókat ellátó kérgi területeken fejeződik be a legkésőbb (Ben-Ari, 2007). Ezen kívül, egy hálózatban a „GABA-váltás” nem teljesen egyszerre játszódik le az összes sejtben, hanem kisebb-nagyobb átfedéssel kissé eltérő időablakban megy végbe az egyes sejtekben. Pontosan ez az oka, hogy fejlődő idegsejthálózatokat vizsgálata során a GABA_A-receptorokra ható szerek mindig kevert hatást fognak okozni, hiszen egyes sejteket jobban, másokat kevésbé depolarizál a GABA, egyeseket pedig már hiperpolarizálhat is. Ezért nagyon fontos megjegyezni, hogy a GABAerg depolarizáció hatását vizsgáló kísérletek akkor igazán hitelesek, ha GABAerg agonisták vagy antagonisták használata mellett a sejtek klorid-háztartását megváltoztatva is vizsgálják az adott rendszert, például a klorid-transzporterek genetikai befolyásolásával, vagy az NKCC1 szelektív gátlószerét, a bumetanidot alkalmazva. A közelmúltban egy kutatócsoport megpróbálta cáfolni a „GABA-váltás” paradigmáját, azonban a már akkor is elérhető *in vivo* eredmények, illetve több más csoport által azóta elvégzett ellenőrző kísérletek minden kétséget kizáróan igazolták, hogy a fejlődés során a GABA depolarizáló hatást fejt ki. A kialakult vitát, illetve a végleges bizonyítékokat nyújtó tanulmányokat a kérdés fontosságára való tekintettel az alábbiakban ismertetem.

Az elmúlt években megjelent Youri Zilberter munkacsoportjából három tanulmány, melyekben azt állították, hogy a GABA-váltás kísérleti műtermék (Rheims és mtsai 2009; Holmgren és mtsai 2010; Bregestovski és Bernard, 2012). A szerzők két fő irányból támadták a paradigmát: először azt állították, hogy az *in vitro* szeletkészítmény elégtelen energiaellátása és a kísérletekben használt mesterséges agygerincvelői folyadék (artificial cerebrospinal fluid, ACSF) alacsony ketontest-szintje okozza a GABA depolarizáló hatását, másodszerre pedig a szelet készítése során történő szövethárosodással indokolták a jelenség meglétét. A kérdés fontosságára való tekintettel rövidesen több, egymástól független munkacsoport is megpróbálta megismételni ezeket a vizsgálatokat, és a paradigma megcáfolására irányuló kísérletek eredményeit egyszer sem tudták reprodukálni. Kimutatták azonban, hogy: 1. a Zilberter csoport kísérleteikben patológiásan magas koncentrációjú ketontestet használt, 2. az általuk használt drogok megváltoztatták az ACSF pH-ját, mely már önmagában

módosította a GABA hatását, és 3. kimutatták, hogy a Zilberter csoport szennyezett drogot használt, melyet ha más gyártótól szereztek be, a hatás nem jelentkezett (Barkis és mtsai 2010; Kirmse és mtsai 2010; Ruusuvuori és mtsai 2010; Waddel és mtsai 2011; Ben-Ari és mtsai 2011; Tyzio és mtsai 2011). A többségi elképzeléssel ellentétes következtetést levonó kutatók a fent leírt kísérlettervezési hibák mellett érvelésükben csak az *in vitro* szeletek különböző tulajdonságaira fókuszáltak és azt okolták a GABA szerintük látszólagos depolarizáló hatásáért. Ezzelazonban teljes mértékben figyelmen kívül hagyták azokat a munkákat, melyek vagy sejtenyészetben (Waddel és mtsai 2011), vagy pedig *in vivo* körülmények között készültek (Cancedda és mtsai 2007; Wang és Kriegstein, 2008). Ugyancsak figyelmen kívül hagyták azt a munkát, mely során altatott állatnak intraperitoneálisan adott bumetanid (NKCC1-blokkoló, mely a GABA depolarizáló hatását hiperpolarizálóra változtatja) hatására az *in vivo* elvezetett szinkron aktivitás leállt, majd a drog kiürülése után visszatért (Sipilä és mtsai 2006), egyértelműen igazolva a GABA depolarizáló hatását *in vivo*. Ugyancsak nem fér össze érveikkel az sem, hogy a születés alatt az oxitocin hatására rövid ideig lecsökken a sejtek belső klorid-szintje, ezáltal ideiglenesen leállítva a GABAerg depolarizációt (Tyzio és mtsai 2006; Mazzuca és mtsai 2011), mely a születő magzat védelmét szolgáló mechanizmus lehet. Az is állításaik ellen szól, hogy a felnőtt neurogenesis során a gyrus dentatusban létrejövő szemcsesejtekre érkező GABAerg bemenet depolarizáló, míg a közvetlen közelükben elhelyezkedő érett szemcsesejtekre érkező pedig hiperpolarizáló hatású (Ge és mtsai 2006). Klinikai vizsgálatokból ismert az is, hogy az újszülöttek görcskészségét a GABAerg jelátvitelt erősítő szerek (barbiturátok, benzodiazepinek) a felnőttel ellentétben nem csökkentik, hanem éppen növelik (Nardou és mtsai 2011; Sankar és Painter, 2005), melynek hátterében a depolarizáló GABAerg jelátvitel felerősítése állhat (Staley, 1992). Ezért is merült fel az újszülött-kori görcsállapotok kezelésében az NKCC1-gátló bumetanid alkalmazásának lehetősége (Kahle és mtsai 2009), melyet azonban pont a GABAerg depolarizáció fejlődésben betöltött alapvető fontossága miatt fokozott óvatossággal kell kezelni (Wang és Kriegstein; 2011). A mérési technikák folyamatos fejlődésének köszönhetően a vizsgált rendszerbe a lehető legkisebb mértékben beavatkozó (ún. non-invazív) mérési módszerekkel is sikerült igazolni az NKCC1-függő GABAerg depolarizáció meglétét a fejlődés során (Minlebaev és mtsai 2013; a szerzők cell attached patch clamp eljárást

alkalmazták pipettán belüli GABA laser-uncaging-gel kombinálva). Összességében elmondható, hogy a GABA-váltást érintő vita – részben az azóta megjelent ellenőrző kísérleteknek, részben pedig a már előzetesen is rendelkezésre álló *in vitro*, sejt kultúra, *in vivo* és humán adatoknak köszönhetően – gyakorlatilag lezártnak tekinthető, melyről részletekbe menő összefoglalót Ben-Ari készített (Ben-Ari és mtsai 2012).

Az elmúlt években az is bizonyítást nyert, hogy a GABA által okozott depolarizáció a fejlődés minden szakaszában meghatározó fontossággal bír. Már a progenitorsejtek is rendelkeznek GABA_A-receptorokkal, melyek aktiválása depolarizációt és sejten belüli kalcium-szint növekedést okozva készleten kérésre ezeket a sejteket. A jelenséget először a nagyagykéregben figyelték meg (LoTurco és mtsai 1995; Young és mtsai 2012), majd leírták a gerincvelőben (Brustein és mtsai 2012) és a felnőtt neurogenesis során is a gyrus dentatusban (Tozuka és mtsai 2005; Jagasia és mtsai 2009). Mind a glutamaterg, mind pedig a GABAerg idegsejtek vándorlásának szabályozásában kiemelt szerepet tölt be a GABAerg jelátvitel, illetve a GABA okozta depolarizáció. A radiális migrációban összetett szabályozóként működik GABA_A- és GABA_B-receptorokon hatva (Behar és mtsai 2000; Bony és mtsai 2013), és az interneuronok tangenciális migrációját is NKCC1-függő módon segíti elő (Inada és mtsai 2011). A sejtek megfelelő térszerkezetének kialakításához is elengedhetetlen a GABAerg depolarizáció az agykéregben és a kisagyban is (Cancedda és mtsai 2007; Borodinsky és mtsai 2003). A hippocampusz és nagyagykéreg mind glutamaterg, mind pedig GABAerg szinapszisainak kialakulásában ugyancsak alapvető fontosságú a GABA_A-receptorok aktivációját követő depolarizáció (Wang és Kriegstein, 2008, 2011; Sauer és Bartos, 2010). Ezek után nem meglepő, hogy a gyrus dentatus felnőtt neurogenesis során született sejteinek mind morfológiai fejlődéséhez, mind pedig szinaptikus integrációjához is szükséges a GABA biztosította serkentés (Ge és mtsai 2006; Chancey és mtsai 2013). A depolarizáló hatású GABAerg jelátvitelnek a fejlődő idegsejthálózatok szinkron aktivitásában betöltött kiemelt szerepét a következő fejezetben írom le.

IV.1.3. Az agyi aktivitásmintázatok fejlődése, az első szinaptikus szinkron hálózati aktivitás és szerepe

Mind az érett, mind pedig a fejlődő idegsejthálózatok egyik legáltalánosabb tulajdonsága a ritmusos, szinkron aktivitás jelenléte (Buzsáki és Watson, 2012; Blankenship és Feller, 2010; Ben-Ari, 2001). Ez a szinkron mintázat biztosítja a hajtóerőt a fejlődő hálózatok aktivitásfüggő folyamataihoz, illetve összehangolja az egyes sejtek kisülését, megteremtve az alapját az agy kognitív működéseinek. A fejlődés alatt jelenlévő hálózati aktivitásnak alapvetően más feladatokat kell ellátnia, mint a felnőtt agyra jellemző hálózati mintázatoknak. A következőkben összefoglalom a felnőtt agy legjellemzőbb elektromos ritmusait, majd a fejlődés során időben egymást követve megjelenő szinkron aktivitástípusokat, illetve azoknak a fejlődésben betöltött szerepét.

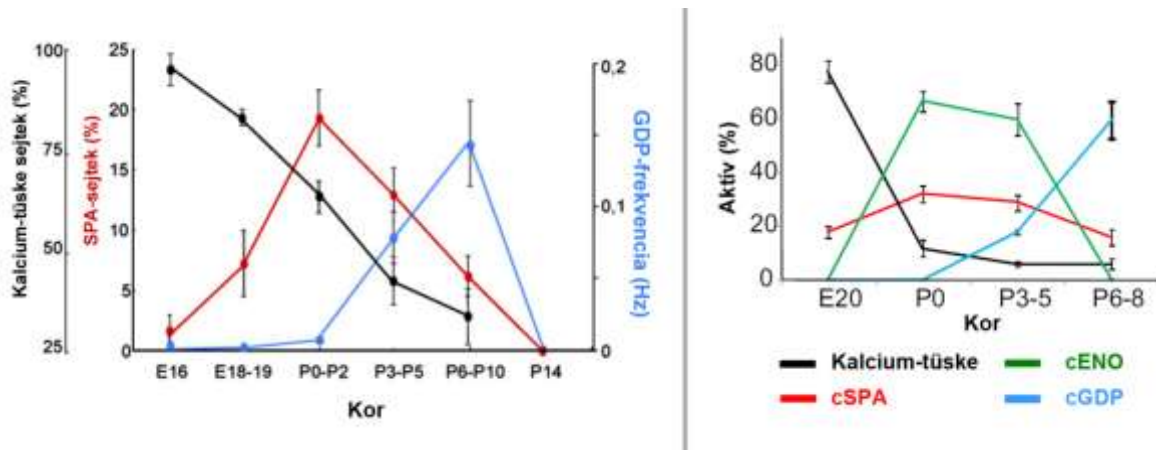
A felnőtt hippokampuszban zajló szinkron aktivitások egy igen széles folytonos frekvenciatartományban detektálhatók, azonban ezen frekvenciákon belül létezik három olyan frekvenciatartomány, melyek összefüggést mutattak az állat fiziológiai állapotával vagy viselkedésével. Ezek az ún. theta-aktivitás (θ ; 4-10 Hz), a gamma-aktivitás (γ ; 30-80 Hz) és a nagyfrekvenciájú éles-hullámú aktivitás (SPW; 100-200 Hz) frekvenciatartományai. Közös tulajdonságuk – egyes, a fejlődés során jelenlévő aktivitással szemben – hogy mindhármuk létrehozásában a szinaptikus aktivitás játssza a fő szerepet. Ezen mintázatoknak a lehetséges feladatáról kialakult jelenlegi elképzelést nagyon leegyszerűsítve elmondhatjuk, hogy a θ -mintázat felelős az alapvető zajszűrésért, a hálózatban jelenlevő háttéraktivitás, és az adott pillanatban valós információt hordozó aktivitás szétválasztásáért. A γ -aktivitás szerepe lehet a különböző modalitások reprezentációjának összehangolása, míg az SPW-aktivitás az újonnan kialakult memórianyomok hosszú-távúvá válásáért, az információt tároló mikrohálózatok megerősödéséért lehet felelős (Buzsáki és Watson, 2012; Lisman és Buzsáki, 2008; Buzsáki, 1989; Buzsáki és Wang, 2012).

A fejlődés során megjelenő aktivitásmintázatok általános séma szerint követik egymást, és a törzsfajlás során is magas szintű megőrzöttséget mutatnak, mely alátámasztja kiemelt fontosságukat (Ben-Ari, 2001). A fejlődésnek már a legkorábbi

szakaszában is fontos szerepet játszik a sejtek ritmikus, szinkron működése. A sejten belüli kalciumszint ritmikus változása hozzájárul a progenitorsejtek éréséhez (Spitzer, 2002) és az idegsejtek vándorlásának szabályozásához (Komuro és Rakic, 1996). A spontán szinkron aktivitás megléte ugyancsak feltétele a dendritek (Groc és mtsai 2002), az axonok (Fredj és mtsai 2010; Kastanenka és Landmesser., 2010), továbbá mind a GABAerg (Colin-Le Brun és mtsai 2004), mind pedig a glutamáterg szinapszisok megfelelő kialakulásának (Huupponen és mtsai 2012).

Rágcsálókban embrionálisan szórványosan előforduló intracelluláris kalcium koncentráció emelkedések jelenítik meg a neuronális aktivitást, melyek az egyes sejtekben egymástól függetlenül következnek be. A születés ideje körül jelenik meg az első, kezdetben csak kis mértékben szinkronizált aktivitásforma, az ún. spontán plató aktivitás (Spontaneous Plateau Assembly, SPA). Az SPA néhány (3-7) sejt között szinkronizált, több (8-13) másodpercig tartó intracelluláris kalciumszint emelkedés, mely feszültségfüggő kalciumcsatornák, réskapcsolatok és hiperpolarizáció-aktivált kationcsatornák részvételével jön létre, szinaptikus aktivitás nem szükséges hozzá (Crépel és mtsai 2007; Alléne és mtsai 2008). Ezt követően jelenik meg az első, szinapszis-vezérelte hálózati aktivitás, melyet *in vitro* óriás depolarizáló potenciálnak (Giant Depolarizing Potential, GDP) neveztek el (Ben-Ari, 1989). Később *in vivo* is azonosították ezt az aktivitást, és fejlődési éles-hullámnak nevezték el (Leinekugel és mtsai 2002). Ezt a hálózati ritmust dolgozatomban következetesen spontán szinkron aktivitásnak (SSA) nevezem. Az SSA a posztnatális fejlődés korai szakaszában jelenik meg, és maximumát a 6-10. nap környékén éri el mind a hippocampusban, mind pedig a nagyagykéregben (5. ábra, Crépel és mtsai 2007; Alléne és mtsai 2008). Az SSA már gyorsabb, 0,1 Hz körüli frekvenciával rendelkező aktivitás, melyet a sejtek többségére kiterjedő, szinkron sorozat-tüzelés (burst) jellemez, létrejöttében elsősorban a depolarizáló GABAerg, illetve glutamáterg szinaptikus áramok játszanak szerepet. A születés utáni második hét során eltűnik az SSA, helyét átveszik a felnőtt agyra jellemző aktivitásminták, melyek a 10. nap előtt nem figyelhetőek meg (Leblanc és Bland, 1979; Lahtinen és mtsai 2002; Buhl és Buzsáki, 2005).

Az SSA a fejlődő idegsejthálózatok talán legtöbbet vizsgált aktivitásmintázata, mely a törzsfajlás során nagyon magas szinten megőrződött, jelenlétét rengeteg *in vitro* és *in vivo* tanulmány támasztja alá. Ezenkívül főemlősökben is igazolták jelenlétét *in vivo* (Khazipov és mtsai 2001), továbbá minden jel arra mutat, hogy emberben a koraszülöttek elektro-enkefalográfiás (EEG) vizsgálata során leírt lassú-hullámú aktivitás is az SSA-nak felel meg (Vanhatalo és mtsai 2005; Khazipov és Luhmann, 2006).



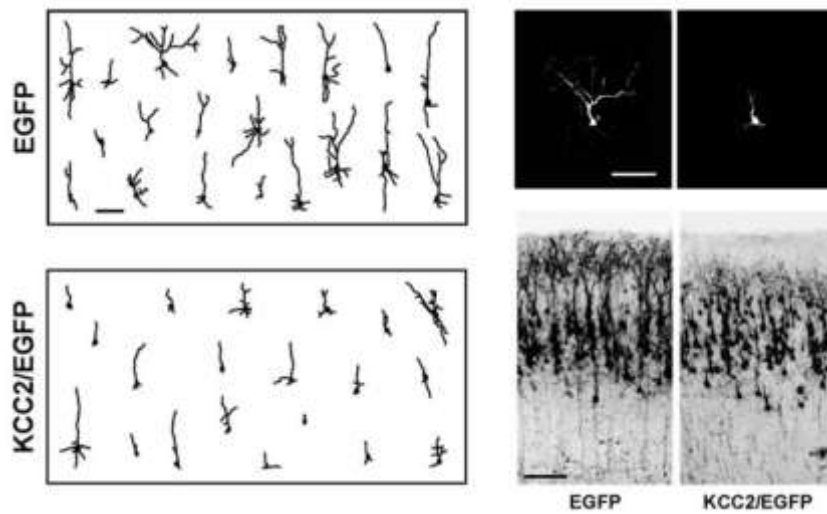
5. ábra. A spontán hálózati aktivitásmintázatok megjelenése a fejlődés során

In vitro szeletek kalcium képkalkotással történő vizsgálata alapján a fejlődés során egymást követő hálózati aktivitások megjelenése figyelhető meg. A bal oldali grafikon a különböző aktivitásmintázatokkal rendelkező hippocampális piramissejtek arányát ábrázolja az összes aktív sejt százalékában, illetve a nagy depolarizáló potenciálok frekvenciájának időbeli változását a fejlődés során. Ahogy a szövegben kifejtettem a GDP olyan *in vitro* jelenség, ami az *in vivo* észlelt SSA-nak megfeleltethető. A jobb oldali grafikonon a különböző aktivitásmintázatokkal rendelkező neokortikális sejtek arányát mutatja az összes aktív sejt százalékában. (SPA – spontaneous plateau assembly, GDP – giant depolarizing potential, cSPA – cortical SPA, cENO – cortical early network oscillation, cGDP – cortical GDP; Crépel és mtsai Neuron, 2007. illetve Alléne és mtsai J Neurosci, 2008., a kiadó engedélyével, módosítva)

Az SSA-t alapvetően a GABAerg szinaptikus depolarizáció határozza meg, mellette kiemelt szerepet játszik létrejöttében az NMDAR-k aktiválása, és kisebb mértékben az AMPAR-ok működése is. Ezek mellett hiperpolarizáció-aktiválta kationcsatornák és a alacsony-küszöbű kalciumcsatornák által létrehozott rezonancia is

hozzájárulhat az SSA létrejöttéhez (Sun és mtsai 2012). A GABAerg jelátvitel alapvető szerepét támasztja alá az is, hogy az SPA-SSA átmenet akkor történik meg, amikor a GABAerg idegsejtek elérnek egy kritikus érettségi szintet (Alléne és mtsai 2012), illetve hogy egyes GABAerg idegsejtek működésébe történő beavatkozás mélyen érinti a szinkron hálózati aktivitást (Bonifazi és mtsai 2009). A GABAerg depolarizáció elengedhetetlen szerepét azonban legerőteljesebben Sipilä és munkatársai támasztották alá, amikor posztnatális első héten NKCC1-gátló bumetanidot adtak patkányoknak, és *in vivo* vizsgálták az állatok hippokampális aktivitását. Az NKCC1-gátló szelektíven csak a GABA-váltás előtt levő sejtek klorid-behozatalát akadályozta meg, így megszüntetve a GABAerg depolarizációt. Ennek hatására az SSA leállt, mely hatás a szer kiürülése után elmúlt (Sipilä és mtsai 2006). Az eddigi eredmények minden esetben azt igazolták, hogy az SSA akkor ér véget egy agyterület fejlődése során, amikor ott megtörténik a GABA-váltás, további bizonyítékot szolgáltatva a GABAerg depolarizáció SSA-ban betöltött elengedhetetlen szerepe mellett (Ben-Ari, 2007).

Az SSA azonban nem csak általános aktivitásmintázat, hanem jelenléte nagyon magas szinten biztosított is. Ha mesterségesen gátolják a hálózat belső, spontán aktivitását, az idegsejtek válaszként még jobban megemelik a sejten belüli klorid-szintjüket, így erőteljesebbé téve a rájuk érkező GABAerg depolarizációt, ezzel visszaállítva a szinkron aktivitás eredeti szintjét (Gonzalez-Islas és mtsai 2010). Mi lehet az oka, hogy ennyire „védi” a szervezet ezt az alapvető aktivitásmintát? Az SSA jelenléte egybeesik a denrit- és axon-arbor kialakulásával, illetve a szinaptogenezis folyamatával. Korábbi feltételezések szerint az SSA biztosíthatja a megfelelő hajtóerőt ezekhez az aktivitás-függő folyamatokhoz. Ezt az elgondolást elegánsan igazolta munkatársaival Laura Cancedda, amikor *in utero* elektroporáció során arra bírt rá embrionális idegsejteket, hogy azok jóval a GABA-váltás előtt kezdjenek el KCC2-t kifejezni, ezáltal megszüntetve ezekben a sejtekben a GABA depolarizáló hatását. Így a módosított DNS-t felvett sejtek nyilván nem is tudtak részt venni az SSA-ban. A hatás magáért beszél, az SSA-ból kimaradó, GABAerg depolarizációt nélkülöző sejtek morfológiai és szinaptikus érése súlyosan károsodott (6. ábra, Cancedda és mtsai 2007).



6. ábra. A GABAerg serkentés és az általa hajtott hálózati aktivitás elengedhetetlen a neuronok morfológiai fejlődéséhez *in vivo*

In utero elektroporáció segítségével

zöld fluoreszcens fehérjét (EGFP) vagy zöld fluoreszcens fehérjét és KCC2 klorid exportert (KCC2/EGFP) fejeztettek ki patkány neokortikális piramisidősejtekben. Hat nappal később markáns különbség alakult ki a csak EGFP-t illetve az KCC2/EGFP-konstrukciót kifejező sejtek között: a KCC2-t is kifejező sejtek morfológiai érése jelentősen károsodott, sokkal kevesebb és rövidebb dendrittel rendelkeznek. A KCC2 túlságosan korai megjelenése miatt ezeket a sejteket nem serkentő, hanem gátló GABAerg hatás érte a posztnatális fejlődés során. (Cancedda és mtsai *J Neurosci*, 2007., a kiadó engedélyével, módosítva)

Ugyanerre az eredményre jutottak, amikor a felnőtt neurogenesis során a gyrus dentatusban újonnan születő idegsejtekkel végeztek el hasonló kísérletet (Ge és mtsai 2006). Érdekes felfedezés volt, hogy amennyiben a fejlődés során legátolták a GABA_A-receptorokat, de emellett optogenetikai stimulációval fenntartották az SSA-t, a fejlődés normális maradt, tovább igazolva a spontán szinkron aktivitás idegsejthálózatok fejlődésében betöltött kritikus szerepét (Kastanenka és Landmesser, 2010). A dendritikus és axonális arborizáció megfelelő létrejöttéhez szükséges aktivitás biztosításán felül a jelenlegi elképzelések szerint az SSA által biztosított szinkron tüzelés-sorozatok nyújthatják azt az „időablakot”, melyen belül megtörténhet az aktív szinapszisok megerősödése, ezáltal a fejlődő hálózatokban a szinaptikus integráció (Mohjerani és Cherubini, 2006). Ez nem annyira meglepő annak a fényében, hogy az SSA-hoz leginkább hasonlító felnőtt aktivitásmintázat, az éles-hullám szinkron tüzelés-sorozatai alatt erősödhetnek meg a specifikus információt hordozó mikrohálózatok (Buzsáki, 1989).

Összefoglalva elmondható, hogy az idegsejthálózatok fejlődése során általános tulajdonság a GABAerg jelátvitel depolarizáló hatása, és ezzel szorosan összefüggő spontán szinkron aktivitás jelenléte. Ezek a folyamatok kritikus fontossággal bírnak a hálózatok megfelelő kialakulásában, mind az idegsejtek morfológiájának fejlődését, mind pedig az ezzel összefüggésben álló szinaptikus kapcsolatrendszer kialakulását, érését tekintve. Bár rengeteg tanulmány foglalkozott az SSA vizsgálatával, részleteiben még nem teljesen ismertek azok a szinaptikus molekuláris jelátviteli folyamatok, melyek részt vesznek ennek az aktivitásmintázatnak a kialakításában, illetve szabályozásában.

IV.2. Az NMDA receptorok szerepe a neuronális hálózatok fejlődése során

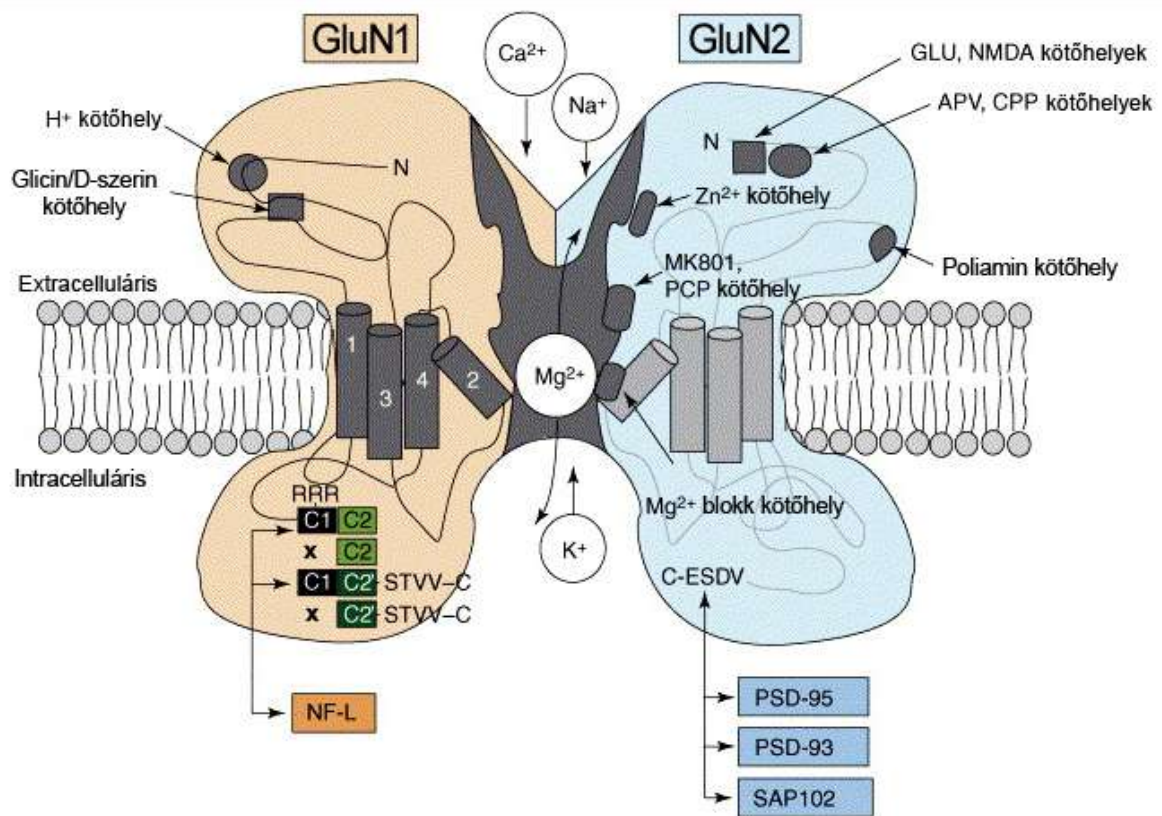
IV.2.1. Az NMDA receptorokról általában

A glutamát a központi idegrendszer fő serkentő jelátvivő anyaga. A glutamin-glutamát ciklus jellemzi neuronális anyagcseréjét, mely során a preszinaptikus végkészülékből felszabadult glutamát – miután hatását kifejtette a glutamát-receptorokon – aminosav-transzportereken keresztül a gliasejtekbe kerül, ahol glutaminná alakul, majd ebben a formában jut vissza az idegsejtbe. Ott glutamináz hatására újra glutamát keletkezik belőle, mely különféle vezikuláris glutamát-transzporterek (vGluT) révén kerül a szinaptikus hólyagocskákba (McKenna, 2007). A glutamát-receptorok két fő csoportra oszthatók, a hét transzmembrán doménnel rendelkező, G-fehérje kapcsolt metabotrop (mGluR), és az ioncsatorna glutamát-receptorokra (iGluR). Utóbbi csoport tovább osztható farmakológiai tulajdonságuk alapján kainát, AMPA és NMDA típusú glutamát-receptorokra. A mGluR-ok másodlagos jelátviteli folyamatokon keresztül befolyásolják az idegsejtek működését, míg az iGluR-ok aktiváció hatására kinyílnak, és kation-csatorna funkciót töltenek be (Dingledine, 1999).

Az NMDAR-kat három családba (GluN1-3) tartozó transzmembrán fehérjék építik fel, a GluN1, GluN2A-D, és a GluN3A-B alegységek (régiesen NR1, NR2A-D és NR3A-B, Paoletti, 2011). A GluN1, 2A és 2B alegységek a teljes központi

idegrendszerben nagy mennyiségben fejeződnek ki, a 2C alegység elsősorban a kisagyban, míg a 2D alegység főleg a kéreg alatti területeken és kérgi interneuronokban fordul elő (Paoletti, 2011). A GluN3A alegység főként a posztnatális fejlődés során, míg a GluN3B alegység elsősorban a felnőtt állatok agyában van jelen. Bár feltehetően van szabályozó funkciójuk *in vivo*, funkcionális GluN1/GluN3 receptorok jelenléte még nem igazolt (Low és Wee, 2010). 1992-ben írták le először, hogy működő NMDAR-k GluN1 és GluN2 alegységeket heteromerjeként jöhetnek csak létre (Monyer és mtsai 1992), méghozzá két GluN1-ből és két GluN2-ből álló heterotetramerként (Laube és mtsai 1998). Sem a GluN1-es, sem pedig a GluN2-es alegységek nem képesek az idegsejtek plazmamebránjába kijutni egyedül, kizárólag heteromer formában (Fukaya és mtsai 2003; Abe és mtsai 2004). Bár kezdetben feltételezték, hogy az NMDAR-k előfordulhatnak nem-váltakozó (1/1/2/2) és váltakozó (1/2/1/2) alegységösszetétellel is, bizonyossá vált, hogy működőképes receptorok a váltakozó (1/2/1/2) felépítésben vannak jelen (Riou és mtsai 2012).

Az NMDAR-k alegységei négy fő doménből állnak, a sejten belüli C-terminális, a transzmembrán-, a sejten kívüli ligandkötő- és az ugyancsak sejten kívüli N-terminális-doménből (CT-, TM-, LK- és NT-domén). Az NMDAR-k GluN2-es alegységének LK-doménjén található a glutamát vagy aszpartát kötőhely (7. ábra), azonban a receptor aktiválásához ezen kívül szükséges a ko-agonista glicin vagy D-szerin kötődése a GluN1-es alegység LK-doménjéhez, illetve egyidejű membrán-depolarizáció. A depolarizáció hatására a csatorna TM-doménjének belső blokkolóhelyét elfoglaló Mg^{2+} -ion mintegy „kilökődik” a csatornából, lehetővé téve a kationok (Ca^{2+} , Na^{+} és K^{+}) áthaladását (Dingledine, 1999), melyek közül a legfontosabb szerepe a kalcium posztszinaptikus sejtbe történő beáramlásának van (Monaghan és mtsai 2012); az NMDAR-k 3-20-szor átjárhatóbbak kalcium számára, mint nátrium vagy kálium számára (Dingledine, 1999). Ezek a receptorok már a glutamát kis koncentrációja esetén is könnyen aktiválódnak, glutamát-affinitásuk több mint két nagyságrenddel nagyobb más, ionotrop glutamát-receptorokénál (Dingledine, 1999). Az elmúlt években meglehetősen sok allosztérikus modulátort fedeztek fel ezeknek a receptoroknak, melyek a glutamát-kötőhelyen, a glicin-kötőhelyen, a csatorna belsejében vagy az NT-doménon hathatnak (Monaghan és mtsai 2012).



7. ábra. Az *N*-metil-*D*-aszpartát receptorok (NMDAR) szerkezete

A heterotetramer NMDAR-t sematikusán bemutató ábrán a receptor keresztmetszeti képe látható, az agonista-, koagonista- és antagonistakötőhelyek feltüntetésével. (Kristiansen és mtsai *Curr. Op. in Pharm.*, 2007., a kiadó engedélyével, módosítva)

Talán a legismertebb ilyen modulátorok a ketamin, a fenciklidin (PCP), az APV, a cink (Zn^{2+}). Az NMDAR-k a poszt-szinaptikus fehérje-hálózathoz (poszt-szinaptikus denzitás, PSD) a GluN2-es alegységek PDZ-doménjén keresztül kapcsolódnak (Valtschanoff és Weinberg, 2001), mely egy általános molekuláris kapcsoló-domén (Fanning és Anderson, 1999).

Az NMDAR-k tehát ötvözik a feszültség- és a ligand-függő csatornák tulajdonságait, azaz aktiválásukhoz a ligandok kötődésén kívül depolarizáció is szükséges. Ez a tulajdonságuk fontos szerepet játszik sokrétű élettani hatásukban, melyek között első helyen tartjuk számon a szinaptikus plaszticitás folyamatait (Nicoll és Roche, 2013). Ugyancsak fontos szerepe lehet az NMDAR-k aktivációjának a glia-idegsejt kommunikációban (Fellin és mtsai 2004), vagy akár az idegsejtek túlélésének

szabályozásában (Hardingham és Bading, 2010; Karpova és mtsai 2013). Az NMDAR-k felnőtt idegrendszerben betöltött szerepükön kívül alapvető fontossággal bírnak az agy fejlődésének különféle folyamataiban is.

IV.2.2. Az NMDAR-k szerepe a fejlődésben

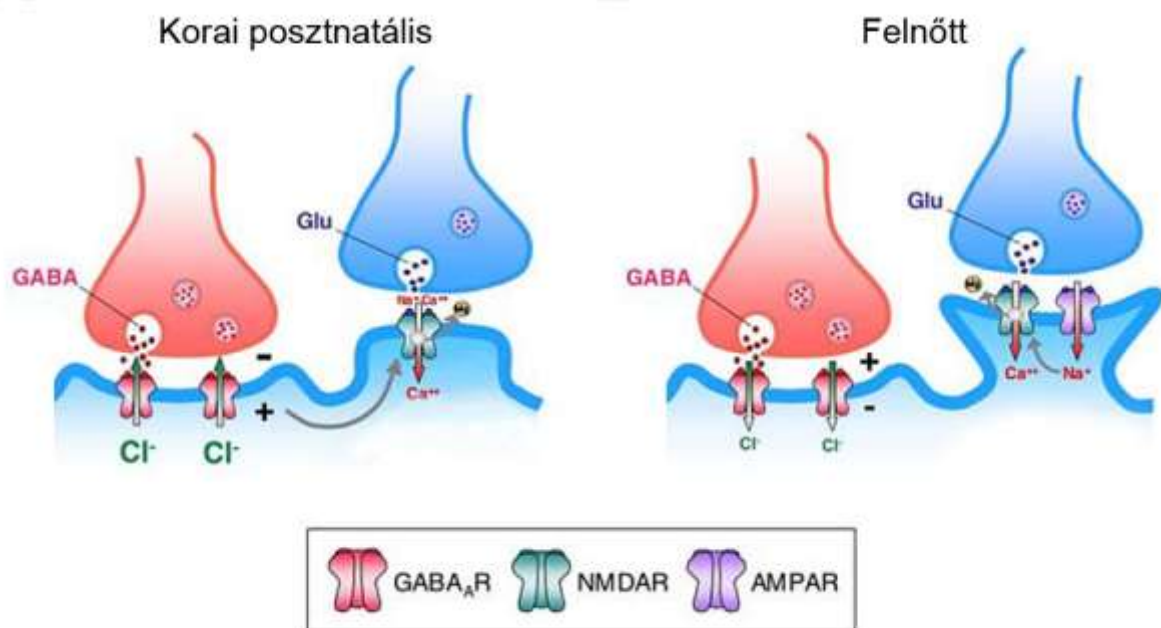
A kísérleti állatok genomjának megismerése a különféle transzgenikus technikák széles tárházát tárta fel a kutatók előtt. Így nyílt lehetőség egyes fehérjék átíródásának megakadályozására, vagy akár teljes törlésére az állatok genomjából. Ezzel a módszerrel – az ún. géнкиütéssel – létrehozott törzsek felbecsülhetetlen segítséget nyújtottak az élettudományi, azon belül is a neurobiológiai kutatások során. Így sikerült felfedezni azt is, hogy az NMDAR-k mind GluN1 alegységének, mind pedig GluN2B alegységének kiütése a születés után nem sokkal halált okoz (Forrest és mtsai 1994; Kutsuwada és mtsai 1996). Ezek a felfedezések arra utaltak, hogy az NMDAR-k fontos szerepet tölthetnek be már a korai posztnatális fejlődés során, azonban ezekben az állatokban a teljes idegrendszerből hiányoztak ezek az alegységek, így a hatás pontos helyének megismeréséhez nem biztosítottak elegendő információt. Iwasatonak és munkatársainak azonban 2000-ben sikerült előállítaniuk egy olyan egértörzset, melyben kizárólag az agykéreg principális idegsejtjeiből hiányzott a GluN1-es alegység, az agy többi részében érintetlen maradt (cortex specific NR1 knock-out, CxNR1KO; Iwasato és mtsai 2000). Ezek az állatok már megérték a felnőttkort, viszont az agykéregben komoly morfológiai (súlyosan sérült dendrit- és axon-arborizáció) és szinaptikus károsodásokat szenvedtek el, melyek egyértelműen bizonyítják az NMDAR-k fontos szerepét a kérgi idegsejthálózatok fejlődésében (Iwasato és mtsai 2000; Datwani és mtsai 2002).

Az NMDAR-k farmakológiai gátlása a posztnatális időszakban ugyancsak súlyos károsodásokat okoz a fejlődő hálózatokban (összefoglalva: Bois és Huang, 2007). Az NMDAR-k gátlása alacsony dózisu MK-801-el markánsan károsította a fehérje-átíródást, a dendritikus és axonális morfológia kialakulását, a szinapszisok létrejöttét, és a memóriefunkciókat is (Elhardt és mtsai 2010). Az NMDAR-k működése a fejlődő idegsejthálózatok szinaptikus plaszticitásához is elengedhetelen, gátlásuk amino-5-foszfovaleriánsavval (APV) megakadályozza a szinapszisok hosszútávú

megerősödését (long-term potentiation, LTP; Trommer és mtsai 1995). Ezzel összefüggésben azt is kimutatták, hogy az NMDAR-aktiváció a sejtvezetési elemek poszt-szinaptikus stabilizációját is elősegíti, hozzájárulva ezzel az aktivitás-függő szinaptikus plaszticitáshoz (Ackermann és Matus, 2003). A neuronális hálózatok fejlődésében alapvető fontosságú spontán szinkron aktivitás (részletesen: IV.1.3.) kialakulásáért és fenntartásáért is nagymértékben felelős az NMDAR-k aktivációja (Crépel és mtsai 2007; Alléne és mtsai 2008; Dupont és mtsai 2006; Blankenship és Feller, 2010).

Az NMDAR-k tehát alapvető szerepet játszanak az idegsejthálózatok fejlődésében, melyért jelenlegi ismereteink szerint a rajtuk keresztül történő kalcium-beáramlás a felelős (George és mtsai 2012). A poszt-natális fejlődés során azonban először a GABAerg szinapszisok jelennek meg, majd az ezután kialakuló glutamáterg kapcsolatok kezdetben csak NMDA-receptorokat tartalmaznak, csak később jelennek meg ezekben a szinapszisokban az AMPAR-k (lásd: IV.1.2.; Tyzio és mtsai 1999; Khazipov és mtsai 2001). Ezeket a csak NMDA-receptorokat tartalmazó glutamáterg szinapszisokat „csendes szinapszisoknak” (silent synapses) nevezik, melyekben az NMDAR-aktiváció és a következményes kalcium beáramlás indítja be az AMPAR-k megjelenését, és a szinapszisok megérését (Kerchner és Nicoll, 2008; Malenka és Nicoll, 1997; Petralia és mtsai 1999). Ez a folyamat – a csendes szinapszisok „felhangosodása” – ugyancsak kritikus fontosságú a hálózatok megfelelő kifejlődésében (Ashby és Isaac, 2011). Felmerül azonban a kérdés: a nagy számú, AMPAR-t tartalmazó glutamáterg szinapszis hiányában mi biztosítja a depolarizációt, mely elengedhetetlen az NMDAR-aktivációhoz és annak minden, fejlődésre kifejtett hatásához? A választ 1997-ben írta le Xavier Leinekugel, aki munkatársaival kimutatta, hogy a fejlődő hippokampuszban a GABAerg depolarizáció képes kilökní a Mg^{2+} -blokkot az NMDA-receptorokból, és aktiválásukon keresztül poszt-szinaptikus kalciumszint-emelkedést létrehozni (Leinekugel és mtsai 1997). Mivel mind a GABA_A-receptorok, mind pedig az NMDAR-k aktiválása szükséges a spontán szinkron aktivitás kialakulásához, feltehetően ez a GABA_A-NMDAR-együtműködés nagyban hozzájárulhat az SSA-hoz. Később leírták, hogy ez a receptorok közötti szinergista együtműködés nagyon fontos szerepet játszik a hálózat megfelelő kialakulásában, szinaptogenezisben, a csendes szinapszisok „felhangosodásában”, illetve a felnőtt

neurogenesis során született sejtek hálózatba való beépülésében (Wang és Kriegstein, 2008; Chancey és mtsai 2013). Úgy tűnik tehát, hogy a spontán szinkron aktivitás és a GABAerg depolarizáció fejlődésben betöltött fontos szerepének háttérében igen sok esetben az NMDAR-aktiváció áll. Amikor a hálózat elér egy megfelelő érettségi szintet, megtörténik a GABA-váltás, és az NMDAR-aktivációhoz szükséges depolarizációt ezután az AMPAR-k biztosítják (Ben-Ari, 1997). A jelenlegi elképzelés szerint a GABAerg szinapszisokból a csendes glutamáterg szinapszisokba terjed a depolarizáció, ahol az NMDAR-aktiváció hatására beáramló kalcium beindítja a szinapszis éréséhez vezető folyamatokat (8. ábra).



8. ábra. A GABA-NMDA együttműködés eredeti modellje

A korai posztnatális időszakban a sejten belüli magas klorid-koncentráció miatt a GABA_A-receptor aktiválás depolarizációt okoz, mely az eredeti elképzelés szerint átterjed a glutamáterg szinapszisokba, és a magnézium-blokkot kilökve lehetővé teszi az NMDA-receptorok aktiválását, és a kalcium beáramlását. A felnőtt állatok idegsejtjeiben az alacsony klorid-koncentráció miatt a GABA_A-receptor aktiválás hiperpolarizációt okoz, azonban a glutamáterg szinapszisok AMPA-receptorai aktiválhatják az NMDA-receptorokat, beindítva a szinaptikus plaszticitáshoz vezető folyamatokat. (Wang és Kriegstein, J. Neurosci., 2008., a kiadó engedélyével, módosítva)

IV.2.3. Jelen ismereteink az NMDAR-k elhelyezkedéséről a fejlődő agyban

Az egyes receptorok, enzimek, de általánosságban a fehérjék elhelyezkedését, eloszlását célzó vizsgálatok során először azt szükséges megismerni, hogy az adott fehérje mely agyterületeken, esetleg mely sejtekben íródik át. Ennek leggyakoribb módja az ún. hírvivő ribonukleinsav (messenger ribonucleic-acid, mRNS/mRNA) *in situ* hibridizáció, melynek során az adott fehérje már átíródott mRNS-ét mutatják ki a radionukliddal, fluoreszcens festékkel vagy enzimmel jelölt komplementer nukleotidszál segítségével. A következő lépés a fehérje valós elhelyezkedésének megismerése elsősorban immunhisztokémiai módszerek felhasználásával, majd a célmolekula funkciójának igazolása farmakológiai-élettani kísérletekkel. Végül a legpontosabb adatokat a különféle immunarany-technikák és transzmissziós elektronmikroszkópia alkalmazásával lehet kinyerni.

A különböző NMDAR-alegységek eloszlásának alacsony felbontású vizsgálatát elvégezték rágcsálókban mRNS *in situ* hibridizáció során (Watanabe és mtsai 1992; Monyer és mtsai 1992), és fehérje szinten is (Wenzel és mtsai 1997). Ezekből a munkákból kiderült, hogy a GluN1 alegység már a fejlődés korai szakaszától kezdődően jelen van szinte a teljes agyban. A GluN2B alegység ugyancsak minden agyterületen jelen van, viszont a posztnatális második hét után erőteljesen lecsökken a szintje, pont ellenkezőleg, mint a GluN2A alegység esetében, melyből igen kevés fejeződik ki a korai posztnatális időszakban, majd a fiatal felnőttkort elérve tetőzik szintje. Említésre méltó, hogy GluN2-es alegységek szintjében tapasztalható „váltás” párhuzamosan történik a GABA-váltással. Ugyancsak érdekes eredmény, hogy amennyiben genetikai moduláció segítségével elérték, hogy már a fejlődés korai szakaszában is a felnőtt (GluN2A-tartalmú) NMDAR-t fejezzenek ki a sejtek, súlyosan károsodott a hálózatok kialakulása, továbbá születés utáni magas halálozást eredményezett (Wang és mtsai 2011). Ez feltehetőleg a két GluN2-es alegység által meghatározott eltérő receptorkinetikával magyarázható. A fent leírttal megegyező kifejeződési mintázatot – a GluN2-es alegységek váltását is – leírták humán posztmortem agyszövet vizsgálata során is (Law és mtsai 2003). A GluN2C alegység a posztnatális fejlődés késői szakaszában jelenik meg, és akkor is elsősorban a kisagyban. Ezzel ellentétben a GluN2D alegység viszonylag nagy mennyiségben van jelen minden agyterületen a

fejlődés során, azonban a második héttől kezdve szinte csak kéreg alatti területeken fejeződik ki (Akazawa és mtsai 1994). Élettani módszerekkel – patch clamp technikával – az embrionális 16. naptól mutattak ki működő NMDA-receptorokat a kérgi lemezben (LoTurco és mtsai 1991). Működő NMDA-receptorok jelenléte a korai posztnatális időszakban is igazolt (Tyzio és mtsai 1999; Leinekugel és mtsai 1997). Az NMDAR-alegységek nagy felbontású, elektronmikroszkópos vizsgálatával több csoport is foglalkozott. GluN1 és GluN2B alegységek jelenlétét kimutatták már az embrionális 19. napon izolált posztszinaptikus denzitásokban (Swulius és mtsai 2010), illetve mind GluN1, GluN2A és GluN2B alegységeket találtak mind szinaptikusan, extraszinaptikusan, sőt, még növekvő axonokon is (Petralia és mtsai 2004, 2010; Wang és mtsai 2011). Ezen felül AMPA- és NMDA-receptorok együttes vizsgálata során szinaptikus szinten is igazolták a csak NMDAR-t tartalmazó, csendes szinapszisok létezését (Petralia és mtsai 1999). A nagyfelbontású, elektronmikroszkópos vizsgálatoknak azonban jó része sejtkultúrákat vizsgált, és sajnos a legtöbb esetben az eredmények kvantitatív elemzése is elmaradt. Ugyancsak problémát okoz, hogy a fejlődés korai szakaszában – ellentétben a felnőtt állatból származó agyszövettel – kizárólag morfológiai kritériumok alapján nem lehet biztonsággal elkülöníteni a különböző szinapszis-populációkat, és ezekben a munkákban egyetlen egyszer sem végezték el a preszinaptikus végkészülékek neurokémiai azonosítását.

Összességében elmondható tehát, hogy az idegsejt-hálózatok fejlődésében betöltött kiemelten fontos szerepük ellenére nem ismert az NMDAR-k pontos sejtfelszíni helyzete a fejlődés ezen szakaszában, mint ahogy az sem ismert, hogy milyen típusú szinapszisok rendelkeznek ezeket a receptorokkal.

IV.3. Az NO-jelátviteli útvonal szerepe a neuronális hálózatok fejlődése során

IV.3.1. Az NO-jelátviteli útvonalról általában

Az 1970-es években figyelték meg először, hogy a glutamát kalcium-függő módon ciklikus guanozin monofoszfát (cGMP) termelődést idéz elő túlélő agyszeletekben (Ferrendelli és mtsai 1974). Már ekkor felmerült egy, a kalcium-szint

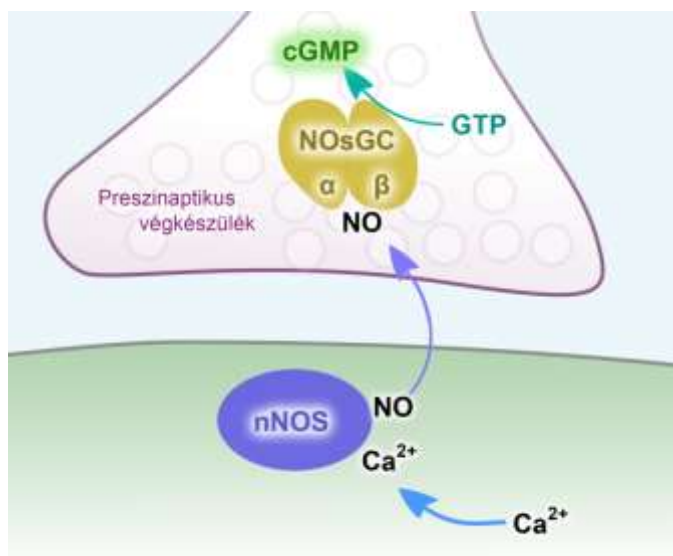
növekedés hatására termelődő jelátvivő anyag lehetősége, mely felelős lehet a cGMP-szintézis beindításáért. Több mint tíz évvel később sikerült kimutatni, hogy ez a molekula a nitrogén-monoxid (NO), mely megegyezik az érrendszer fontos szabályozóanyagával az EDRF-el (endothelium-derived relaxing factor; Garthwaite és mtsai 1988). Azóta kiderült, hogy az NO-jelátvitel több idegi funkcióban fontos szerepet tölt be. Így a légző-, emésztő-, és urogenitális rendszer idegfonataiban hagyományos jelátvivőként működik: a végkészülékből felszabadulva idéz elő simaizom-relaxációt. Ugyanakkora központi idegrendszerben elsősorban retrográd jelátvivőként szerepet játszik a tanulás és memóriafolyamatok kialakulásában és szinaptikus plaszticitás különféle formáiban is (Garthwaite, 2008). A következőkben röviden áttekintem a NO-jelátvitel általános tulajdonságait, így az NO szintézisét, receptorait, lebontását és a központi idegrendszerben betöltött szerepét.

Három nitrogén-monoxid szintáz (NOS) ismerünk, melyek közül kettő – az idegi (neuronális NOS, nNOS) és az endotheliális (eNOS) konstitutívan fejeződik ki, míg a harmadik indukálható (iNOS), és a központi idegrendszerben mikrogliaokban van jelen, főleg kóros állapotokban fejeződik ki. A nitrogén-monoxid szintázok hasonló felépítéssel rendelkeznek, csak néhány doménben térnek el egymástól. Az indukálható NOS oxidációt katalizáló része hem-csoport- és tetrahydrobiopterin-kötőhelyből áll, reduktáz doménje pedig kalmodulin-, flavin-mononukleotid-, flavin-adenin-dinukleotid- és nikotinamid-dinukleotid-foszfát-kötőhelyeket tartalmaz. Az eNOS és nNOS ezen felül a reduktáz doménjükben tartalmazznak egy öngátló-hurkot (autoinhibitory loop), és C-terminális kiegészítő szakaszt is. A három közül a legnagyobb enzim, az nNOS ezeken felül az oxigenáz doménjén egy PDZ motívumot is kifejez (Daff, 2010). Az nNOS két alegység homodimerjeként, tetrahydrobiopterin kofaktort, hem-csoportot és kalcium-kalmodulint kötve veszi fel az aktív konformációt, majd L-argininből oxigén felhasználásával egy köztes terméken keresztül L-citrullint és nitrogén-monoxidot hoz létre. Bár felmerült az eNOS esetleges jelenléte az idegsejtekben, eNOS és nNOS génkiütött állatok segítségével elvégzett *in vivo* kísérletek során bebizonyosodott, hogy az idegsejtekben csak az nNOS van jelen (Blackshaw és mtsai 2003).

Az NO szabadon halad át a sejtek membránján, és fiziológiás (pikomolos-tól az alacsony nanomolos tartományba eső; Hall és Garthwaite, 2009) koncentrációban gyakorlatilag csak specifikus receptorán, a nitrogén-monoxid szenzitív guanilat ciklazon

(NOsGC) keresztül fejt ki hatását, (a patológiás állapotokra jellemző magasabb koncentrációk hatásait a Megbeszélés VIII.3. fejezetében tárgyalom). A NOsGC egy α és egy β alegységből álló heterodimer, mely – mivel a központi idegrendszerben csak α_1 , α_2 és β_1 alegységek fordulnak elő – két alegységösszetétellel lehet jelen: $\alpha_1\beta_1$ és $\alpha_2\beta_1$ (Garthwaite, 2010). Mind az α , mind pedig a β alegységek egy szabályozó, egy dimerizációs és egy katalitikus doménnel rendelkeznek (Domek-Lopacinska és Strosznajder, 2005). A heterodimer hem-csoportja 10000-szer nagyobb affinitással köt NO-t, mint oxigént, és ekkor a bekövetkező térszerkezetváltás hatására az enzim katalitikus aktivitása 200-szorosára növekszik (Koesling és mtsai 2004; Garthwaite, 2010). A keletkezett cGMP több, másodlagos jelátviteli útvonalat indíthat be, melyek a ciklikus-nukleotid-szabályozott csatornák (CNG), protein kináz G (PKG) csoportba tartozó kinázok, és a cGMP lebontásáért is felelős foszfodieszterázok (PDE; Domek-Lopacinska és Strosznajder, 2005). A hippocampusz idegsejtjeiben csak az NOsGC képes cGMP-t létrehozni, szemben a gliasejtekkel, melyek más, peptidekkel aktiválható guanilát-ciklázokat is kifejeznek (Kobialka és Gorczyca, 2000).

Az NO-jelátviteli útvonal elemeit azonosították az agyban mind sejtek szintjén, mind pedig annál nagyobb felbontásban. A glutamáterg szinapszisokban posztszinaptikusan helyezkedik el az nNOS, az NOsGC alegységek pedig mind pre-, mind posztszinaptikusan kifejeződnek (Burette és mtsai 2002). Néhány éve sikeresen kitudtuk mutatni, hogy az nNOS a GABAerg szinapszisok posztszinaptikus oldalán is jelen van a felnőtt rágcsáló hippocampuszában, receptora pedig preszinaptikusan helyezkedik el ugyanezen szinapszisokban (Szabadits és Cserép és mtsai 2007). A retrográd NO-jelátvitel általános molekuláris felépítését a 9. ábra illusztrálja. A retrográd NO jelátviteli pálya szerepét több élettani folyamatban igazolták, mint például a tanulás és memória létrejöttében, tárgyfelismerés, szorongás vagy éppen a függőség kialakulásában (Kleppisch és Feil, 2009). Az NO-jelátvitel szinaptikus plaszticitásban betöltött alapvető szerepe is bizonyítást nyert mára (Bon és Garthwaite, 2003; Kleppisch és Feil, 2009). A nitrogén-monoxid jelátvitel fázisos és tónusos módját egyesítő jelenlegi elgondolást a Megbeszélés VIII.3. fejezetében ismertetem.



9. ábra. A retrográd nitrogén-monoxid (NO) jelátvitel sematikus ábrázolása

A posztszinaptikusan elhelyezkedő neuronális nitrogén-monoxid szintáz (nNOS) kalcium hatására NO-t szabadít fel, mely a preszinaptikus oldalra diffundálva kötődik receptorához, az α és β alegységekből álló,

heterodimer NO-szenzitív guanilat-ciklázhoz (NOsGC), mely GTP bontása során ciklikus guanozin-monofoszfátot (cGMP) szabadít fel. A cGMP másodlagos jelátviteli útvonalakon keresztül módosíthatja a transzmitterfelszabadulást.

IV.3.2. Az NO-jelátviteli útvonal szerepe a fejlődésben

Az NO-jelátviteli rendszer fejlődésben betöltött szerepének meghatározására irányuló kísérletek során bebizonyosodott, hogy a posztnatális fejlődési időszakban, akár a szintézis, akár a receptor szintjén történő beavatkozások komoly morfológiai és szinaptikus eltéréseket okoznak különféle agyterületeken. Az nNOS gátlása a posztnatális 4-6. nap között lecsökkentette a felnőtt állat dendritjeinek hosszát és dendrit-tüskéinek számát mind a prefrontális kéregben, mind pedig a hippocampusban (Morales-Medina és mtsai 2007). Az nNOS-génkiütött állatok gerincvelőjében található motoneuronok denritszerkezete sokkal fejletlenebb volt a vad típusú állatokhoz viszonyítva (Inglis és mtsai 1998). Az NOsGC gátlása a retina mikrohálózatának megfelelő kialakulását is megakadályozta (Leamey és mtsai 2001). Leírták azt is, hogy a cGMP fontos szabályozója az axonok növekedésének, iránykeresésének (Murray és mtsai 2009; Schmidt és mtsai 2002). Az nNOS posztnatális gátlása a felnőtt állat szinapszisainak számát jelentősen lecsökkentette mind a prefrontális kéregben, mind pedig a hippocampusban (Sánchez-Islas és León-Olea, 2004). Nitrogén-monoxid érzékeny fluoreszcens próba túlélő szeleteken történő alkalmazásával kimutatták, hogy

a nagyagykéregben a posztnatális fejlődés során az NO szintézise réteg-specifikusan változik, mégpedig mindig átfed az intenzív szinaptogenezis helyszínével (Imura és mtsai 2004). Ezek az eredmények azt sugallták, hogy az NO-jelátvitel fontos szerepet játszhat a szinaptogenezis folyamatában. Később közvetlenül is bebizonyították, hogy a retrográd NO jelátvitel, és a következményes cGMP-termelődés valóban fontos a szinapszisok kialakulásához. Bár a legtöbb irodalmi adat a morfológiai és szinaptikus fejlődéssel kapcsolatos, viselkedési kísérleteket is végeztek, melyek során megállapították, hogy az nNOS gátlását elegendő a posztnatális 3-5. napok között elvégezni és így az a felnőtt állatok szociális interakcióinak a sérülését okozza (Black és mtsai 2002).

Mindezen eredmények alátámasztják, hogy a retrográd nNOS-NO-NOsGC-cGMP jelátviteli útvonal fontos szerepet játszik a neuronális hálózatok posztnatális fejlődése során, és zavartalan működése feltétele a hálózat megfelelő morfológiai és szinaptikus szerkezetének kialakulásának.

IV.3.3. Jelen ismereteink az NO-jelátviteli útvonal elemeinek elhelyezkedéséről a fejlődő agyban

Az nNOS mRNS jelenlétét alacsony felbontású *in situ* hibridizáció segítségével már embrionális kortól kezdődően kimutatták az agyban (Giuli és mtsai 1994). A nitrogén-monoxid receptor NOsGC $\alpha 1$, $\alpha 2$ és $\beta 1$ alegységének kifejeződését ugyancsak mRNS szinten igazolták a születés előtti időszakból kezdődően, a $\beta 2$ -es alegység azonban nem volt jelen az agyban (Smigrodzki és Levitt, 1996; Giuli és mtsai 1994; Gibb és Garthwaite, 2001). Az NO-indukálta cGMP termelődést a hippocampusban születés utáni első napon kimutatták (Domek-Lopacinska és mtsai 2005), és a cGMP lebontásáért felelős foszfodiesterázok is jelen vannak a fejlődő agyban már az embrionális 15. naptól kezdődően (Van Staveren és mtsai 2003). Az nNOS fehérjét már a korai posztnatális időszakban is ki tudták mutatni a hippocampusban (Chung és mtsai 2004). A nitrogén-monoxid jelátviteli rendszer elemeinek elhelyezkedését vizsgáló, nagyobb felbontású lokalizációs kísérleteket azonban nem végeztek el eddig.

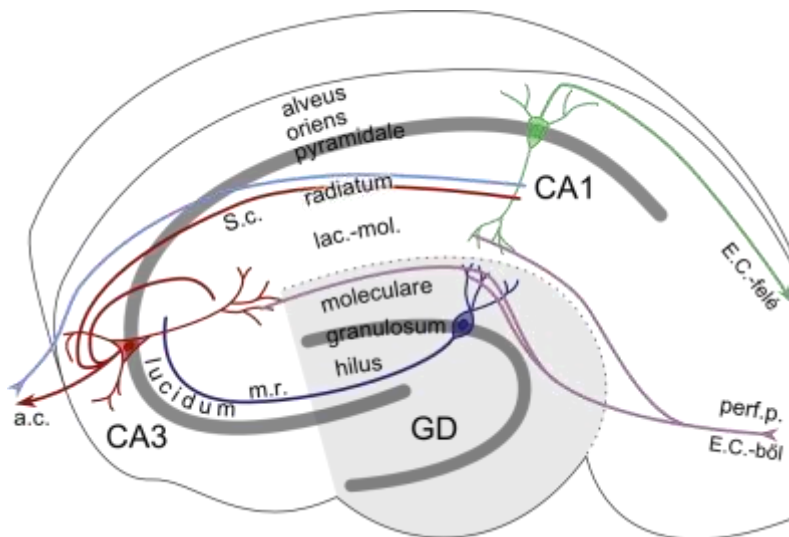
Az idegsejt-hálózatok fejlődésére drámai hatást gyakorol a retrográd NO jelátviteli útvonalba való beavatkozás, igazolva e rendszer fontos szerepét a posztnatális

fejlődés során. Mindezek ellenére nem ismert ezen jelátviteli útvonal molekuláris elemeinek sem sejt-szintű, sem annál nagyobb felbontású pontos elhelyezkedése.

IV.4. A posztnatális hippocampusz

IV.4.1. A hippocampusz felépítése

A hippocampusz a gerincesek agykérgének fontos alkotórésze, a temporális lebenyben helyezkedik el az agy mindkét oldalán. Fontos szerepet játszik többek között a memórianyomok kialakításában, azok érzelmi színezésében, különféle tanulási folyamatokban, a memórianyomok előhívásában és a térbeli tájékozódásban is. Fontos élettani szerepein túl különleges, jól rétegzett szerkezete miatt is fontos területe a legkülönbébb neurobiológiai vizsgálatoknak. A kifejlett rágcsáló hippocampusz szerkezetét a 10. ábra illusztrálja, melyet röviden ismertetek. (Dolgozatomban hippocampusz alatt az ammon-szarvat és a gyrus dentatust együttesen értem.) A hippocampusz szerkezete legegyszerűbben két, egymásba forduló C-alakkal jellemezhető, melyek közül a nagyobbik az ammon-szarv (cornu ammonis, CA; CA1-3 alrégiókkal), a kisebbik pedig a gyrus dentatus.



10. ábra. A hippocampusz felépítése sematikusán ábrázolva

A hippocampusz fő glutamáterg bemenetei és kimenetei. Rövidítések: CA1-3: cornu ammonis 1-3; GD: gyrus dentatus; E.C.: entorhinális kéreg; perf.p.: perforáns pálya;

m.r.: moharostok; S.c.: Schaffer-kollaterálisok; a.c.: az ellenoldali hippocampuszba tartó, illetve onnan érkező (világoskék) asszociációs kommisszurális rostok.

A gyrus dentatus principális sejtjei a szemcsesejtek és a mohasejtek, míg a CA-régiók fősejtjei a piramissejtek. Az ammon-szarv rétegei az alveus, oriens, piramissejtek

rétege, radiatum, lacunosum-moleculare, a gyrus dentatusé pedig a molekuláris réteg, a szemcsesejt-réteg és a hilus (10. ábra). Az alveus főleg myelinizáltpiramissejt-axonokat tartalmaz, az oriensben a piramissejtek bazális, míg a radiatumban apikális dendritjeik helyezkednek el. A sejtestől legtávolabb elhelyezkedő, vékony dendritágaik benyúlnak a lacunosum-moleculare rétegbe. A gyrus dentatusban a szemcsesejtek dendritjei a molekuláris rétegben ágaznak el, axonjaik, illetve a mohasejtek tartózkodnak a hilusban. A CA3 régióban a piramissejt-réteg és a radiatum között található egy vékony réteg, a stratum lucidum. A glutamáterg sejtek kapcsolatrendszere hozza létre a hippocampusz szinaptikus alapszerkezetét, az úgynevezett három-szinapszisos hurkot. A hippocampusz fő bemenete az entorhinális kéreg második-harmadik rétegéből induló perforáns-pálya, mely a szemcsesejtek dendritjein a gyrus dentatus molekuláris rétegének külső kétharmadában, továbbá a CA3 és CA1 piramissejtek disztális dendritjeinvégződik. A szemcsesejtek axonjai képezik a moharostokat, melyek a CA3 piramissejtek proximális dendritjein végződnek a stratum lucidum-ot alkotva. A CA3 piramissejtek axonjai részben komisszurális rostokként az ellenoldali hippocampuszba tartanak, részben a Schaffer Károlyról – magyar orvos, anatómus, 1864-1939 – elnevezett Schaffer-kollaterálisokat alkotva a CA1 piramissejtek dendritjeire érkezők a radiatumban, részben pedig más CA3 piramissejteket idegeznek be rekurrens kollaterálisokkal, melyek fontos szerepet játszanak a populációs szinkron aktivitásmintázatok kialakításában. Végül a CA1 piramissejtek axonjai az entorhinális kéregben átkapcsolódva biztosítják a feldolgozott információ visszajutását a kérgi területekre (Amaral és Witter, 1995; Freund és Buzsáki, 1996). A glutamáterg sejtek működésének térben és időben történő szabályozását a GABAerg interneuronok végzik el, melyek alapvetően hozzájárulnak a szinkron hálózati aktivitások kialakításához is. Legalább huszonegy különféle interneuron-típust lehet elkülöníteni, melyek mind a piramissejtek, mind az interneuronok teljes felszínét ellátják GABAerg bementekkel. Megkülönböztetünk dendritikusan és periszomatikusan gátló interneuronokat, más interneuron gátló interneuron-szelektív interneuronokat, és a hippocampuszból más agyterületekre vetítő neuronokat is. A hippocampusz interneuronjainak tulajdonságait, funkcióit leíró részletes összefoglaló munkák is rendelkezésre állnak (Freund és Buzsáki, 1996; Klausberger és Somogyi, 2008; Bezaire és Soltész, 2013).

Összefoglalva tehát elmondhatjuk, hogy a hippocampusz területét nem csak fontos funkciója helyezte munkánk középpontjába, de különleges szerkezete, és az eddigi kutatások során róla szerzett adatok széleskörű mivolta miatt is ideális modellterülete a neurobiológiai vizsgálatoknak.

IV.4.2. A hippocampusz felépítése a korai posztnatális periódusban

A hippocampusz kifejlődését röviden összefoglaltam a IV.1.1. fejezetben, szükséges azonban, hogy a posztnatális hippocampusz felnőtthez viszonyított, munkám szempontjából kiemelt fontossággal bíró eltéréseit külön ismertessem.

A posztnatális hippocampusz szerkezetének megértéséhez a legfontosabb azt leszögeznünk, hogy egy igen dinamikusan változó rendszerről van szó, melyben intenzíven zajlanak a dendrit- és axonarborizáció és a szinaptogenezis folyamatai. Bár a születés utáni első napon már jelen van a kifejlett hippocampuszra jellemző összes réteg, ezek egymáshoz viszonyított aránya sokat változik a korai posztnatális szakaszban. A születéskor a hippocampusz teljes vastagságának mintegy egynegyedét a piramissejtréteg teszi ki, mely arány a dendritikus régiók (főleg a radiatum) erőteljes növekedéseket követően a harmadik hét végére körülbelül 15%-ra csökken (Bayer, 1980). A fentiekből következik, hogy a principális sejtek túlnyomó többsége már a helyén van a születéskor, azonban morfológiai viszonyaik, illetve hálózat szinaptikus kapcsolatrendszerük még jelentős eltéréseket mutat a felnőtthez viszonyítva.

A különböző interneuron-populációkra jellemző fehérjék késői megjelenése miatt kevés adattal rendelkezünk arra nézve, hogy a fejlődés ezen szakaszában mely interneuron-típusok vannak jelen (Danglot és mtsai 2006). Tovább bonyolítja a helyzetet, hogy egy adott interneuron-populációra jellemző kalciumkötő-fehérje vagy neuropeptid késői kifejeződése nem zárja ki az adott interneuron-típus korábbi jelenlétét. A kérdés pontos megválaszolásához az elegáns „genetikai sors-követés” (genetic fate-mapping) módszer nyújthat segítséget a jövőben (Picardo és mtsai 2011). Az azonban már igazolást nyert, hogy ebben az időszakban jelen vannak olyan, központi szerepet betöltő, nagy területet beidegző GABAerg idegsejtek, melyek ritmikus aktivitásukkal alapvetően meghatározzák a hálózat egészének szinkron működését (Bonifazi és mtsai 2009). Kimutatták azt is, hogy a GABAerg interneuronok

dendrit- és axonális morfológiájának hirtelen bekövetkező jelentős fejlődése pontosan egybeesik a nem-szinaptikus SPA aktivitásmintázatról a szinaptikus SSA mintázatra való váltással (Alléne és mtsai 2012).

Talán a szinaptikus kapcsolatrendszer mutatja a legjelentősebb eltérést a felnőtt hippocampuszhoz viszonyítva. A Bevezetés IV.1.2. fejezetében említésre került a szinapszisok egymást követő megjelenési sorrendje (GABAerg, glutamáterg/NMDA, glutamáterg/NMDA+AMPA; Tyzio és mtsai 1999; Khazipov és mtsai 2001; Fiala és mtsai 1998). Ezzel a sorrenddel teljesen összhangban vannak a különböző szinaptikus fehérjék fejlődés alatti változásait feltáró immunhisztokémiai munkák eredményei. A GABAerg végkészülékek specifikus enzimeit, a glutaminsav dekarboxiláz két izoenzime (GAD65, GAD67) ellen elvégzett immunreakció fény- és elektronmikroszkópos vizsgálata is azt mutatta, hogy már a korai posztnatális időszakban magas a GABAerg szinapszisok száma. Elhelyezkedésük azonban markáns eltérést mutat a felnőttben tapasztalható kifejeződési mintázathoz képest: míg a kifejlett hippocampuszban a GAD elleni immunreakciók a periszomatikus régióban mutatták a legsűrűbb jelölést, a fejlődés során csak elvétve lehetett találni sejttestre érkező GABAerg kapcsolatot, ellentétben a dendritikus régiókkal, ahová a GABAerg szinapszisok legnagyobb hányada érkezett (Dupuy és Houser, 1996). Ezt a felnőttől merőben eltérő eloszlást saját vizsgálataink is igazolták.

A GABAerg végkészülékek korai, nagy számú jelenléte mellett azonban a glutamáterg szinapszisokra jellemző preszinaptikus 1-es típusú vezikuláris glutamát-transzporter (vGluT1) kifejeződése kezdetben alacsony, majd erőteljes növekedést mutat a születés utáni 5-12. napok között (Bogen és mtsai 2009). A szinapszisok elhelyezkedését érintő fontos eltérés az is, hogy az intenzív szinaptogenezis során a fejlődő glutamáterg szinapszisok először a dendrittörzsre érkeznek, majd későbbi érésük után már csak a klasszikus dendrittüskéken találhatóak (Fiala és mtsai 1998). Pontosán a dendrittörzsre érkező glutamáterg szinapszisok miatt, illetve mivel a szinapszisok posztszinaptikus denzitásának vastagsága nagy változatosságot mutat a posztnatális fejlődés során, a kétféle szinapszis-típus nem különíthető el morfológiai kritériumok alapján ebben az időszakban.

A szinapszisok működését érintő további jelentős eltérés, hogy a fejlődés korai posztnatális szakaszában a sejtközötti tér arányait tekintve nagyobb, mint felnőttben,

ezáltal komolyan befolyásolva a diffúziós viszonyokat (Thomas és mtsai 2011). Ez feltehetőleg összefüggésben áll az asztrociták mennyiségének fokozatos növekedésével, melyek csak a 30. nap környékére érik el a felnőttre jellemző számot (Catalani és mtsai 2002). A GABAerg szinapszisok működését illető legfontosabb eltérést, a GABA-váltást, illetve a háttérben álló molekuláris folyamatokat a Bevezetés IV.1.2. fejeztében részletesen ismertettem.

Mindezeket összefoglalva elmondható, hogy a hippocampusz az első posztnatális hét vége felé egy dinamikusan változó, intenzív szinaptogenezist mutató szerkezet, melyben a dendritikus régiókba (elsősorban a radiatumba) érkező GABAerg bemenetek alapvetően hozzájárulnak a depolarizáció biztosításához, ezáltal megteremtve az aktivitás-függő fejlődési folyamatokhoz nélkülözhetetlen szinkron aktivitás alapját. Ebben az időszakban – bár a hippocampusz felnőttre jellemző rétegei már jelen vannak – alapvető morfológiai, ultrastrukturális és molekuláris változások történnek az idegsejtek felépítésében.

V. CÉLKITŰZÉSEK

1. A neuronális hálózatok kifejlődésében elengedhetetlen szerepet játszó spontán szinkron aktivitás kialakításában alapvető fontossággal bírnak az NMDA-receptorok, illetve az NMDA-GABA jelátviteli rendszerek együttműködése. Mégis, mindezidáig nem volt ismert a fejlődés ezen kritikus szakaszában az NMDA-receptorok pontos sejtfelszíni eloszlása, így az sem, hogy a depolarizáció fő forrásaként szolgáló GABAerg szinapszisokhoz viszonyítva hol található NMDAR-k. Ebben az összefüggésben korábbi eredményeink, melyek szerint a felnőtt egér hippocampusának GABAerg szinapszissai tartalmazzak NMDA-receptorokat, még fontosabbá tették ezt a kérdést.

Ezért első kísérletsorozatunkban szeretnénk volna meghatározni az NMDA-receptorok pontos sejtfelszíni eloszlását a posztnatális fejlődés azon szakaszában, amikor az első, szinapszis-vezérelt, szinkron hálózati aktivitás a legerőteljesebb. Ehhez a következőket szeretnénk volna megvizsgálni:

- Milyen szinapszisok és mekkora arányban tartalmazzak NMDA-receptorokat a posztnatális fejlődés során?
- Pre- vagy posztszinaptikus az NMDA-receptorok elhelyezkedése ezekben a szinapszisokban, esetleg mindkettő?
- Receptorsűrűség kvantitatív összehasonlítása a különböző szinapszisok illetve extraszinaptikus területek között.

2. A fejlődés során megjelenő spontán szinkron aktivitást elsősorban az – ekkor még – depolarizáló GABAerg, és az ugyancsak depolarizáló glutamaterg transzmisszió hozza létre. Bár a GABAerg rendszer képes söntölésen keresztül valamekkora gátlást is kifejteni, feltehető, hogy a hálózatnak rendelkeznie kell valamiféle hatékony, az aktivitást érzékelő, mintegy arra reagáló, negatív visszacsatolást közvetítő szabályozórendszerre, elkerülendő a túlszerkentettség állapotát. A retrográd nitrogén-monoxid rendszer ideális lehetne ennek a feladatnak az ellátására, de ezen rendszer elemeit sejt-szinten illetve annál nagyobb felbontásban még nem írták le a fejlődés során. Ezért a második kísérletsorozat során arra voltunk kíváncsiak, vajon a szinaptikus

retrográd nitrogén monoxid jelátvitel szabályozhatja-e a szinapszisok működését illetve a spontán szinkron aktivitást a posztnatális fejlődés során. Ehhez a következő kérdésekre kerestük a választ:

- Az nNOS jelen van-e a fejlődő agy GABAerg és glutamaterg szinapszisaiban?
- Hol van NO-receptor a GABAerg és glutamaterg szinapszisok környezetében?
- Képes-e az NO-receptor NO hatására cGMP-t termelni a fejlődő agy a GABAerg és glutamaterg szinapszisaik környezetében?
- Képes-e az NO rendszer befolyásolni a GABAerg szinapszisok illetve a glutamaterg szinapszisok működését a fejlődés során?
- Képes-e az NO rendszer az spontán szinkron aktivitást (SSA-t) szabályozni?

VI. MÓDSZEREK

VI.1. Etikai állásfoglalás

Minden kísérletet a Magyar Tudományos Akadémia Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet (MTA KOKI) Intézeti Etikai Kódexe és a kísérleti állatok védelméről szóló hatályos Magyar törvény alapján végeztük, melyek egyetértésben vannak az Európai Közösség által 1986. november 24-én elfogadott irányelvekkel (86/609/EEC). Az MTA KOKI Állatkísérleti Bizottsága, és a Fővárosi Állategészségügyi Bizottság a kísérleteket a 2302/003/FÖV/2006 számon engedélyezte.

VI.2 Vizsgálati időszak kiválasztása

A vizsgálati időszak kiválasztása során több szempontot is figyelembe kellett vennünk. A posztnatális fejlődésnek azt a szakaszát szerettük volna vizsgálni, mely során a GABAerg depolarizáció képes az NMDAR-k aktiválására, azaz mindenképpen a GABA-váltás előtti időablakra volt szükségünk. A másik fontos kritérium az volt, hogy a vizsgált időszak lehetőség szerint egybeessen a spontán szinkron aktivitás maximumával. Az általunk is vizsgált hippocampális piramissejtek esetében egérben a GABA-váltás a posztnatális 12-16. nap között történik meg (Banke és McBain, 2006; Stein és mtsai 2004). A spontán szinkron aktivitás a legerőteljesebben mind a nagyagykéregben, mind pedig a hippocampusban a posztnatális 6-9. napok között volt jelen (Alléne és mtsai 2008; Crépel és mtsai 2007). A posztnatális 7-9. napok közötti időszak mindkét feltételnek való megfelelést is bizonyították, hiszen ebben az időablakban *in vivo* megfigyelhető volt a SSA, mely az NKCC1-gátló bumetanid hatására reverzibilisen eltűnt (Sipilä és mtsai 2006). Mindezek figyelembevételével a születés utáni 6-9. nap közötti szakaszt találtuk alkalmasnak vizsgálatainkhoz.

VI.3. Állatok kezelése, szövetek előkészítése az anatómiai kísérletekhez

Az első kísérletsorozat során 14 hat-hét napos (P6-7) hím C57BL/6 egeret, a második kísérletsorozat során pedig huszonkét, ugyanezen törzsbe tartozó, négy és tizennégy napos kor közötti (P4-14) hím egeret, illetve két hím és egy nőstény hat napos (P6) nNOS-génkiütött (nNOS -/-) egeret használtunk fel. Az állatokat izoflurán belélegeztetésével majd a hasüregbe adott altató keverék befecskendezésével (0.1-0.2

ml) érzéstelenítettük, mely 8.3mg/ml ketamint, 1.7 mg/ml xylazin-hidrokloridot és 0.8 mg/ml prometazinium-kloridot tartalmazott fiziológias sóoldatban.

Az állatokat szíven keresztül perfundáltuk egy percig 0.9%-os nátrium-klorid oldattal, majd negyven-hatvan percig fixáló oldattal, ezt követően pedig 0.1 mólos foszfát-pufferrel (0.1 M PB) tíz percent keresztül. A fixáló oldat az első kísérletsorozatban az NMDA-receptorok megjelöléséhez felhasznált állatok esetében 4% frissen beoldott paraformaldehidet tartalmazott, kivéve a szinapszisok méretének meghatározásához használt, beágyazás előtti vGluT1-immunperoxidáz és GAD-immunperoxidáz egyes reakciók esetében, ahol ezt 0.25% glutáraldehiddel egészítettük ki. A második kísérletsorozatban az nNOS megjelöléséhez a fixáló oldat 1% paraformaldehidet tartalmazott, az NOsGC alegységek megjelöléséhez pedig 4% paraformaldehidet. A fixáló oldatokat minden esetben 0.1 M foszfát-pufferben készítettük el, melynek pH-értékét 7.4-re állítottuk. A perfúziók után az agyakat eltávolítottuk, majd a dorzális hippokampuszokat tartalmazó szövetdarabokat vágunk ki. Ezekből koronális metszeteket készítettünk egy vibratóm segítségével (VT1000S vagy VT1200S, Leica, Németország). A szeletek vastagsága 40-60 μm volt az immunfluoreszcens kísérletekhez, 70-80 μm a beágyazás előtti elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz, és 300 μm a fagyasztva-dehidráálással egybekötött alacsony-hőmérsékletű beágyazáshoz. Minden beágyazás előtti kísérletben, melyben NMDA-receptorokat jelöltünk, a szövetet pepszines emésztésnek vetettük alá az epitóp feltárásának céljából. A többi reakcióban nem használtunk pepszint. A második kísérletsorozatban a metszeteket 10 majd 30%-os cukoroldatban inkubáltuk, majd folyékony nitrogén felett kétszer megfagyasztottuk. A metszeteket az immunhisztokémiai reakciók megkezdése előtt 0.1 M PB-ben alaposan átmostuk.

VI.4. Fiziológiai szeletek készítése

Túlélő szeletek készítéséhez öt-nyolc napos (P5-P8) állatokat használtunk. Az állatokat az engedélyezett leghumánusabb protokollt használva (hipotermia) érzéstelenítettük, majd lefejezésük után az agyakat jéghideg vágóoldat alatt eltávolítottuk, és koronális vagy horizontális szeleteket készítettünk egy vibratóm segítségével (VT1200S) ugyancsak jéghideg vágóoldat alatt. Az oldat a következőket tartalmazta (az értékek mM-ban értendők): 252 szaharóz, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 5

MgCl₂, 0.5 CaCl₂, 26 NaHCO₃ és 10 glükóz. A vágóoldatot karbogén gázzal (95% O₂/5% CO₂) buborékoltattuk. 300 µm vastag szeleteket készítettünk a cGMP-immunhisztokémiai kísérletekhez, és 450 µm vastag szeleteket az *in vitro* elektrofiziológiai illetve multineuron kalcium képkalkotási kísérletekhez. A szeleteket a kísérletek előtt egy órán keresztül karbogénnel buborékoltatott mesterséges agygerincvelői folyadék(ACSF) felszínén, párakamrában inkubáltuk, szobahőmérsékleten. Az ACSF mM-ban a következőket tartalmazta: 126 NaCl, 3.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 1.3 MgCl₂, 2 CaCl₂, 26 NaHCO₃ és 10 glükóz. Az elektrofiziológiai és multineuron kalcium képkalkotási kísérletekhez a szeleteket alámerített típusú, kettős-átfolyású kamrákba helyeztük (Hájos és mtsai 2009). A cGMP-immunhisztokémiai kísérletekhez a szeleteket steril, 12 kamrával ellátott sejt kultúra-tálakba helyeztük. Minden kamra 1 mL ACSF-et tartalmazott, melyhez 1 mM 3-izobutil-1-metilxantint (IBMX) és 100 µM BAY-73 6691-t adtunk a foszfodieszteráz (PDE) aktivitás legátlása céljából. A kamrákat egyenként, egyenlő mértékben buborékoltattuk karbogén gázzal. A három állatból származó szeleteket szétosztottuk kontroll (CTRL-), nátrium-nitroprusszid-(SNP-) és oxadiazolo-quinoxalin-one (ODQ) + SNP-kamrákra. Nem adtunk drogot a kontroll kamrákhoz, 10 µM ODQ-t adtunk az ODQ + SNP-kamrákhoz, és harminc perc múlva 0.2 mM SNP-t adtunk az SNP- és az ODQ + SNP-kamrákhoz. Az SNP hozzáadása után további tíz percig inkubáltuk a szeleteket, majd a kamrákban levő oldatokat gyorsan jég hideg, 4%-os paraformaldehid oldatra cseréltük. A szeleteket az immunhisztokémiai reakciók megkezdése előtt ugyanebben az oldatban utófixáltuk 48 órán keresztül, 4 °C-on.

VI.5. Antitestek

Az első kísérletsorozatban használt antitesteket az 1. Táblázatban foglaltam össze. A GABAerg végkészülékek megjelölésére két ellenanyagot használtunk. Az első egy egérben termeltetett monoklonális antitest volt, mely a glutaminsav-dekarboxiláz 67 kD molekulásúlyú izoenzimének (GAD67) 4-101 aminosav-szekvenciája ellen készült (Millipore, MAB5406, 1G10.2-es klón). Az antitest specificitását korábban bizonyították (Fong és mtsai 2005). A másik ellenanyag egy juhban termeltetett poliklonális antitest volt (1440-es számú GAD65/67 ellenes antitest; Oertel és mtsai 1981a, 1981b), mely a glutaminsav-dekarboxiláz 65 és 67 kD molekulásúlyú

izoenzimeit ismeri fel specifikusan (Martin és mtsai 1991). A glutamáterg végkészülékek szelektív megjelöléséhez két, az 1-es típusú vezikuláris glutaminsav transzporter (vGluT1) elleni antitestet használtunk. Az első egy tengerimalacban termeltetett poliklonális antitest volt, melynél az immunizálást egy a vGluT2-vel nem átfedő, szintetikus vGluT1 peptid-szakasszal végezték (Millipore, AB5905). Az antitest specificitását korábban bizonyították. Kimutatták, hogy egy jól ismert, nyúlban készült vGluT1-ellenes antitesttel azonos jelölést adott (Melone és mtsai 2005). A glutamáterg végkészülékek megjelölésére használt másik ellenanyag egy nyúlban készült vGluT1-ellenes antitest volt (kat. sz.: 135 303, aa 456-560, Synaptic Systems), melyet korábban ugyancsak karakterizáltak, és az AB5905-ös antitesttel azonos jelölést kaptak (Todd és mtsai 2003). A szinapszisok megjelöléséhez egy egerben készült monoklonális anti-Bassoon ellenanyagot használtunk. A Bassoon egy preszinaptikus citoskeletális fehérje (tom Dieck és mtsai 1998), mely mind a glutamáterg, mind pedig a GABAerg szinapszisokban jelen van (Richter és mtsai 1999). Az antitest (Abcam, SAP7F-es klón) specificitását génkiütött (KO) eger felhasználásával igazolták (Dick és mtsai 2003). Az NMDA-receptorok jelölését a GluN1, GluN2A és GluN2B alegységek C-terminusa ellen nyúlban termeltetett antitestekkel végeztük. Ezen antitestek specificitását széleskörű vizsgálatokkal igazolták, immunoblottolás, antigén peptidek, teljes génkiütött illetve feltételes génkiütött állatok felhasználásával mind beágyazás előtti, mind pedig beágyazás utáni immunreakciók során (Fukaya és mtsai 2003; Abe és mtsai 2004; Akashi és mtsai 2009; Watanabe és mtsai 1998). Az immunfluoreszcens kísérleteink illetve a kettős immunarany-immunperoxidáz reakcióink során az antitestek specificitásának tesztelésekor alkalmazottal teljesen megegyező pepszines epitóp-feltárási eljárást használtunk (Watanabe és mtsai 1998). Ezen kívül a különböző, GluN1, GluN2A és GluN2B alegységek elleni immunarany jelölés azonos eloszlást mutatott a szövetben. Ezeken az ellenanyagokon kívül használtunk egy, az NMDA-receptor sejten kívül elhelyezkedő szakasza elleni eger monoklonális antitestet (Millipore, MAB363, 54.1-es klón). Ennek az antitestnek a specificitását olyan génkiütött állatokon igazolták, melyek kérgi piramissejtjeiből hiányzott csak a GluN1 gén (Tarusawa és mtsai 2009). A GABA_A-receptorok megjelölésére egy, a receptor $\beta 3$ alegysége ellen tengerimalacban termeltetett antitestet

használtunk, melyet Japánban, Ryuichi Shigemoto laboratóriumában állítottak elő (Kasugai és mtsai 2010).

I. táblázat. Az első kísérlet sorozat során használt elsődleges és másodlagos ellenanyagok

Elsődleges antitestek									
Gazdaállat	Antigén	Fehérje konc.	Fluoreszcens	Beágy. előtt.	Beágy. után.	Forrás	Molekula		
egér	GAD67	1000 µg/mL	-	1:3000	-	Millipore, MAB5406, klón: 1G10.2	teljes IgG		
juh	GAD65 67	nem elérhető	1:10000	-	1:50	Oertel és mtsai., Ab. No. 1440	teljes IgG		
tengerimalac	vGluT1	nem elérhető	1:8000	1:10000	-	Millipore, AB5905	teljes IgG		
nyúl	vGluT1	1000 µg/mL	-	-	1:500	SynapticSystems, kat. sz.: 135 303	teljes IgG		
egér	Bassoon	1000 µg/mL	1:5000-1:8000	-	-	Abcam, ab82958, klón: SAP7F407	teljes IgG		
nyúl	GluN1	720 µg/mL	1:500	1:400	1:30	Prof. Masahiko Watanabe, C2-kazetta	teljes IgG		
nyúl	GluN2A	542 µg/mL	-	1:400	-	Prof. Masahiko Watanabe, C-term.	teljes IgG		
nyúl	GluN2B	264 µg/mL	-	1:400	-	Prof. Masahiko Watanabe, C-term.	teljes IgG		
egér	GluN1	1000 µg/mL	1:500	-	-	Millipore, MAB363, klón: 54.1	teljes IgG		
tengerimalac	G-AB-A _α R β3	szérum	1:800	-	-	Prof. Ryuichi Shigemoto, C-term.	teljes IgG		
nyúl	G-AB-A _α R γ2	1000 µg/mL	1:4000	-	-	SynapticSystems, kat. sz.: 224 003	teljes IgG		
Másodlagos antitestek									
Konjugálva	Gazdaállat	Milyen állat ellen van termeltetve?	Hígítás	Forrás	Molekula				
DyLight 405	szamár	tengerimalac	1:400	Invitrogen	teljes IgG				
Alexa 488	szamár	nyúl	1:400	Invitrogen	teljes IgG				
Cy3	szamár	egér	1:1000	Invitrogen	teljes IgG				
Alexa 647 – sztreptavidin (nem antitest)			1:1000	Invitrogen	sztreptavidin				
biotin	szamár	juh	1:1000	Jackson Laboratories	teljes IgG				
biotin	szamár	tengerimalac	1:200	Vector Laboratories	teljes IgG				
biotin	szamár	egér	1:200	Vector Laboratories	teljes IgG				
1-4 nm-es arany szemcse	kecske	nyúl	1:200	Nanoprobes	Fab-törredék				
10 nm-es arany szemcse	kecske	nyúl	1:100	British Biocell Internat.	teljes IgG				
6 nm-es arany szemcse	szamár	juh	1:100	Aurion	teljes IgG				

A másik GABA_A-receptor elleni antitestünk egy nyúlban készült poliklonális ellenanyag volt, melyet a receptor $\gamma 2$ alegysége ellen termeltettek (SynapticSystems, immunizáló szekvencia: aa 39-67, kat. sz.: 224 003). Ennek az antitestnek a specificitását a GABA_A-receptor $\gamma 2$ alegységének transzgenikus törlésével igazolták (Acsády László személyes közlése, Budapest, 2012).

A második kísérletsorozatban használt antitesteket a 2. Táblázatban foglaltam össze. Az nNOS megjelöléséhez egy nyúlban készült poliklonális antitestet használtunk (ZymedLaboratories, kat. sz.: 61-7000), melynek specificitását korábban is igazoltuk (Szabadits és Cserép és mtsai2007). Ezeket a kontroll vizsgálatokat megismételtük 6 napos, nNOS génkiütött állatból származó agyszöveten is, ahol semmiféle jelölést nem kaptunk. A GABAerg végkészülékek megjelölésére egy egér monoklonális antitestet használtunk, mely a glutaminsav-dekarboxiláz 65 kD molekulásúlyú izoenzimét (GAD65) ismeri fel (Millipore, kat. sz.: MAB351). Ezt az ellenanyagot korábban karakterizálták, és specificitását igazolták (Chang és Gottlieb 1988). Az NOsGC alegységeinek megjelöléséhez nyúlban termeltetett poliklonális ellenanyagokat használtunk, NOsGC $\alpha 1$ -ellenes (Sigma-Aldrich, kat. sz.: G4280) és NOsGC $\beta 1$ -ellenes antitestet (Cayman Chemical, kat. sz.: 160897). Ezeknek az antitesteknek a specificitását kolokalizációs és hírvivő-RNS (mRNS) in situ hibridizációs vizsgálatokkal igazoltuk (Szabadits és Cserép és mtsai2007). A ciklikus guanozin-monofoszfát (cGMP) kimutatását juhban termelt cGMP-ellenes antitesttel végeztük, melyet Jan de Vente laboratóriumában állítottak elő. Ennek az antitestnek a specificitását korábban igazolták (de Vente és mtsai 1987; Tanaka és mtsai 1997).

A többszörös jelölések során használt másodlagos antitestek közötti esetleges keresztreakciók kizárásának érdekében széleskörű vizsgálatokat végeztünk el, de keresztreakciót egyetlen esetben sem tapasztaltunk. Az elsődleges antitestek elhagyása esetén sem kaptunk jelölést. A beágyazás utáni kontroll immunarany kísérletekben az arannyal kapcsolt másodlagos antitestek elsődleges antitestek hiányában egyáltalán nem kötődtek be. A beágyazás előtti kontroll immunarany kísérletekben az 1.4 nm-es arannyal kapcsolt, kecskében termeltetett nyúl-ellenes Fab-antitesttöredék (NanoProbes) kötődését vizsgáltuk elsődleges antitest elhagyásával. Ez a másodlagos antitest 1:100-as hígításban csak 0.006 arany szemcse/ μm lineáris sűrűséget adva kötődött, mely két nagyságrenddel kisebb, mint a legalacsonyabb észlelt szinaptikus immunarany sűrűség.

2. táblázat. A második kísérletsorozat során használt elsődleges és másodlagos ellenanyagok

Elsődleges antitestek							
Gazdaállat	Antigén	Fehérje konc.	Fluoreszcens	Beagy. előtt.	Forrás	Molekula	
nyúl	nNOS	250 µg/mL	-	I:400(arany) I:5000(DAB)	Zymed Laboratories, kat. sz.: 61-7000	teljes IgG	
egér	GAD65	1000 µg/mL	I:250	I:250-I:1000	Millipore, kat. sz.: MAB351, klón:GAD6	teljes IgG	
nyúl	NOsGC alfa1	~1000 µg/mL	-	I:1000	Sigma-Aldrich, kat. sz.: G4280	teljes IgG	
nyúl	NOsGC béta1	~600 µg/mL	-	I:2000	Cayman Chemical, kat. sz.: 160897	teljes IgG	
juh	cGMP	nem elérhető	I:4000	-	Prof. Jan de Vente	teljes IgG	
Másodlagos antitestek							
Konjugálva	Gazdaállat	Milyen állat ellen van termeltetve?	Hígítás	Forrás	Molekula		
Alexa 488	szamár	juh	I:200	Invitrogen	teljes IgG		
Alexa 594 – sztreptavidin (nem antitest)	szamár (nem antitest)		I:200	Invitrogen	sztreptavidin		
biotin	szamár	nyúl	I:1000	Jackson Laboratories	teljes IgG		
biotin	szamár	egér	I:200(fluo) I:1000(DAB)	Jackson Laboratories	teljes IgG		
I 4 nm-es arany szemese	kecske	nyúl	I:150	Nanoprobes	Fab-török		
I nm-es arany szemese	kecske	egér	I:160	Aurion	teljes IgG		

VI.6. Immunfluoreszcens jelölés és konfokális lézer-pásztázó mikroszkópia

Az NMDA-receptorok szinapszisokban való detektálásához a szövetet pepszines kezelésnek kell alávetni (Watanabe és mtsai 1998). Ezért az ezen receptorok eloszlását vizsgáló immunfluoreszcens kísérletek során a metszeteket alapos foszfát-pufferes mosás után 1 mg/ml pepszint (Dako) tartalmazó 0.2 M HCl oldattal kezeltük 37°C-on 2-5 percig. Ezt követően PB-ben és tris-pufferelt fiziológiás sóoldatban (TBS) mostuk a metszeteket, majd egy órán keresztül TBS-ben oldott 1%-os humán szérum albumin (HSA, Sigma) oldattal blokkoltuk. Ezután a metszeteket elsődleges antitestek oldataiban inkubáltuk egy éjszakán keresztül, szobahőmérsékleten. A négyes-jelölések során a következő antitestek keverékét alkalmaztuk: tengerimalac anti- v GluT1 (1:8000), juh anti-GAD65/67 (1:10000), egér anti-Bassoon (1:8000) és nyúl anti-GluN1 (1:400), TBS-ben hígítva. Az NMDA-receptorok és GABA_A-receptorok közvetlen kolokalizációjához hármas- és kettős-jelöléseket végeztünk el. A hármas-jelölés során a következő elsődleges antitestek keverékét használtuk: egér anti-Bassoon (1:5000), nyúl anti-GluN1 (1:500) és a GABA_A-receptor β 3 alegysége elleni tengerimalac antitestet (1:800). A kettős-jelölés során pedig az egér anti-GluN1 (1:500) és a GABA_A-receptor γ 2 alegysége elleni antitestet (1:4000). Az elsődleges ellenanyagokkal való inkubálás után a metszeteket TBS-ben mostuk, majd a négyes-jelölésben résztvevő metszeteket 4 órán keresztül kezeltük biotinilált számarban termeltetett juh-ellenes antitesttel (1:1000, Jackson Laboratories), melyet TBS-ben hígítottunk ki. További, TBS-ben történő mosások után a metszeteket 4 órán keresztül a következő reagensek TBS-ben kihígított keverékével kezeltük: DyLight 405-tel jelölt, számarban készült tengerimalac-ellenes (1:400, Invitrogen), Alexa488-cal jelölt számarban készült nyúl-ellenes (1:400, Invitrogen), Cy3-mal jelölt számarban készült egér-ellenes antitest (1:1000, Invitrogen) és Alexa647-tel jelölt sztreptavidin (1:1000, Invitrogen). A hármas-jelölés során a következő másodlagos antitesteket használtuk: DyLight 405-tel jelölt tengerimalac-ellenes számar (1:400), Alexa488-cal jelölt nyúl-ellenes számar (1:400) és Cy3-mal jelölt egér-ellenes számar antitestet (1:1000); a kettős-jelölés során pedig Alexa488-cal jelölt nyúl ellenes számar (1:400) és Cy3-mal jelölt egér ellenes számar antitestet (1:1000). Ezt követően a metszeteket TBS-ben, majd PB-ben mostuk, végül pedig

tárgylemezre szedtük ki és Aqua-Poly/Mount-talftük le (Polysciences). Az immunfluoreszcens jel vizsgálatához egy Nikon Eclipse Ti-E inverz mikroszkópot használtunk (Nikon Instruments Europe B.V., Amsterdam, Hollandia), CFI Plan Achromat VC 60XH olaj immerziós objektívvel (numerikus apertúra: 1.4) és A1R konfokális lézer-rendszerrel. 405, 488, 561 és 642 nm hullámhosszúságú lézereket használtunk (CVI Melles Griot), a pásztázást pedig soronkénti csatornaváltással végeztük. A képsorozatot a NIS-Elements AR szoftver segítségével gyűjtöttük, és Huygens Professional szoftverrel végeztük el a dekonvolúciót (www.svi.nl).

A második kísérletsorozatban a droggal kezelt túlélő szeletekben történt cGMP-termelés vizsgálatához használtunk immunfluoreszcens jelölést és konfokális lézer pásztázó mikroszkópiát. A fixált szeleteket PB-ben mostuk, 2%-os agarba ágyaztuk, majd 50 µm vastagságúra újraszéleteltük egy Leica VT1000S vibratóm segítségével. További PB-ben és 0.3% Triton X-100-at tartalmazó TBS-ben (TBST; Sigma) történő mosások után a metszeteket 45 percen keresztül blokkoltuk 10% normál szamar szérumot tartalmazó TBST-ben (Vector Laboratories). Ezt követően a metszeteket 4 °C-on 48 órán keresztül elsődleges antitestek oldatával inkubáltuk, melynek összetétele a következő volt: cGMP-elleni juh (1:4000) és GAD65-elleni egér antitest (1:250) TBS-ben kihígítva. A metszeteket ezután TBS-ben mostuk, majd 24 órán keresztül biotinilált egér-elleni szamar antitest (1:200) TBS-ben hígított oldatával kezeltük. Újabb TBS-ben történő mosások után a metszeteket 24 órán keresztül a következő másodlagos reagensek oldatával kezeltük: Alexa Fluor 488-cal jelölt juh-elleni szamar antitest (1:200) és Alexa Fluor 594-gyel jelölt sztreptavidin (1:200), TBS-ben hígítva. Ezután újabb TBS-ben, majd PB-ben történő mosások következtek, végül pedig a metszeteket tárgylemezre szedtük ki és Aqua-Poly/Mount-talftük le. Az immunfluoreszcens jelet ebben az esetben egy Olympus Optical FluoView300 konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal vizsgáltuk, csatornánkénti sorozat-pásztázó üzemmódban.

VI.7. Beágyazás előtti immun-elektronmikroszkópia

A glutamáterg és GABAerg szinapszisok méretének meghatározásához immunperoxidáz reakciókat végeztünk el. Kizárólag ezekben a kísérletekben használtunk erősen fixált szövetet (4% paraformaldehiddel és 0.25% glutáraldehiddel

fixálva), majd PB-ben és TBS-ben mostuk a metszeteket. Pepszines feltárást nem végeztünk. Ezt követően egy órán keresztül TBS-ben oldott 1%-os humán szérumban albumin oldattal blokkoltuk a mintákat, és tengerimalac anti-vGluT1 (1:10000) vagy egér anti-GAD67 (1:3000) ellenanyagok TBS-ben kihígított oldatával inkubáltuk őket 48 órán keresztül. Ezt TBS-ben való mosás követte, majd egy 24 órás inkubálás vagy biotinilált tengerimalac-ellenes szamar (1:200, Vector Laboratories), vagy pedig biotinilált egér-ellenes szamar (1:200, Jackson Laboratories) ellenanyagok TBS-ben hígított oldatában. A metszeteket TBS-ben mostuk, és TBS-ben hígított Elite ABC-vel (1:300, Vector Laboratories) kezeltük 3 órán keresztül. Ezután a metszeteket TBS-ben és 7.6 pH-jú Tris-pufferben (TB) mostuk, majd az immunperoxidáz reakciót 3,3-diaminobenzidinnel (DAB, Sigma-Aldrich) jelenítettük meg. További mosások után a metszeteket ozmiummal kezeltük, és dehidráltuk.

A különböző NMDA-receptor alegységek vizsgálatát célzó, kombinált immunarany-immunperoxidáz jelölések során 4% paraformaldehiddel kezelt szövetet használtunk, melyet a fent leírt módon pepszines kezelésnek vetettünk alá. PB-ben és TBS-ben mostuk a metszeteket, majd egy órán keresztül TBS-ben oldott 1%-os HSA oldattal blokkoltuk azokat. A metszeteket 48 órán keresztül inkubáltuk a következő elsődleges antitestek oldatával: tengerimalac anti-vGluT1-et (1:10000) vagy egér anti-GAD67-et (1:3000) kevertünk össze nyúlban termeltetett anti-GluN1-el (1:400), vagy anti-GluN2B-vel (1:400), vagy anti-GluN2A-val (1:400). TBS-ben történő ismételt mosásokat követően a metszeteket egy órán keresztül blokkoló oldattal (Gel-BS) kezeltük, mely 0.5% hidegvízi hal bőréből kivont zselatint (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) és 0.5% HSA-t TBS-ben oldva. Ezután a metszeteket 24 órán keresztül másodlagos antitestek oldatával kezeltük, melyek Gel-BS-ben voltak kihígítva, a következőképpen: 1.4 nm-es arannyal jelölt nyúl-ellenes kecske Fab-töredék (1:200, NanoProbes) vagy biotinilált tengerimalac-ellenes szamar (1:200, Vector Laboratories) vagy pedig biotinilált egér-ellenes szamar (1:200, Jackson Laboratories) antitesttel kombinálva. Alapos TBS-ben és PB-ben történt mosások után a metszeteket 2% glutáraldehidet tartalmazó PB-vel kezeltük 15 percen keresztül, hogy az aranszemcséket a szövetbe rögzítsük. A metszeteket PB-ben, majd TBS-ben mostuk, és TBS-ben hígított Elite ABC-vel (1:300, Vector Laboratories) kezeltük 3 órán keresztül. Ezután a TBS-ben és 7.6 pH-jú Tris-pufferben (TB) mostuk azokat, majd az immunperoxidáz reakciót 3,3-

diaminobenzidinnel (DAB, Sigma-Aldrich) jelenítettük meg. A metszeteket TBS-ben és intenzifikálást előkészítő oldattal kezeltük (ECS, Aurion), majd az immunarany jelölést ezüstözőoldat (SE-EM, Aurion) segítségével erősítettük fel 40-60 percen keresztül, szobahőmérsékleten. További mosások után a metszeteket 0.5%-os ozmium-tetroxid oldattal kezeltük 20 percen át, majd felszálló alkoholsorral illetve acetonitrillel víztelenítettük, végül pedig epoxigyantába (Durcupan, ACM, Fluka, Buchs, Switzerland) ágyaztuk azokat. A víztelenítés során a mintákat 1% uranil-acetátot tartalmazó 70%-os etil-alkohol oldattal kontrasztoltuk 20 percen át. Az elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz a gyantával átítatott hippokampusz-metszeteket szilikonból készült öntőformákba helyeztük, gyantát rétegeztünk rájuk, majd a 56 °C-on kisütöttük. A polimerizáció után 80-100 nm vastagságú metszeteket készítettünk egy Leica EM UC6 ultramikrotóm segítségével (Nussloch, Germany), majd a metszeteket formvar-ral bevont, egynyílású réz mintatartókra vettük fel. A mintákat Hitachi H-7100-as elektronmikroszkóppal vizsgáltuk (Tokyo, Japan), a felvételek elkészítéséhez pedig egy Veleta CCD kamerát használtunk. (Olympus Soft Imaging Solutions).

Az nNOS kimutatására irányuló immunarany illetve kombinált immunarany-immunperoxidáz reakciókhoz 1%-os paraformaldehiddel fixált szövetet használtunk. Ezekben a kísérletekben pepszines feltárást nem végeztünk. PB-ben és TBS-ben mostuk a metszeteket, majd egy órán keresztül TBS-ben oldott 1%-os HSA oldattal blokkoltuk azokat. A metszeteket 48 órán keresztül inkubáltuk a következő elsődleges antitestek oldatával: 1) nyúl anti-nNOS (1:5000), 2) nyúl anti-nNOS (1:400), 3) nyúl anti-nNOS (1:400) és egér anti-GAD65 (1:1000), 4) nyúl anti-NOsGC α 1 (1:1000) önmagában vagy kombinálva egér anti-GAD65-tel (1:250), vagy 5) nyúl anti-NOsGC β 1 (1:2000) önmagában vagy kombinálva egér anti-GAD65-tel (1:250). TBS-ben történő ismételt mosásokat követően a metszeteket egy órán keresztül Gel-BS-ben inkubáltuk. Ezután a metszeteket 24 órán keresztül másodlagos antitestek oldatával kezeltük, melyek Gel-BS-ben voltak kihígítva, a következőképpen: 1) biotinilált nyúl-ellenes számar (1:1000), 2) 1.4 nm-es arannyal jelölt nyúl-ellenes kecske Fab-töredék (1:150), 3) 1.4-nm-es arannyal jelölt nyúl-ellenes kecske Fab-töredék (1:150) biotinilált egér-ellenes számar (1:1000), vagy 4) és 5) biotinilált nyúl-ellenes számar (1:1000) önmagában vagy 1nm-es arannyal jelölt egér-ellenes kecske (1:160) kombinálva. Ezt követően az immunarany illetve

immunperoxidáz jelek előhívása, a minták gyantába ágyazása, és elektronmikroszkópos vizsgálata a fent leírt módon történt.

VI.8. Beágyazás utáni immun-elektronmikroszkópia

A szövetminták Lowicryl gyantába való beágyazását a korábban leírt módon végeztük (Nyiri és mtsai 2005). A 4% paraformaldehiddel fixált, 300 µm vastag szeleteket PB-ben való mosás után PB-ben elkészített cukoroldatba helyeztük úgy nehezítve a jégkristályok kialakulását. A metszeteket folyékony nitrogénnel hűtött, arannyal bevont réztükrőkhöz csaptuk, majd alacsony hőmérsékleten víztelenítettük és Lowicryl HM20-as gyantába ágyaztuk (Chemische Werke Lowi). A beágyazás utáni immunreakciókat 70 nm vastag metszeteken végeztük. Ezeket a metszeteket formvarral bevont, egynyílású nikkell mintatartókra vettünk fel, így a metszetek egy oldala érintkezhetett az ellenanyagokkal. Ezekben a kísérletekben a GABAerg és a glutamaterg szinapszisok NMDA-receptor tartalmát hasonlítottuk össze, olyan módon, hogy a GluN1 alegység elleni reakciót a tükrökép-módszer segítségével a GAD65/67-ellenes és a vGluT1-ellenes reakciókkal kolokalizáltuk. Hosszú, folytonos sorozatmetszeteket vettünk fel a mintatartóra olyan módon, hogy a félbevágott szinapszisokat más és más antitestekkel reagáltathattuk az egymást követő metszeteken. A metszeteket blokkoló oldat cseppjein inkubáltuk egy órán át, majd az elsődleges antitesteket tartalmazó cseppeken 18 órán keresztül 37 °C-on. A blokkoló oldat, melyben az elsődleges és másodlagos ellenanyagokat is kihígítottuk, 2% HSA-t és 0.03% Triton X-100-at tartalmazott TBS-ben. Három egymást követő mintatartót használtunk. Az elsőt nyúl anti-vGluT1 antitesttel (1:500), a másodikat nyúl anti-GluN1 antitesttel (1:30), a harmadikat pedig juh anti-GAD65/67 antitesttel (1:50) reagáltattuk. Így, az azonosított GABAerg és glutamaterg szinapszisok NMDA-receptor tartalmát vizsgálhattuk ugyanazon metszeteken. Az elsődleges antitestekkel való inkubálást követően a metszeteket TBS-sel mostuk, majd 5 órán át inkubáltuk a másodlagos ellenanyagok cseppjein. Ezeket is blokkoló oldatban hígítottuk ki, melyhez 0.5 mg/ml polietilén-glikolt adtunk. 10 nm-es arannyal jelölt nyúl elleni kecske (1:100; British Biocell International), és 6 nm-es arannyal jelölt juh-elleni szamár (1:100; Aurion) másodlagos antitesteket alkalmaztunk. A 6 nm-es aranszemcséket ezüstözőoldat (SE-

EM, Aurion) segítségével erősítettük 35percen keresztül, szobahőmérsékleten. Alapos mosások után a metszeteket desztillált vízben megmártottuk, majd uranil acetát telített vizes oldatával kontrasztoltuk. A mintákat Hitachi H-7100-as elektronmikroszkóppal vizsgáltuk (Tokyo, Japan), a felvételek elkészítéséhez pedig egy Veleta CCD kamerát használtunk. (Olympus Soft Imaging Solutions).

VI.9. In vitro elektrofiziológia (társ-munkacsoport munkája)

A teljes-sejt elvezetéseket Zeiss Axioscope segítségével végezték 31-32 °C-on, vizuális irányítás mellett. A karbogénnel kiegyenlített ACSF folyási sebessége a kamrában 2-3 ml volt percenként. A 3-6 M Ω ellenállású patch-elektrodákat intracelluláris oldattal töltötték fel, mely a következőket tartalmazta mM-ban: 80 CsCl, 60 Cs-glükonát, 1 MgCl₂, 2 Mg-ATP, 3 NaCl, 10 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinétánszulfonsav, 5QX-314 (pH = 7.3, 290 mOsm). Egyes kísérletekben a pipettaoldat 0.1-0.3% biocytint is tartalmazott, és az elvezetett sejtek post-hoc immunfluoreszcens vizsgálata igazolta, hogy azok minden esetben piramisisejtek voltak. A posztzinaptikus áramokat (PSC) -70 mV-os tartófeszültség mellett vezették el. A szeletekre folyó ACSF-hez 2-3 mM kinurénsavat vagy 70-100 μ M pikrotoxint adtak, hogy az ionotróp glutamát receptorokat, illetve a GABA_A-receptorokat legátolják. A rostok elektromos ingerlését egy Supertech időzítő és izolátor segítségével végezték el (Supertech Ltd, www.super-tech.eu) egy ACSF-el töltött théta-üvegpipettával (Sutter Instrument Company), 0.1 Hz-es frekvenciával. A glutamát receptor-mediálta szinaptikus áramok (GluR-PSC) kiváltásához a hippocampusz CA1 területének radiátum rétegbe, míg a GABA_A receptor-közvetítette szinaptikus áramok (GABA_AR-PSCs) kiváltásához a piramisisejtek rétegébe vezették az ingerlőelektrodát. Az ellenállást (access resistances; 4 és 15 M Ω között, 65-70%-ban kompenzálva) szorosan ellenőrizték, mely az elvezetések alatt állandó volt (\pm 20%).

VI.10. Multineuron kalcium képkalkotás (társ-munkacsoporttal együttműködve)

A méréseket percenkénti 8-10 ml-es átfolyási sebesség mellett, 32-33 °C-on végeztük. A CA1 régió piramissejtrétegében kisebb területeket feltöltöttünk a sejtekbe hatolni képes kalcium indikátorral (Fura-2 AM, 20 μ M) melyet ACSF-ben hígítottunk, és kiegészítettünk 0.16 tömegszázaléknyi pluronsavval. A feltöltést egy patch-pipetta (2-4 μ m átmérőjű) és egy nyomás alapú mikrobefecskendező rendszer segítségével végeztük el (Picospritzer, Narishige). Az aránymértékes képkalkotást 340 és 380 nm-es hullámhosszokon történő váltakozó gerjesztéssel végeztük, 100 ms-os expozíciós idővel. A gerjesztést monokromátorral hoztuk létre (TILL Photonics), míg egy CCD-kamera rögzítette a kibocsájtott fényt (TILL Photonics). Ötszáz kép készült a mérés 155 másodperce alatt, 4x4-es pixel bineléssel (1 aránymértékes képkocka/310 ms). A Ca^{2+} viszonyított változásait a két gerjesztési hullámhossz (340 és 380 nm) hatására kibocsájtott fluoreszcens fény arányából számoltuk ki. Minden aktív sejtet kézzel jelöltünk ki mint vizsgálandó terület (ROI), majd a szoftver meghatározta minden egyes sejthez tartozó Ca^{2+} -változást az idő függvényében. Az eseményeket akkor tekintettük szinkronnak, amennyiben a kalciumszint egyidejűleg változott az aktív sejtek több mint 90%-ában. Minden vizsgált szeletben összevetettük az aktív és a szinkron sejtek számát, és azt találtuk, hogy legalább 87%-a az aktív sejteknek részt vett a szinkron eseményekben (SE). A látóterenként rögzített sejtek száma 15 ± 5 standard deviáció (SD) volt. A kontroll szakasz felvétele után különböző drogokat mostunk a szeletekre (100 μ M N-omega-nitro-L-arginin-metil-észter-hidroklorid (L-NAME), 10 μ M ODQ, 200 μ M SNP, és 50 μ M Br-cGMP), majd 10-12 perc elteltével elvégeztük a második mérést, hogy a drogok szinkron eseményekre kifejtett hatását vizsgálhassuk. Minden szeletben a kontroll felvétel során mért szinkron események számát összevetettük a drog alkalmazása utáni felvételen mért szinkron események számával. Néhány esetben a kalcium-szint optikai mérésével párhuzamosan egyes sejtek aktivitását is elvezettük. Ezekben a mérésekben az egy-sejt aktivitást loose-patch módon ACSF-el töltött patch pipetta segítségével (3-6 M Ω) végeztük. Minden adatot egy Multiclamp 700B erősítő (Axon Instruments) segítségével rögzítettünk, 2 kHz-en szűrtük, 10 kHz-en

digitalizáltuk és szoftveresen analizáltuk (EVAN program, Prof. I. Mody, University of California, Los Angeles és Origin 8.0 szoftver, OriginLab Corporation).

VI.11. Drogok

Az L-NAME-t, SNP-t és a 8-Br-cGMP-t desztillált vízben oldottuk fel, az IBMX-et, BAY-73 6691-et és az ODQ-t pedig dimetil-szulfidban. A drogokból törzsoldatokat készítettünk, és azokat használat előtt a megfelelő koncentrációra hígítottuk. A drogokat a Tocris-tól (www.tocris.com) vagy a Sigma-tól (www.sigmaaldrich.com) szereztük be. Habár beszámoltak már arról, hogy bizonyos körülmények között az SNP rendelkezhet mellékhatásokkal, kísérleteink során minden hatását teljesen kivédte az ODQ, mely a cGMP termelésért felelős NO-receptor erős és nagyon szelektív gátlószere (Garthwaite és mtsai 1995; Groneberg és mtsai 2008). Ezen felül a cGMP-analóg hatása megegyezett az NO-donor SNP hatásával. A fent leírtakból kifolyólag még ha lett is volna valamiféle mellékhatása az SNP-nek, a kísérleteink során létrehozott fiziológiás körülmények között nem volt kimutatható, és a funkcionális vizsgálataink során megfigyelt hatások az NO-receptorok SNP-ből felszabaduló NO által történő aktiválásának köszönhetőek.

VI.12. Analízis

Amennyiben az adataink normáloszlást mutattak a Shapiro-Wilks W próba alapján, parametrikus statisztikai mutatókat adtunk meg (átlag \pm SD), ellenkező esetben pedig nem-parametrikus jellemzőket tüntettünk fel (medián, interkvartilis tartomány). Két független nem-parametrikus csoportot a Mann-Whitney U próbával hasonlítottuk össze, két nem-független nem-parametrikus csoportot pedig a Wilcoxon matched pairs próbával hasonlítottuk össze. A null-hipotézist elutasítottuk, amennyiben P értéke kisebb volt, mint 0.05. Ezekben az esetekben a különbséget szignifikánsnak tekintettük.

Az első kísérletsorozatban mind a GABAerg, mind pedig a glutamaterg végkészülékeket szelektíven megjelöltük. A második kísérletsorozatban a GABAerg és a glutamaterg szinapszisok elkülönítése a következőképpen történt. GABAergnek tekintettük a GAD65-ellenes immunreaktivitást mutató végkészülékeket, míg

ugyanezekben a mintákban azokat a GAD65-elleni immunreaktivitást nem mutató végkészülékeket, melyek egyúttal aszimmetrikus szinapszist hoztak létre, glutamátergnek tekintettük. *Post hoc*elemzés kimutatta, hogy a fent leírt kritériumok alapján kiválasztott GABAerg szinapszisok szignifikánsan nagyobb szinapszisokat létesítettek, mint a glutamátergek (Mann-Whitney U próba, $P < 0.01$).

Minden vizsgált szinapszist a hippocampusz CA1-es területének radiátum rétegéből gyűjtöttük. A glutamáterg és GABAerg szinapszisok méretét sorozatmetszetekből elvégzett teljes rekonstrukció segítségével határoztuk meg. A szinapszisok anatómiailag meghatározott szélei közötti távolságot lemértük az egymást követő metszeteken, majd az egy szinapszishoz tartozó hosszértékeket összegeztük, és megszoroztuk a metszetek vastagságával. A beágyazás előtti reakciókban az NMDA-receptor alegységek, illetve az nNOS immunarany jelölésének elemzéséhez megszámloltuk az arany szemcséket az azonosított GABAerg és glutamáterg szinapszisokban és a szinapszisokon kívüli membránok mentén. Az immunarany részecskéket membránhoz vagy szinapszishoz tartozónak vettük, amennyiben a membrántól való távolságuk nem haladta meg a 40 nm-t. A beágyazás utáni immunarany reakciók elemzése során a sejthártya mindkét oldalán 40 nm széles sávokat határoztunk meg, és az azokra eső jelet membránhoz tartozónak tekintettük. Azért választottunk 40 nm széles sávokat, mert az antitest által felismert epitóp (az NMDA-receptor C-terminálisa) néhány nanométerrel a sejthártyán belül foglal helyet, az elsődleges és másodlagos antitestek hossza egyenként körülbelül 15 nm, és az arany szemcsé sugara 5 nm. Tapasztalatunk szerint az arany szemcsék néhány nanométert képesek elmozdulni a metszetek felszínén, és ez hozzájárulhat a jelölés eloszlásához. Mindezen megfontolások mellett, amikor megvizsgáltuk az arany szemcsék eloszlását a beágyazás utáni reakciók során, azt tapasztaltuk, hogy a szemcsék túlnyomó többsége a poszt-szinaptikus membrántól mért 20 nm-en belül helyezkedett el mind a GABAerg, mind pedig a glutamáterg szinapszisok esetében (medián: 3.63 nm, interkvartilis tartomány: -8.12–13.78 nm; medián: 7.26 nm, interkvartilis tartomány -7.87–13.49 nm). Méréseink során az ImageJ/Fiji nyílt forráskódú szoftvert használtuk.

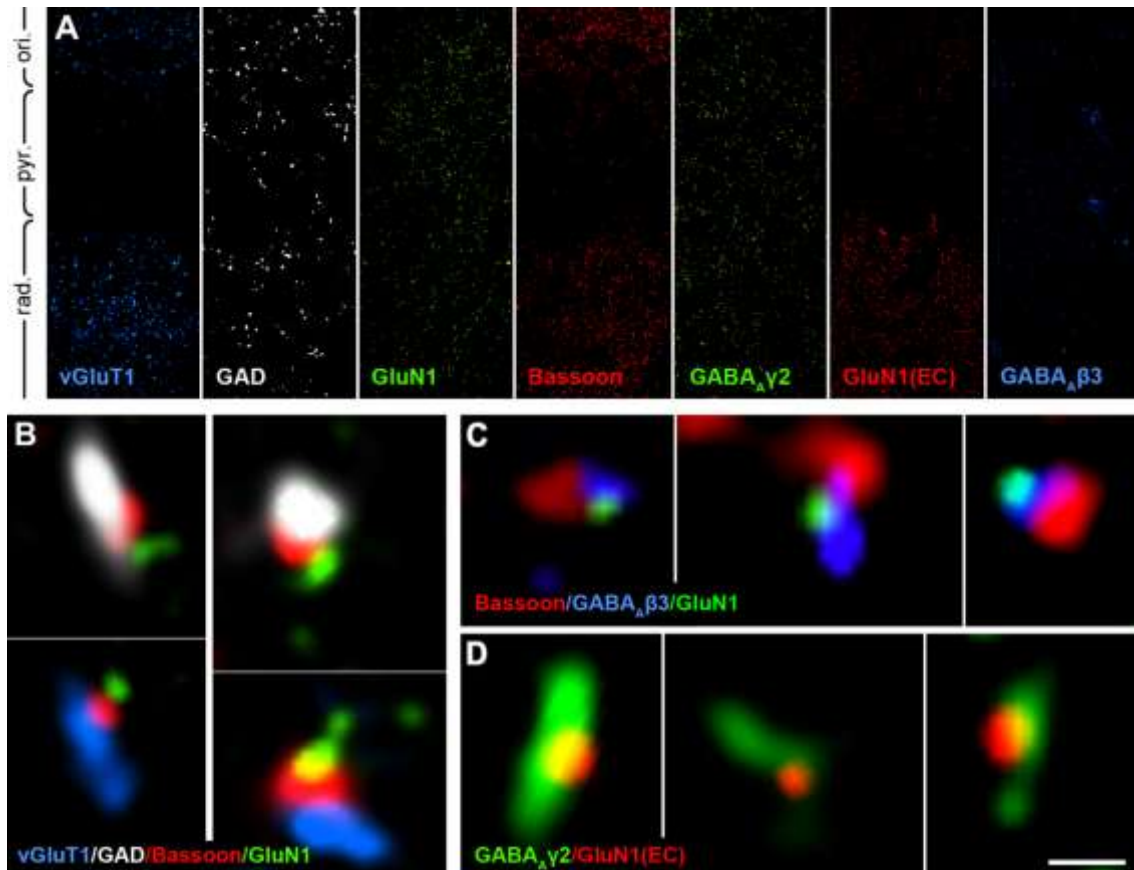
VII. EREDMÉNYEK

VII.1. NMDA-receptorok vizsgálata a posztantális agyban

VII.1.1. Konfokális mikroszkópia alapján mind a glutamáterg, mind pedig a GABAerg szinapszisok rendelkeznek NMDA-receptorokkal a fejlődés során

Az NMDAR-k fejlődésben betöltött alapvető fontosságú szerepe ellenére nem volt ismert pontos sejtfelszíni eloszlásuk a posztantális fejlődés során, ezért vizsgálataink céljaként az NMDAR-k pontos elhelyezkedésének meghatározását tűztük ki.

Az NMDA-receptorok heterotetramer szerkezetű csatornák, két GluN1 és általában két GluN2 alegységből állnak (Monyer és mtsai 1992). Mivel a GluN1-es alegység minden működőképes NMDA-receptorban jelen van (Fukaya és mtsai 2003), az NMDA-receptorok helyének a meghatározását a GluN1-es alegység elleni immunreakció vizsgálatával végeztük. A szinapszisokat egy preszinaptikus aktív zónában elhelyezkedő fehérje, a Bassoon elleni immunreakcióval jelöltük meg. A glutamáterg végkészülékeket 1-es típusú vezikuláris glutamát transzporter (vGluT1) elleni, a GABAerg végkészülékeket pedig a glutamát dekarboxiláz 65 és 67 kilodaltonos izoenzimeit (GAD65/67) elleni immunreakcióval jelöltük meg. A különböző hippokampális rétegekben látható általános jelölést mutatjuk meg a 11. ábra A paneljén. A fejlődés során a radiatum rétegben nagy számban vannak jelen mind glutamáterg, mind pedig GABAerg szinapszisok, ezért vizsgálataink során ebből a rétegből végeztük a mintavételezést. Ebben a régióban a dendritek túlnyomó többsége a piramissejtektől származik, így nagy valószínűséggel a vizsgált szinapszisok legnagyobb részének posztzinaptikus célelemei piramissejt-dendritek voltak. A vGluT1 illetve a GAD65/67 jelölés egy nem átfedő, pontszerű mintát adott, így megjelenítve a glutamáterg illetve a GABAerg végkészülékek eloszlását. A négyes-jelölések során azt találtuk, hogy a Bassoon pozitív foltok vagy a vGluT1, vagy pedig a GAD65/67 pozitív terminálisokhoz kötődtek, jelölve a kétféle terminális szinapszisait. Több esetben a GluN1-es alegység elleni jel a vGluT1 pozitív (glutamáterg) vagy a GAD65/67 pozitív (GABAerg) végkészülékek Bassoon-nal jelölt szinapszisaikhoz kapcsolódott a 6-7 napos állatokban (11. ábra B; n=4 állat), mutatva azok NMDA-receptor tartalmát.



11. ábra. Mind a GABAerg, mind pedig a glutamáterg szinapszisok tartalmaznak NMDA-receptorokat a posztnatális fejlődés során

A, Dekonvolvált képsorozatokat három képsíkjából származó maximum intenzitású vetület képek mutatják a festések általános jelölési mintázatát a hippocampusz CA1 területének oriens (ori.), piramisisejt (pyr.) és radiatum (rad.) rétegében. **B-D**, A hippocampusz CA1 területének radiatum rétegében gyűjtött dekonvolvált konfokális lézer pásztázó mikroszkópos felvételek mutatják az immunfluoreszcens kísérletekből származó négyes- (**B**), hármas- (**C**) és kettős-jelöléseket (**D**). **B**, A négyes-jelölések során a glutamáterg végkészülékeket kék színben (vGluT1) a GABAerg végkészülékeket fehér színben (GAD65/67), a preszinaptikus aktív zónákat pedig piros színben (Bassoon) jelentettük meg. A GluN1-es alegység (zölddel jelölve) jelen van mindkét típusú szinapszisban a 6-7 napos állatokban. A GABAerg és a glutamáterg végkészülékeket egyazon képsíkból gyűjtöttük. **C**, A hármas-reakcióból származó képeken látható, hogy a GABA_A-receptor β3-as alegysége (késsel jelölve) és a GluN1-es NMDA-receptor alegység (zölddel jelölve) átlapolódnak a preszinaptikus aktív zónák (Bassoon, pirossal jelölve) közvetlen

közelében. **D**, A kettős-jelölés képein látható, hogy a GABA_A-receptor γ 2-es alegysége (zölddel jelölve) és a GluN1-es alegység sejten kívüli szakasza elleni jelölés (piros) ugyancsak átfed. A **B**, **C** és **D** paneleken látható képek egyedi képsíkokból származnak, a képalkotás felbontása pedig 50nm x 50nm x 150nm /x-y-z voxelméret. A lépték 50 μ m az **A**, 500 nm a **B** és 350 nm a **C** és a **D**-panelen.

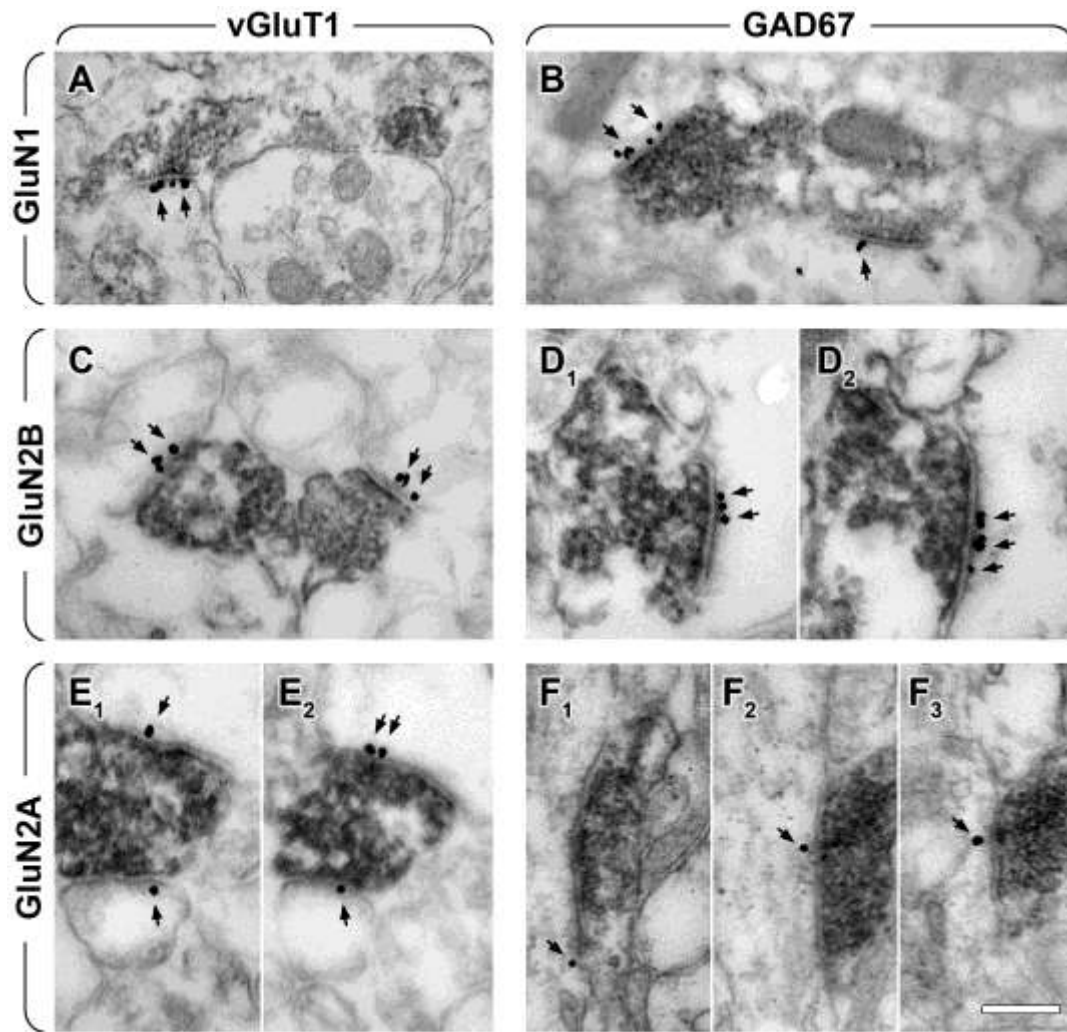
Ugyancsak konfokális lézer pásztázó mikroszkópiával vizsgáltuk a GABA_A- és NMDA-receptorok közvetlen kolokalizációját. Először egy hármás-jelöléstvégeztünk el Bassoon, GluN1-es alegység, és a GABA_A-receptor β 3-as alegysége ellen (11. ábra C, n=2 állat). Több esetben megfigyeltük, hogy a GluN1-es alegység illetve a GABA_AR β 3-as alegység jele átfedett, és Bassoon pozitív foltokhoz kapcsolódott. Másodszor egy kettős-jelöléstvégeztünk el, mely során a GluN1-es alegység sejten kívüli szakaszát, illetve a GABA_A-receptor γ 2-es alegységét jelöltük meg (11. ábra D, n=2 állat).

Ebben az esetben is azt tapasztaltuk, hogy a GluN1-es alegység gyakran együtt helyezkedik el a GABA_AR γ 2-es alegységével. Habár a módszer magas specificitással rendelkezik, viszonylag alacsony érzékenysége miatt kvantifikálást nem végeztünk el. Fluoreszcens kísérleteink során kapott eredményeink, melyek szerint a GluN1 jelölés gyakran a GABA_AR-pozitív pontokhoz kapcsolódott, felvetik az NMDA- és a GABA_A-receptorok szinaptikus kolokalizációját a posztnatális fejlődés alatt. Habár az eredményeink szerint az NMDA-receptorok kapcsolódnak mind a glutamáterg, mind pedig a GABAerg szinapszisokhoz, ezek a receptorok lehetnek akár pre- vagy posztszinaptikusak, és elhelyezkedhetnek akár a szinapszisok körül, vagy magukban a szinapszisokban. Ezért, hogy pontosabb adatokat gyűjthessünk, elektronmikroszkópos vizsgálatokat végeztünk.

VII.1.2. Beágyazás előtti immun-elektronmikroszkópia igazolja az NMDA receptorok három alegységének posztszinaptikus jelenlétét mind a glutamáterg, mind pedig a GABAerg szinapszisokban a fejlődés során.

Mivel a GABA_A-és NMDA-receptor függő szinkron hálózati aktivitás a posztnatális 6.-7. nap környékén a legerőteljesebb az egérben (Alléne és mtsai 2008; Crépel és mtsai 2007), további kísérleteinket is a fejlődésnek erre a szakaszára irányítottuk. Kombinált immunarany-immunperoxidáz kísérleteket végeztünk el,

melyek során az NMDA-receptor GluN1, GluN2B vagy GluN2A alegységeit immunarany, míg a glutamáterg vagy GABAerg végkészülékeket vGluT1 vagy GAD67 elleni immunperoxidáz reakcióval jelöltük meg. Vizsgálataink során minden reakcióban a hippokampusz CA1 területének radiátum rétegéből véletlenszerűen gyűjtöttünk szinapszisokat. Azt találtuk, hogy az NMDA-receptor mindhárom alegysége posztzinaptikusan jelen volt mind a glutamáterg, mind pedig a GABAerg szinapszisokban a 6.-7. napon. (12. ábra). Két állatból gyűjtött elektronmikroszkópos sorozatmetszetekből teljesen rekonstruáltunk szinapszisokat, és a glutamáterg szinapszisok legkevesebb $51\pm 16\%$ -a ($n=41$) és a GABAerg szinapszisok legkevesebb $53\pm 13\%$ -a ($n=40$) mutatott immunpozitivitást a GluN1 alegység ellen (12. ábraA, B és 14. ábra A). Az immunjelölés membrán menti sűrűsége 1.93 ± 0.03 aranyzemcse/ μ m volt a glutamáterg, 0.87 ± 0.29 aranyzemcse/ μ m a GABAerg szinapszisokban, és csak 0.09 ± 0.01 aranyzemcse/ μ m extraszinaptikusan, 100nm vastag metszeteken (14. ábra B, az immunarany jelölés sűrűségmérésének részletes leírása a Módszerek fejezetben megtekinthető.) Eredményeink szerint a glutamáterg szinapszisok legkevesebb $83\pm 3\%$ -a ($n=40$), a GABAerg szinapszisok legkevesebb $63\pm 13\%$ -a ($n=40$) tartalmazta a GluN2B alegységet (12. ábra C, D₁-D₂ és 14. ábraA). A jelölés vonal menti sűrűsége 3.16 ± 1.01 aranyzemcse/ μ m volt a glutamáterg, 1.38 ± 0.34 aranyzemcse/ μ m a GABAerg szinapszisokban, és csak 0.03 ± 0.01 aranyzemcse/ μ m extraszinaptikusan (14. ábra B). A glutamáterg szinapszisok legkevesebb $88\pm 8\%$ -a ($n=40$) a GABAerg szinapszisoknak pedig legkevesebb $49\pm 1\%$ -a ($n=43$) tartalmazta a GluN2A alegységet (12. ábraE₁- E₂, F₁-F₃ és 14. ábra A). A jelölés vonal menti sűrűsége 3.40 ± 0.81 aranyzemcse/ μ m volt a glutamáterg, 0.59 ± 0.28 aranyzemcse/ μ m a GABAerg szinapszisokban, és csak 0.02 ± 0.003 aranyzemcse/ μ m extraszinaptikusan (14. ábra B).

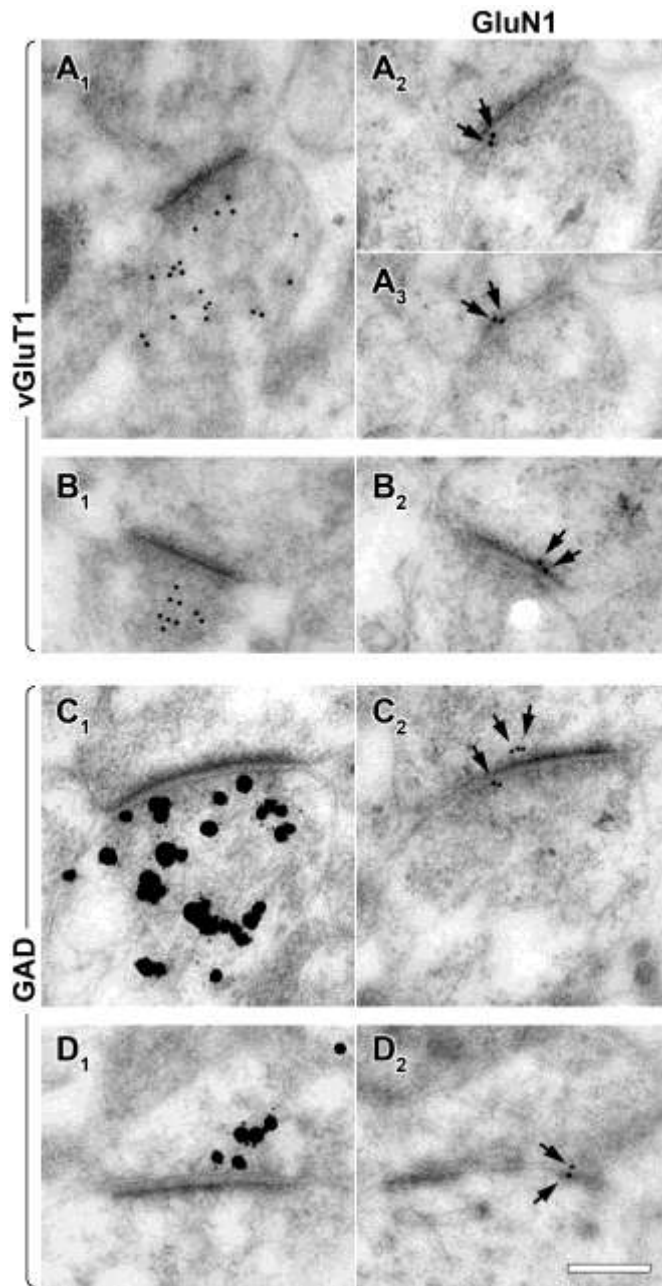


12. ábra. Az NMDA-receptor alegységei mind a GABAerg, mind pedig a glutamáterg szinapszisokban posztoszínaptikusan vannak jelen a posztnatális fejlődés 6.-7. napján

Az elektronmikroszkópos felvételeken a kombinált immunarany-immunoperoxidáz reakciót mutatják a hippocampusz CA1 területének radiátum rétegében. A vGluT1 pozitív végkészülékek (sötét reakciótermék az A, C, E1 és E2 paneleken) szinapszisai posztoszínaptikusan GluN1 (fekete szemcsék az A panelen, nyilak), GluN2B (fekete szemcsék az C panelen, nyilak) és GluN2A alegységeket tartalmaznak (fekete szemcsék az E1 és E2 paneleken, nyilak). A GAD67 pozitív végkészülékek (sötét reakciótermék a B, D1, D2, F1, F2 és F3 paneleken) szinapszisai posztoszínaptikusan GluN1 (fekete szemcsék a B panelen, nyilak), GluN2B (fekete szemcsék a D1 és D2 paneleken, nyilak) és GluN2A alegységeket tartalmaznak (fekete szemcsék az F1, F2 és F3 paneleken, nyilak). Egyazon szinapszis sorozatmetszeteiről készült felvételek láthatóak a D1 és D2; az E1 és E2; az F1, F2 és F3 paneleken. A lépték minden panelen 300 nm.

VII.1.3. A kvantitatív beágyazás utáni immunarany módszer eredményei alapján kicsi a különbség a glutamáterg illetve a GABAerg szinapszisokban található NMDA receptorok számában

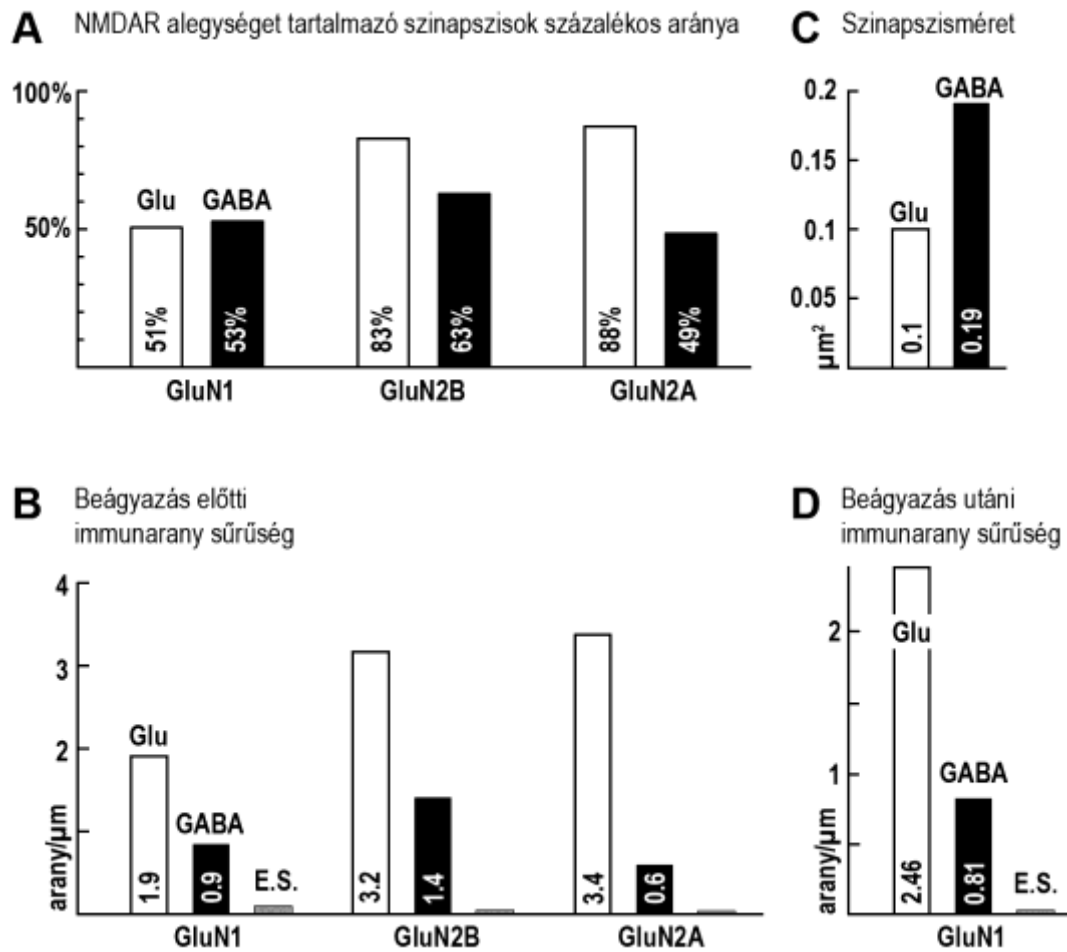
Technikai korlátok miatt a beágyazás előtti kísérletek eredményei nem teljes mértékben kvantitatívak, ezért, hogy teljesen pontosan meghatározhassuk az NMDA-receptorok mennyiségét, beágyazás utáni immunarany reakciókat végeztünk el. Mindensejtfelszíni NMDA-receptor tartalmaz GluN1 alegységet (Fukaya és mtsai 2003), és minden NMDA-receptor egyforma számú GluN1 alegységet tartalmaz, így megjelölésével az NMDA-receptorok száma összehasonlítható. Ebből kifolyólag a GluN1 alegységek megjelölésével meghatározhatjuk az NMDA-receptorok elhelyezkedését és mennyiségét. A GluN1 alegység elleni immunarany reakció vizsgálatát az úgynevezett tükrökép-technikával végeztük el. Ez a módszer lehetővé tette, hogy az immunarany szemcséket egyetlen metszeten mérhessük le, míg a glutamáterg és GABAerg szinapszisokat a tükrökép-metszeten azonosítsuk (a módszer részletes leírása a Módszerek I.V.8. fejezetében megtekinthető). A módszer alkalmazásával kvantitatív módon összehasonlíhattuk a szinaptikus és extraszinaptikus területek receptortartalmát a 6-7 napos egérben. A hippocampusz CA1 területének radiátum rétegéből véletlenszerűen gyűjtöttünk glutamáterg és GABAerg szinapszisokat. Kimutattuk, hogy NMDA-receptorok mind a glutamáterg (13. ábra A-B), mind pedig a GABAerg szinapszisokban jelen vannak (13. ábra C-D). Méréseink szerint a jelölés sűrűsége 2.46 ± 0.71 arany szemcse/ μm^2 a glutamáterg ($n=32$), 0.81 ± 0.16 arany szemcse/ μm^2 a GABAerg szinapszisokban ($n=28$), és csak 0.03 ± 0.01 arany szemcse/ μm^2 extraszinaptikusan ($103 \mu\text{m}$ extraszinaptikus membránszakasz mentén, 14. ábra D). Hogy meghatározhassuk a kétféle szinapszisban elhelyezkedő NMDA-receptorok tényleges számának arányát, lemértük a szinapszisok méreteit, és a megfelelő jelsűrűség értékeivel megszoroztuk. A szinapszisméretetek megbízható meghatározásához immunperoxidáz egyes-jelöléseket végeztünk el (erősen fixált szöveten) vagy vGluT1 vagy pedig GAD67 ellen, két állatban.



13. ábra. A beágyazás utáni immunarany kísérletek kvantitatív eredményei alapján alig eltérő mennyiségű NMDA-receptor található a GABAerg és a glutamaterg szinapszisokban a posztnatális fejlődés 6.-7. napján

A tükörkép-technika alkalmazásával ugyanazon szinapszisok szomszédos ultravékony metszetein végeztünk el immunoreakciókat különböző epitópok ellen. 10 nm-es immunarany részecskékkel jeleltük meg a glutamaterg (vGluT1-et tartalmazó) végkészülékeket (A1 és B1), ezüsttel felerősített immunarany részecskékkel jeleltük a GABAerg (GAD65/67 pozitív) végkészülékeket (C1 és D1) és 10 nm-es immunarany részecskék (nyilak) jelölik a GluN1-es alegységeket (A2-3, B2, C2 és D2). Tekintettel arra, hogy a beágyazás utáni immunreakció a metszetek

felszínén történik, az aranyzemcsék a posztszinaptikus membrán mindkét oldalán elhelyezkedhetnek, még ha a megjelölt epitóp kizárólag posztszinaptikus is. Egyazon szinapszisok szomszédos metszeteiről származó felvételek láthatóak az A1-3, a B1-2, a C1-2 és a D1-2 paneleken. A lépték 200 nm az összes képen.



14. ábra. Az NMDA-receptor alegységek GABAerg és glutamáterg szinapszisokban való eloszlásának elemzése a posztnatális fejlődés 6.-7. napján

A, Az összes azonosított glutamáterg (fehér oszlopok) és GABAerg (fekete oszlopok) szinapszisok közül az NMDA-receptor alegységet tartalmazók százalékos aránya. B, A különböző NMDA-receptor alegységek elleni jelölés membrán menti sűrűsége (arany szemcse/ μm) a glutamáterg és GABAerg szinapszisokban, illetve az extraszinaptikus membrán mentén (szürke oszlopok), 100nm vastagságú metszeten mérve. A jelölés sűrűsége az extraszinaptikus membránok mentén 0.09, 0.03 és 0.02 immunarány-szemcse/ μm volt a GluN1, GluN2B és GluN2A alegységek ellen, sorrendben. C, A glutamáterg és GABAerg szinapszisok mérete (μm^2). Az A, B és C panel eredményei beágyazás előtti kísérletekből származnak. D, A GluN1-es NMDA-receptor alegység elleni jelölés membrán menti sűrűsége (arany szemcse/ μm) a glutamáterg és GABAerg szinapszisokban, illetve az extraszinaptikus (0.03 arany szemcse/ μm) membrán mentén, a kvantitatív beágyazás utáni kísérletekből mérve.

A mintákat Durcupan gyantába ágyasztuk, minden szinapszist a radiátum rétegből gyűjtöttünk. A teljesen rekonstruált glutamáterg szinapszisok (n=29) mérete $0.097\pm 0.013 \mu\text{m}^2$ volt, míg a GABAerg szinapszisoké (n=32) $0.186\pm 0.026 \mu\text{m}^2$ (14. ábra C), azaz az utóbbi 1.91-szer nagyobb volt az előbbinél. Ezekből az értékekből kiszámoltuk, hogy teljesen rekonstruált glutamáterg szinapszisokban 3.25 immunarany szemcsét, míg a GABAerg szinapszisokban 2.13 immunarany szemcsét találunk az NMDA-receptor elleni reakcióban, mely ahhoz a váratlan felimeréshez vezetett, miszerint a glutamáterg szinapszisok csak 1.6-szor annyi NMDA-receptort tartalmaznak, mint a GABAerg szinapszisok. Ez a különbség markánsan megváltozik a felnőttkorra, amikor a glutamáterg szinapszisok 5-ször több NMDAR-t fejeznek ki, mint a GABAergek.

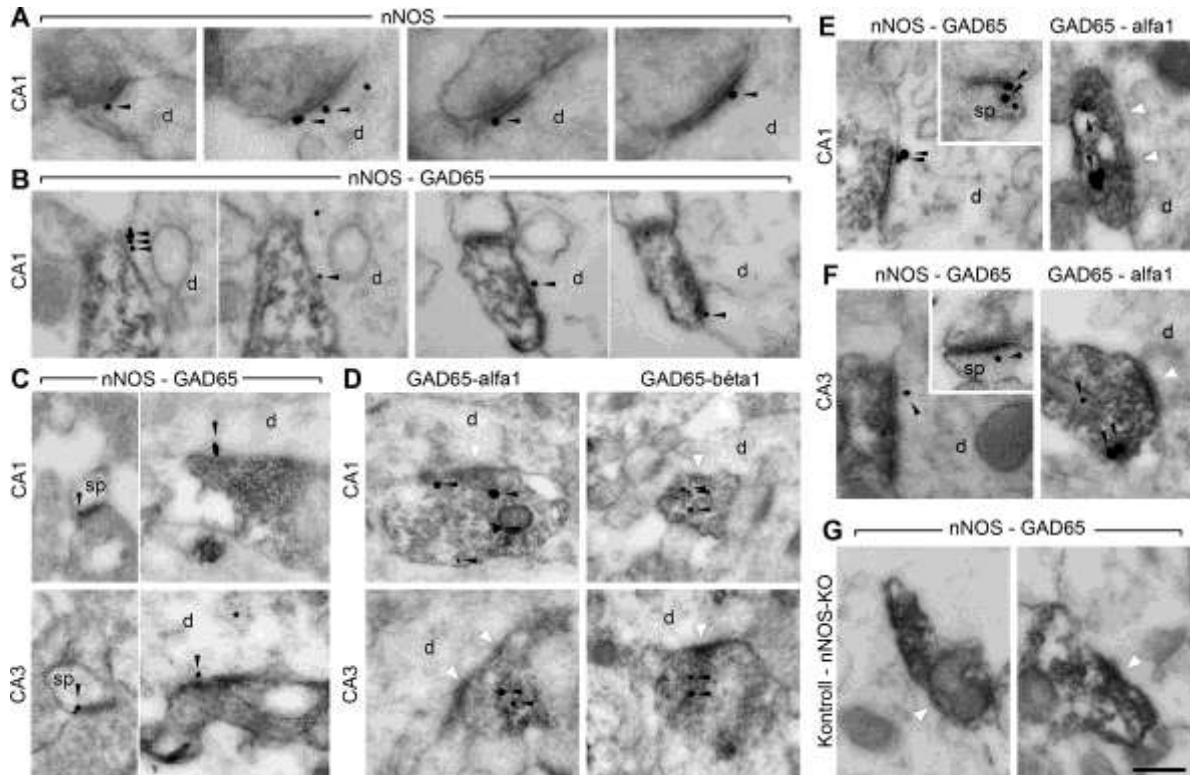
A beágyazás előtti reakciók eredményei alapján egyértelművé vált, hogy az NMDA-receptorok ezekben a szinapszisokban kizárólag posztszinaptikusan helyezkedtek el. Ezt az eredményt megerősítette az NMDA-receptor jelölésének posztszinaptikus membránhoz viszonyított merőleges eloszlásának vizsgálata a beágyazás utáni reakcióban. Az arany szemcsék posztszinaptikus membrántól való távolságának eloszlása nagyon hasonló volt a GABAerg (medián: 3.63 nm, interkvartilis tartomány: -8.12–13.78 nm, n=28) és a glutamáterg szinapszisokban (medián 7.26 nm, interkvartilis tartomány -7.87–13.49 nm, n=32, a pozitív értékek sejten belüli elhelyezkedést jelentenek), megerősítve a az immunarany jelölés posztszinaptikus forrását.

VII.2. A NO rendszer vizsgálata a posztnatális agyban

VII.2.1. Az nNOS a glutamaterg és a GABAerg szinapszisokban is jelen van posztszinaptikusan a fejlődés során

Habár a retrográd nitrogén-monoxid jelátviteli rendszer kiemelt szerepet játszik a posztnatális fejlődés során, molekuláris elemeinek pontos elhelyezkedése, szinaptikus jelátvitelre és spontán szinkron aktivitásra kifejtett hatása mégsem volt ismert. Vizsgálataink céljából ezen kérdések megválaszolását tűztük ki.

Mivel a spontán szinkron hálózati aktivitás (SSA) – mely a fejlődő idegsejthálózatok alapvető jellemzője – egérben a születés utáni 6.-9. nap között a legerőteljesebb, (Crepel és mtsai 2007; Alléne és mtsai 2008), kísérleteinkben főleg ezt a fejlődési szakaszt vizsgáltuk. Vad típusú és nNOS génkiütött (KO) állatok hippocampuszaiból készült metszeteken végeztünk el immunarany, immunperoxidáz illetve kombinált immunarany-immunperoxidáz reakciókat nNOS és GAD65 ellen. Az nNOS elleni immunperoxidáz reakcióbanjelölődtek a piramissejtek, és néhány erősen jelölt interneuront lehetett megfigyelni a CA1 és CA3 területeken. Az nNOS KO állatban nem volt látható jelölés. Az nNOS elhelyezkedésének pontosabb meghatározásához immunarany reakciót végeztünk el. A vizsgált CA1 és CA3 területeken főként a posztszinaptikus denzitások jelölődtek, kevesebb jel kapcsolódott az extraszinaptikus membránokhoz is, és néhány arany szemcse megfigyelhető volt sejten belüli szervecskéken a szinapszisok közelében. Az nNOS jelölés membrán-menti sűrűsége 1.36 arany szemcse/ μm volt a szinapszisokban (medián, 0.7-1.37 min-max, 3 állat) és 0.06 arany szemcse/ μm extraszinaptikusan (medián, 0.06-0.07 min-max, 3 állat, 17. ábraE), míg az nNOS KO állatban nem volt jelölés. A véletlenszerűen gyűjtött és teljesen rekonstruált szinapszisok figyelemreméltó hányada, 46%-a jelölődött posztszinaptikusan nNOS ellen a hatnapos állat CA1 régiójának radiatum rétegében (medián, 41-50% min-max; n = 66 szinapszis 3 állatban, 17. ábraA). GAD65 elleni immunperoxidáz reakció és morfológiai kritériumok alapján (részletek a Módszerek fejezetben) azonosítottunk GABAerg és glutamaterg szinapszisokat, és azt találtuk, hogy a posztszinaptikus nNOS jelölés mindkétféle szinapszisban jelen volt a 4 (15. ábraE,F), a 6 (15. ábraB, C), a 10 és a 14 napos állatok hippocampuszának CA1 és CA3 területein.



15. ábra. Az NO-jelátviteli útvonal molekuláris elemei jelen vannak mind a GABAerg, mind pedig a glutamáterg szinapszisokban a posztnatális fejlődés 4.-6. napján

A, Elektronmikroszkópos felvételek mutatják az nNOS elleni immunarany jelölést dendritikus szinapszisok posztszinaptikus aktív zónájában. **B,** Két, sorozatfelvételtől származó képpáron GAD65-pozitív (sötét DAB csapadék) végkészülékek által létesített szinapszisok nNOS jelölése látható posztszinaptikusan. **C,** Elektronmikroszkópos felvételeken látható, hogy az nNOS posztszinaptikusan van jelen a hippocampusz CA1 és CA3 területein a denritekre érkező GABAerg, és dendrittűskékre érkező glutamáterg szinapszisokban. **D,** A képek az NOsGC $\alpha 1$ -es vagy $\beta 1$ -es alegysége elleni immunperoxidáz jelölést (sötét DAB csapadék), és a GAD65 elleni immunarany jelölést (fekete szemcsék) ábrázolják. Az NO-receptor mindkét alegysége jelen van a szinapszisokat létesítő GABAerg végkészülékekben a CA1 és CA3 területeken. **E, F,** A fent leírtakkal azonos jelölést kaptunk a 4 napos állatokban is. **G,** A felvételek az nNOS elleni jelölés teljes hiányát mutatják a génkiütött állatokban, GAD65-nNOS kettős-jelölés kísérletekben. A lépték 200 nm az A, 300 nm a B-F paneleken. A fekete nyílhegyek az ezüsttel felerősített arany szemcséket, a fehér nyílhegyek pedig a szinapszisokat mutatják. Dendrittűskék (sp), dendritörzsek (d).

A stratum radiatum-ban a dendritek túlnyomó többsége a piramissejtektől származik, így nagy valószínűséggel a vizsgált szinapszisok legnagyobb részének posztszinaptikus célelemei piramissejt-dendritek voltak. A GABAerg szinapszisok 40%-a (medián, 27-47% min-max; n = 45 szinapszis 3 6 napos állatban) és a glutamaterg szinapszisok 33%-a (medián, 29-40% min-max; n = 44 szinapszis 3 6 napos állatban) tartalmazta az nNOS-t posztszinaptikusan (17. ábra B,C).

VII.2.2. A nitrogén-monoxid receptorának mind $\alpha 1$ -es, mind pedig $\beta 1$ -es alegysége kimutatható a GABAerg végkészülékekben a fejlődés alatt

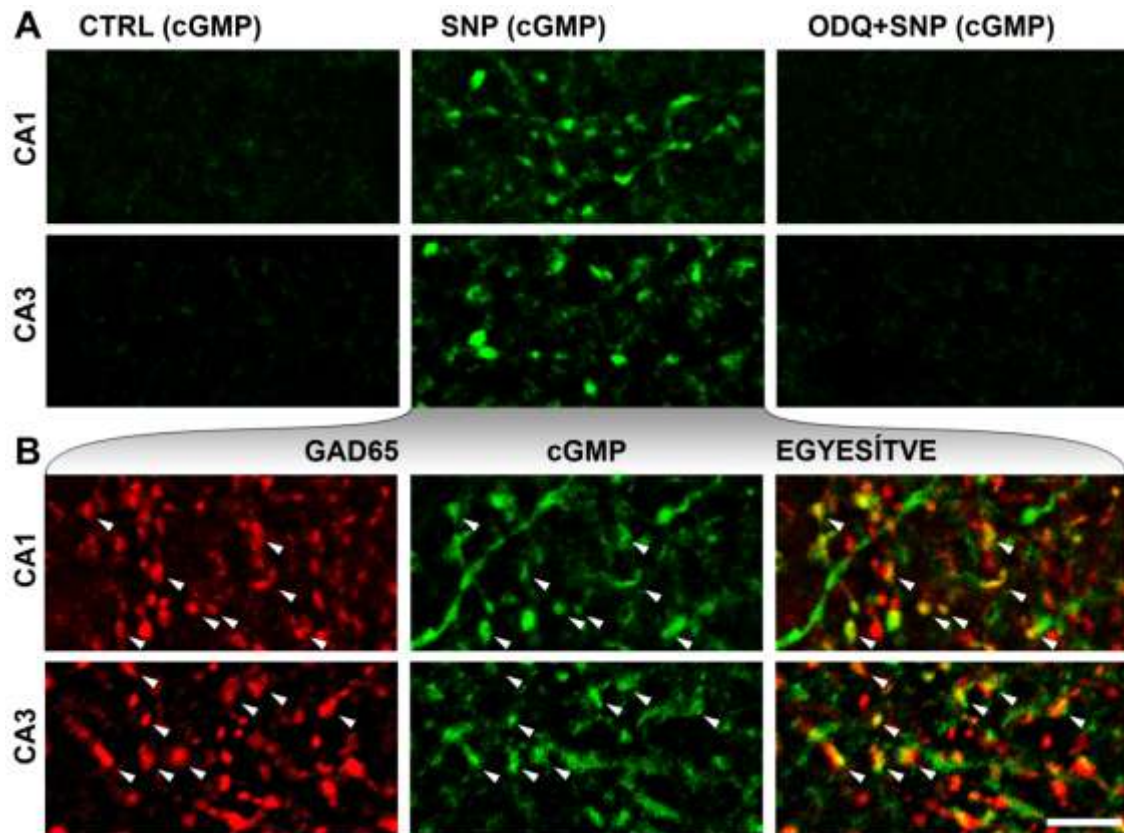
Az NOsGC $\alpha 1$ -es és $\beta 1$ -es alegységek sejteken belüli eloszlásának vizsgálata érdekében egyes- illetve kettős-jelöléseket végeztünk el ezen alegységek és GAD65 ellen. A posztnatális 4. és 14. nap között az $\alpha 1$ -es alegység elleni jelölés hasonló volt a GAD enzim fejlődés alatti eloszlásához (Dupuy és Houser 1996), ami arra enged következtetni, hogy az $\alpha 1$ -es alegység elsősorban a GABAerg végkészülékekben van jelen. A piramissejtekkel ellentétben az interneuronok sejttestjei illetve főleg a radiátum rétegben elhelyezkedő, sűrű rosthálózat erős $\alpha 1$ alegység elleni jelölést mutatott a posztnatális 4. és 10. nap között. A 14. napon a jelölés kicsit gyengébb volt, és a felnőtt állatban leírthoz hasonlított (Szabadits és Cserép és mtsai 2007), azaz az interneuronok sejttestjei, illetve az elsősorban a piramissejtek rétegében elhelyezkedő végkészülékeik mutattak $\alpha 1$ -es alegység elleni jelölést. A felnőtt állatok hippocampusán elvégzett mRNS in situ hibridizációs, mind pedig immunhisztokémiai kísérleteink igazolták, hogy az $\alpha 1$ - $\beta 1$ alegységösszetételű NO-receptor csak az interneuronokban van jelen (Szabadits és Cserép és mtsai 2007), és a fejlődő állatban ugyancsak az interneuronok tartalmaztak $\alpha 1$ -es alegységet, míg a piramissejtek nem. Azt is megfigyeltük, hogy az $\alpha 1$ -es alegységet tartalmazó végkészülékek soha nem adtak szinapszist dendrittüskékre, vagy tüske-szerű képződményekre a fejlődés során. Ezek az adatok arra engednek következtetni, hogy a legtöbb, ha nem az összes $\alpha 1$ -es alegységet tartalmazó végkészülék GABAerg már a fejlődés során is. Ezt megerősítve a kettős-reakciókban gyakran találtunk szinapszist adó végkészülékeket, melyek mind $\alpha 1$ -es alegységre, mind pedig GAD65-re pozitívak voltak a vizsgált CA1 és a CA3 területeken 4-napos (15. ábra E,F), 6-napos (15. ábra D), 10- és 14-napos korban. A CA1 területről véletlenszerűen gyűjtött összes szinapszist adó GABAerg végkészülék legalább 54%-

a(medián, 53-57% min-max; n = 88szinapszis 3 6-napos egérben) tartalmazta az $\alpha 1$ -es alegységet (17. ábraD). A $\beta 1$ -es alegység elleni jelölés hasonló volt a felnőttben leírthoz. A piramissejtek gyenge sejtplazma-jelölést, a szövet pedig diffúz, pontszerű jelölést mutatott. Az interneuronok sejtestjei és végkészülékei már a posztnatális 4.-6.-naptól kezdve jelölődtek a $\beta 1$ -es alegység ellen. A kettősen jelölt mintákban azt figyeltük meg, hogy GAD65 $\beta 1$ -es alegység elleni immunpozitivitást mutatóvégkészülékek szinapsziszokat létesítettek a CA1 és CA3 területek radiátum rétegében 4-, 6-(15. ábraD), 10- és 14-napos egérben. Ezek az eredmények mutatják, hogy az NOsGC valószínűleg $\alpha 1$ - $\beta 1$ alegységösszetétellel van jelen a GABAerg végkészülékekben már a posztnatális fejlődés során, és ideális helyzetet foglal el az nNOS által posztszinaptikusan képzett retrográd NO-jel fogadására.

VII.2.3. Az NO-receptor aktiválása cGMP termeléshez vezet a GABAerg végkészülékekben a fejlődés során

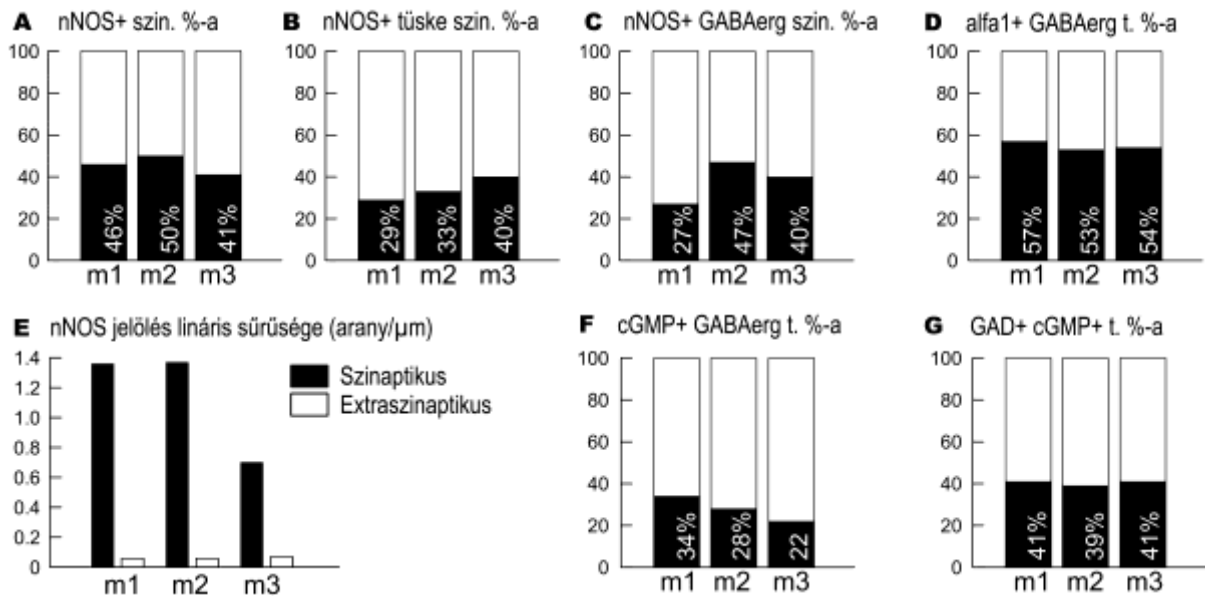
Annak a vizsgálatára, hogy vajon az NO-receptor működőképes-e a korai posztnatális fejlődés során, akut túlélő hippokampális szeleteket készítettünk hatnapos egérből, melyeket oxigenált mesterséges agy-gerincvelői folyadékban (ACSF) inkubáltunk, foszfodieszteráz (PDE) gátlók jelenlétében. A szeleteket vagy további drog hozzáadása nélkül, vagy az NO-donor SNP jelenlétében (200 μ M), vagy pedig az NO-receptor szelektív gátlószere (ODQ, 10 μ M) majd hozzáadott SNP jelenlétében inkubáltuk (16. ábra A). Ezt követően a szeleteket fixáltuk, és cGMP illetve GAD65 elleni kettős immunfluoreszcens reakciót végeztünk el. A kontrol szeletekben (NO-donor hozzáadása nélkül) nem találtunk cGMP ellen jelölt végkészülékeket a véletlenszerűen gyűjtött mintákban (16. ábraA, CTRL). Azokban a szeletekben, melyekhez NO-donort (SNP) adtunk, erős cGMP jelet figyeltünk meg rostokban, és végkészülékekben (16. ábraA, SNP),továbbá néhány idegsejt sejtestjében illetve gliasejtekben. Az ODQ-val történő előkezelés után az SNP nem tudott észlelhető mennyiségű cGMP termelést előidézni (16. ábraA, ODQ+SNP). Az SNP-kezelt szeletekben az találtuk, hogy a radiátum rétegben véletlenszerűen gyűjtött GAD65-pozitív végkészülékek 28%-a (medián, 23-34% min-max; n = 508 végkészülék 3 állatban, 17. ábra F) mutatott cGMP-jelölést, és a cGMP-pozitív végkészülékek legalább 41%-a (medián, 39-41% min-max; n = 335 végkészülék 3 hat-napos állatban)

tartalmazott GAD65-öt (17. ábra G). Ezek alapján elmondhatjuk, hogy az NOsGC már a születés után néhány nappal képes cGMP-t termelni a GABAerg a végkészülékekben.



16. ábra. Az NO-donor (SNP) NO-receptor függő módon idézi elő a cGMP termelődését a GABAerg végkészülékekben a fejlődés során

A, Konfokális lézer pásztázó mikroszkópos felvételeken cGMP-elleni immunfluoreszcens jelölés látható 6 napos egér hippocampusának radiátum rétegében. A túlélő szeletek PDE-gátlók jelenlétében drog nélkül (CTRL), az NO-donor SNP-vel (SNP) vagy az NO-receptor gátló ODQ-val és azt követően SNP-vel (ODQ+SNP) voltak kezelve. cGMP jelölés nem volt jelen kontroll kísérletekből gyűjtött mintákban (CTRL, első oszlop). Az SNP cGMP termelést idézett elő a CA1 és CA3 területeken (SNP, második oszlop), melyet az ODQ teljes mértékben legátolt (ODQ+SNP, harmadik oszlop). **B,** A GAD65 és a cGMP elleni immunreakció kolokalizációja az NO-donorral kezelt szeleteken (hatnapos állat hippocampusának radiátum rétegéből). A fehér nyílhegyek néhány cGMP-t és GAD65-öt is tartalmazó végkészüléket mutatnak. A lépték az összes képen 5 μ m.

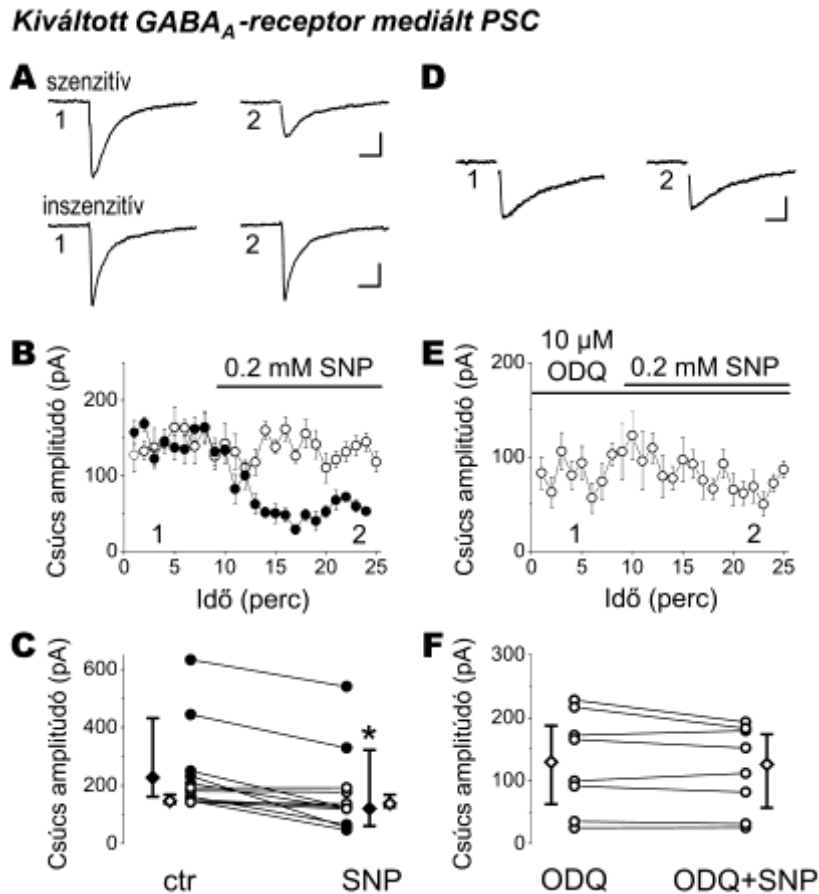


17. ábra. Az NO-jelátviteli útvonal molekuláris elemeinek eloszlása a posztnatális fejlődés alatt (három állatban: m1, m2, és m3).

A, Az nNOS-pozitív szinapszisok aránya az összes azonosított szinapszis százalékában kifejezve ($n=66$) az egyes-jelölés kísérletekből. **B, C,** A kettős-jelölés kísérletek során a glutamáterg és GABAerg szinapszisokat külön-külön vizsgáltuk. A grafikonok az nNOS-pozitív szinapszisok arányát mutatják az összes glutamáterg (**B**, $n=44$) és az összes GABAerg szinapszis százalékában (**C**, $n=45$). **D,** Az NOsGC $\alpha 1$ -es alegységét tartalmazó végkészülékek aránya az összes GABAerg terminális százalékában ($n=88$). **E,** Az nNOS elleni immunarany jelölés membrán menti sűrűsége 1.36 arany szemcse/ μ m volt a szinapszisokban (medián, 0.7-1.37 min-max) és 0.06 arany szemcse/ μ m extraszinaptikusan (medián, 0.06-0.07 min-max) elektronmikroszkópos felvételeken mérve (32 μ m szinaptikus és 604 μ m extaraszinaptikus membránszakaszon). **F,** A cGMP-pozitív végkészülékek százalékos aránya a GAD65-pozitív terminálisok közül ($n=508$). **G,** A GAD65-pozitív végkészülékek százalékos aránya a cGMP-pozitív terminálisok közül ($n=335$).

VII.2.4. A nitrogén-monoxid NOsGC-függő módon csökkenti a GABAerg posztszinaptikus áramokat a fejlődés alatt

Teljes-sejt patch-clamp módszer használatával kiváltott posztszinaptikus áramokat (PSC) vezettek el CA1 piramis sejtekből, 5-8-napos egerekből származó szeletkészítményekben. Először az NO-donor (SNP, 200 μ M) farmakológiai elkülönített GABA_A-receptor mediált posztszinaptikus áramokra (GABA_AR-PSC) kifejtett hatását vizsgálták. A PSC-k kiváltása a piramisetréteg elektromos ingerlésével történt. Az SNP alkalmazása szignifikánsan, a kontrol érték 67%-ára csökkentette a GABA_AR-PSC-k csúcs-amplitúdóját (kontrol medián amplitúdó: 186.5 pA és interkvartilis tartomány: 149.2-240.8 pA; medián amplitúdó SNP mellett: 125.6 pA és interkvartilis tartomány: 92.8-184.8 pA, n=12 szelet, P=0.00097, Wilcoxon-matched pairs test – WMP-próba, 18. ábraA-C). A GABA_AR-PSC-k SNP-vel szemben mutatott érzékenysége nem volt egyforma. Az esetek többségében az SNP az események csúcs-amplitúdóját szignifikánsan, a kontrol 52%-ára csökkentette (kontrol medián amplitúdó: 231.7 pA és interkvartilis tartomány: 161.6-443.9 pA; medián amplitúdó SNP mellett: 120.3 pA és interkvartilis tartomány: 56.1-329.6 pA, n=7 szelet, P=0.015, WMP-próba). Más esetekben az SNP nem okozott szignifikáns változást a csúcs-amplitúdóban (kontrol medián amplitúdó: 151.3 pA és interkvartilis tartomány: 142.7-180.9 pA; medián amplitúdó SNP mellett: 137.6 pA és interkvartilis tartomány: 126.8-77.2 pA, n=5 szelet, P=0.12, WMP-próba). Ezek után megvizsgálták, hogy az SNP az NOsGC-n keresztül fejti-e ki hatását. A kontrol időszak után 10 μ M ODQ-t adtak a szeletekhez, mely a GABA_AR-PSC-k csúcs-amplitúdójának enyhe csökkenését idézte elő (kontrol medián amplitúdó: 130.8 pA és interkvartilis tartomány: 92.8-226.2 pA; medián amplitúdó ODQ mellett: 99.5 pA és interkvartilis tartomány: 50.2-171.8 pA, n=9 szelet, P=0.004, WMP-próba). Ezt követően ODQ jelenlétében adtak SNP-t a szeletekhez. Egyetlen eset kivételével az SNP nem tudta csökkenteni az amplitúdót (medián amplitúdó ODQ mellett: 132.3 pA és interkvartilis tartomány: 63.3-194.2 pA; medián amplitúdó SNP és ODQ mellett: 131.8 pA és interkvartilis tartomány: 56.7-181.4 pA, n=8szelet, P=0.25, WMP-próba, 18. ábraD-F).



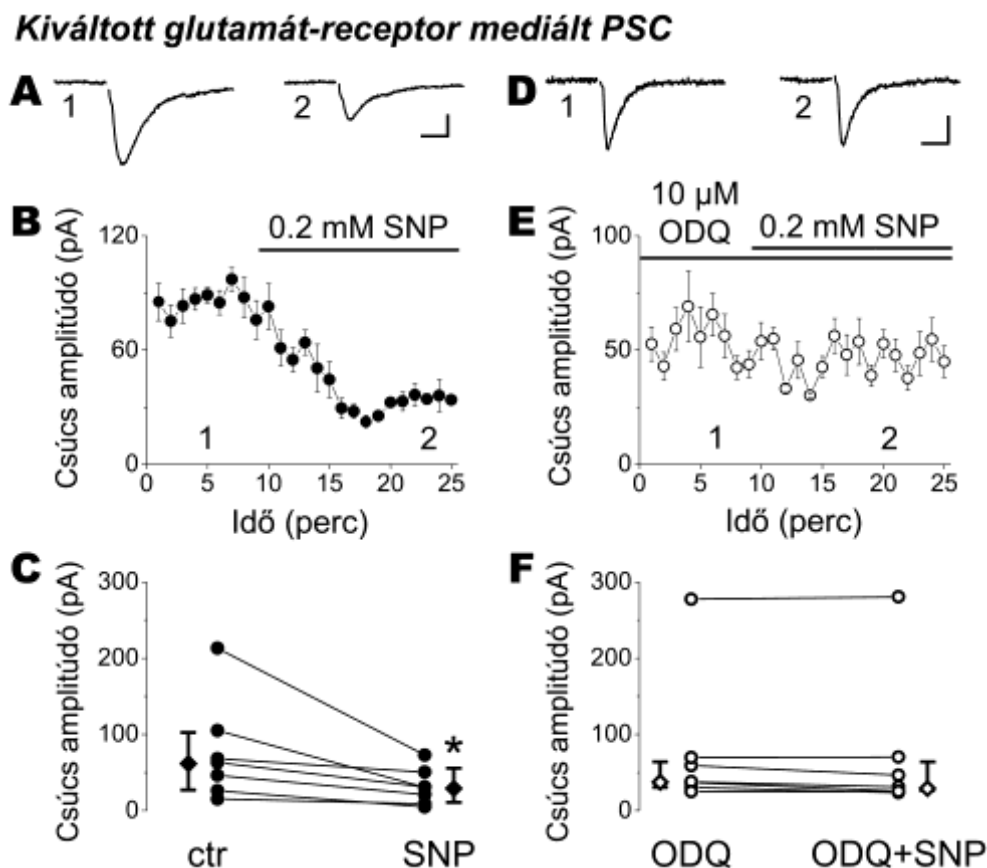
18. Ábra Az NO-rendszer csökkenti a GABAerg szinaptikus jelátvitel hatékonyságát a fejlődő hippocampusban

A-C, Az NO-donor SNP szignifikánsan csökkentette a kiváltott GABA_A-receptor mediált posztzinaptikus áramok (PSC) csúcs amplitúdóját a kontrollhoz képest. A, B, 6-8 egymást követő mérés átlagát vettük a jelölt időpontokban. Az SNP vagy szignifikánsan csökkentette az események amplitúdóját (szenzitív, teli körök) vagy nem változtatta meg azt (inszenzitív, üres körök). D-F, A szeleteket az NOsGC gátlószerevel, ODQ-val kezeltük, majd az ODQ-t és az SNP-t együttesen alkalmaztuk. Az ODQ kivédte az NO-donor hatását. D, E, 6-8 egymást követő mérés átlagát vettük a jelölt időpontokban. Az ingerlési műtermékeket a könnyebb átláthatóság miatt eltávolítottuk az átlagolt görbékéből. C, F, Az egyes szeletekben mért csúcs amplitúdó változásai láthatóak. A függőleges vonalak a páros összehasonlítások mellett a hozzájuk tartozó adatok mediánjait és interkvartilis tartományait jelölik. A csillag a szignifikáns különbséget jelzi (at $P \leq 0.05$). A lépték 20 ms és 40 pA az A és D paneleken, B és E: a megadott értékek az átlag \pm az átlag standard hibája (SEM).

A két kísérletben mért GABA_AR-PSC-kdregok adása előtti kontrol csúcs-amplitúdóinak összehasonlítása (SNP-kísérletek[kontrol:186.5 pA] vagy ODQ+SNP-kísérletek [kontrol: 130.8 pA]) nem mutatott különbséget (P=0.18, Mann-Whitney U-próba), mely arra enged következtetni, hogy a hasonló GABAerg rostkötegeket ingereltek a két kísérletben. Ezen eredmények alátámasztották, hogy az NO az NO-receptor aktiválásán keresztül képes a GABAerg szinaptikus jelátvitel hatékonyságát befolyásolni már a korai posztnatális fejlődés során.

VII.2.5. A nitrogén-monoxid NOsGC-függő módon csökkenti a glutamáterg posztszinaptikus áramokat a fejlődés alatt

Ezek után megvizsgálták az NO glutamáterg jelátvitelre kifejtett hatását. Először az SNP farmakológiailag elkülönített ionotróp glutamát receptor mediált posztszinaptikus áramok (GluR-PSC) csúcs-amplitúdójára kifejtett hatását mérték meg. A PSC-k kiváltása a radiátum réteg elektromos ingerlésével történt. Az SNP alkalmazása a kontrol érték felére csökkentette a GluR-PSC-k amplitúdóját (kontrol medián amplitúdó: 63.2 pA és interkvartilis tartomány: 26.1-104.9 pA; medián amplitúdó SNP-ben: 30.58 pA és interkvartilis tartomány: 9.1-60.5 pA, n=7 szelet, P=0.015, WMP-próba, 19. ábra, A-C). Ezután a szeleteket előkezelték ODQ-val, amely nem változtatta meg a csúcs-amplitúdót (kontrol medián amplitúdó: 42.8 pA és interkvartilis tartomány: 24.3-120.6 pA; medián amplitúdó ODQ-ban:37.9 pA és interkvartilis tartomány: 30.5-69.6 pA, n=7 szelet, P=0.57, WMP-próba) de megint kivédte az SNP hatását (mediánamplitúdó SNP+ODQ: 31.1 pA és interkvartilis tartomány:25.2-70.1 pA, n=7 szelet, P=0.22, WMP-próba, 19. ábraD-F). A GluR-PSC-k amplitúdói hasonlóak voltak a kontrol kísérletekben (P=0.79, Mann-Whitney U-próba). Ezek az eredmények bizonyítják, hogy a glutamáterg szinaptikus jelátvitelt is befolyásolja az NO-NOsGC-rendszer a posztnatális időszakban.

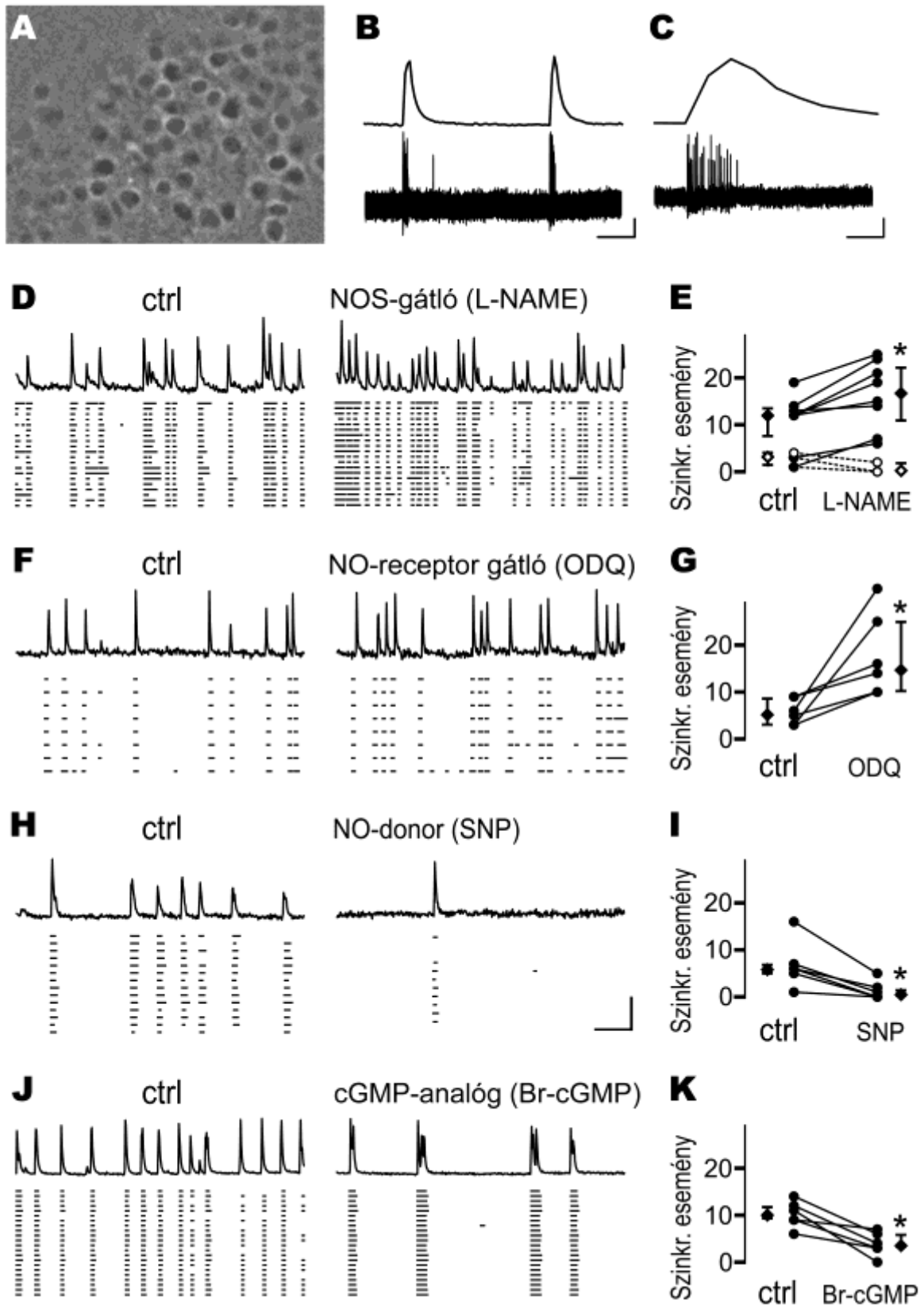


19. ábra. Az NO-rendszer csökkenti a glutamáterg szinaptikus jelátvitel hatékonyságát a fejlődő hippocampusban

A-C, Az NO-donor SNP szignifikánsan csökkentette a kiváltott ionotróp glutamát-receptor mediált posztzinaptikus áramok (PSC) csúcs amplitúdóját a kontrollhoz képest. A, B, 6-8 egymást követő mérés átlagát vettük a jelölt időpontokban. D-F, A szeleteket az NOsGC gátlószerevel, ODQ-val kezeltük, majd az ODQ-t és az SNP-t együttesen alkalmaztuk. Az ODQ kivédte az NO-donor hatását. D, E, 6-8 egymást követő mérés átlagát vettük a jelölt időpontokban. Az ingerlési műtermékeket a könnyebb átláthatóság miatt eltávolítottuk az átlagolt görbékből. C, F, Az egyes szeletekben mért csúcs amplitúdó változásai láthatóak. A függőleges vonalak a páros összehasonlítások mellett az adatok mediánjait és interkvartilis tartományait jelölik. A csillag a szignifikáns különbséget jelzi (at $P \leq 0.05$). A lépték 10 ms és 20 pA az A és D paneleken, B és E: a megadott értékek az átlag \pm az átlag standard hibája (SEM).

VII.2.6.A nitrogén-monoxid jelátviteli rendszer befolyásolása hatással van a fejlődő hippokampusz szinkron hálózati aktivitására

A szinapszis-vezérelt spontán szinkron hálózati aktivitás (SSA) vizsgálatához multilineuron kalcium-képző kísérleteket végeztünk el akut hippokampális szeleteken. A CA1 régióban a piramis sejtek rétegében kiválasztott területeket megtöltöttünk a kalcium-indikátor Fura-2 AM-mel (20 μ M, 20. ábraA). Kontrol körülmények között elvezettük egyes sejtek aktivitását loose-patch módon, miközben egyidejűleg folyamatosan rögzítettük ugyanazon sejt kalcium-képző adatait. A kétféle mérés adatainak összevetése igazolta, hogy egy sejt kalciumszintjének megemelkedése ugyanazon sejt sorozattüzelésének felelt meg (20. ábraB,C). A mérések (155 sec) alatti szinkron események (SE) száma 8.6 ± 4.7 SD volt ($n=26$ sejt). Ezután megvizsgáltuk az NO-rendszer farmakológiai gátlásának a szinkron események előfordulására kifejtett hatását. A NOS-gátló L-NAME (100 μ M) szignifikánsan növelte a szinkron események előfordulását a kontrol érték 157%-ára vad típusú állatban (medián, 145-700% min-max; $P=0.0117$, WMP-próba; $n=8$ sejt, 4 állat, 20. ábraD,E) míg az nNOS génkiütött állatban nem (20. ábraE, $n=3$, 3 állat, üres körök szaggatott vonallal). Hasonlóképpen, az NO-receptor gátlószer ODQ (10 μ M) ugyancsak növelte a szinkron események számát a kontrol 356.6%-ára (medián, 178-583% min-max; $P=0.0277$, WMP-próba; $n=6$, 3 állat, 20. ábra F,G). Ezek az eredmények azt mutatták, hogy a hálózatban működött egy alapszintű NO-jelátvitel, amely visszafogta a szinkron események előfordulását. Az NO-jelátvitel serkentésének a hatását is vizsgáltuk. Mind az NO-donor SNP (200 μ M), mind pedig a membránon áthatolni képes cGMP-analóg Br-cGMP (50 μ M) szignifikánsan csökkentette a szinkron események számát, a kontrol érték 15.5%-ára (SNP, medián, 0-31% min-max; $P=0.0277$, WMP-próba; $n=6,4$ állat, 20. ábraH,I) illetve 41%-ára (Br-cGMP, medián, 17-60% min-max; $P=0.0277$, WMP-próba; $n=6$, 3 állat, 20. ábraJ, K). A Br-cGMP hatása teljes mértékben megszüntethető volt a drog kimosásával a 6-ból 4 szeletben (2 szeletet nem teszteltünk). Eredményeink szerint az NO-jelátvitel erőteljes hatással van a spontán szinkron aktivitásra a korai posztnatális fejlődés során.



20. ábra. Az NO-rendszer képes befolyásolni a szinkron hálózati események előfordulását a fejlődés során

A, A multineuron kalcium képkalkotási kísérletekből származó videó egy képkockája, melyen Fura-2 AM-mel töltött piramis sejtek láthatóak a CA1 területen. **B, C**, Egyazon sejtől származó, egyidejűleg elvezetett akciós potenciálok (alsó felvétel) és aránymértékes Ca^{2+} jel (felső felvétel). A sejt aktivitását extracellulárisan, „loose-patch” módban vezettük el. A fluoreszcens jelben látható csúcsok ugyanazon idegsejtek sorozattüzelésének feleltek meg. A vízszintes lépték 5 s a B, 0.5 s a C, a függőleges lépték 0.1 mA és 110 F340/F380 mindkét panelen. **D, F, H, J**, Szinkron események túlélő hippokampális szeletekben. A baloldali panelek az alapaktivitást, a jobboldaliak pedig ugyanazon szelet drogkezelés utáni aktivitását mutatják. A felső felvételek egyetlen sejt aránymértékes Ca^{2+} jelét mutatják, míg az alatta levő szaggatott vonalak a szinkron eseményekben résztvevő sejtek Ca^{2+} -csúcsait jelenítik meg. Minden sor egy sejtet képvisel drogkezelés előtt és után. A H panelen látható lépték tartozik a D, F, és J panelekhez is, a vízszintes vonal 20 s, a függőleges vonal pedig 100 a D, 140 az F, 140 a H és 250 F340/F380 a J panelen. **E, G, I, K**, A 155 s alatt előforduló szinkron események száma kontroll körülmények és drog alkalmazása után. A függőleges vonalak a páros összehasonlítások mellett a hozzájuk tartozó adatok mediánjait és interkvartilis tartományait mutatják. A csillag a szignifikáns különbséget jelzi (at $P \leq 0.05$). A szinkron események száma minden azonos droggal kezelt szeletben azonos irányban változott. **D, E**, Az NOS-gátló L-NAME megemelte a szinkron események számát a vad típusú (teli körök), de nem az nNOS-génkiütött egérben (üres körök szaggatott vonallal). **F, G**, Az ODQ megemelte a szinkron események számát. **H-K**, Az SNP vagy a Br-cGMP csökkentette a szinkron események számát.

VIII. MEGBESZÉLÉS

VIII.1. „A fejlődő agy nem egy kicsi felnőtt agy”

Magától értetődő, hogy az agy posztnatális fejlődése során lejátszódó folyamatok – gondoljunk akár a szinapszisok megjelenésére, akár a GABA-váltásra vagy a szinkron aktivitásmintázatok kialakulására – alapvetően eltérnek a felnőtt agy működése során zajló folyamatoktól. „A fejlődő agy nem egy kicsi felnőtt agy” – ahogy Ben-Ari és mtsai (2012) fogalmaztak. Ha részleteiben megvizsgáljuk ezeket az eltéréseket, akkor felfedezhetjük a bennük rejlő célszerűséget, mely a hálózatok megfelelő kifejlődését szolgálja. A különböző idegsejt-hálózatok fejlődése során lejátszódó folyamatok meglepő hasonlóságot mutatnak a különböző fajok, illetve a különböző agyterületek között. Ez a megőrzöttség – az egyes szinapszistípusok megjelenésének sorrendje (Khazipov és mtsai 2001; Tyzio és mtsai 1999; Fiala és mtsai 1998), a GABA-váltás lefutása (Ben-Ari, 2007), a szinkron aktivitásmintázatok egymást követő megjelenése (Crépel és mtsai 2007; Alléne és mtsai 2008; Blankenship és Feller, 2010) – arra utal, hogy ezek a folyamatok, illetve ezen folyamatok egymáshoz viszonyított sorrendje fontos szerepet játszik a hálózatok kialakulásában.

A fejlődő idegi rendszerek egyik legjellemzőbb folyamata a GABA-váltás, melynek mechanizmusát részletesen tárgyaltam a Bevezetés IV.1.2. fejezetében. A GABAerg depolarizációnak az agy fejlődésében betöltött kiemelten fontos szerepéhez nem férhet kétség (Wang és Kriegstein 2008, 2011; Cancedda és mtsai 2007; Ge és mtsai 2006; Sipilä és mtsai 2006; Pfeiffer és mtsai 2009; Cherubini és mtsai 2010; összefoglalva: Ben-Ari, 2007). Nagyon érdekes kérdés azonban, hogy miért pont ez a transzmitter-rendszer „vezényli” a hálózatok fejlődését? A választ a GABAerg jelátvitel és a GABAerg idegsejtek különleges tulajdonságaiban kell keresnünk. Összefoglaló munkájukban nagyon ötletesen Akerman és Cline írja, hogy csak a GABAerg rendszer rendelkezik azzal a különleges „szerszámosládával” mely szükséges az idegsejthálózatok „összeszereléséhez” (Akerman és Cline, 2007). Az első fontos tulajdonság, hogy a GABA_A-receptorok főleg a meglehetősen inert klorid-ionok számára járhatóak át, melyek – ellentétben például a kalciummal – nem indítanak be közvetlenül másodlagos jelátviteli folyamatokat. A második fontos tulajdonság is ezzel áll összefüggésben: a GABA áramok irányát a sejten belüli klorid-koncentráció

határozza meg, melyet a klorid-szállító fehérjék fejlődés alatti pontos kifejeződési mintázata irányít. A GABAergen kívül más jelátviteli rendszer nem rendelkezik ezzel a tulajdonsággal. Pontosan ez a rugalmasan szabályozható tulajdonság teszi lehetővé, hogy a GABA-váltás csak akkor történjen meg, amikor már a megfelelő számú glutamáterg szinapszis kialakult, melyek képesek átvenni a depolarizáció biztosításának feladatát. Ezt a feltevést igazolja, hogy a glutamáterg szinapszisokérésének megakadályozása a GABA-váltás elmaradását vonta maga után (Kanold és Shatz, 2006; Akerman és Cline; 2007).

A harmadik különleges tulajdonsága a GABAerg rendszernek az interneuronok kapcsolatrendszerében rejlik. 2009-ben fedezték fel, hogy a posztnatális fejlődés során a hippocampusban vannak olyan ún. csomóponti vagy „hub” GABAerg idegsejtek, melyek kapcsolatrendszere sokkal kiterjedtebb, mint a többi sejt szinaptikus hálózata (Bonifazi és mtsai 2009). A kísérleti eredmények alapján ezek a sejtek tudják beindítani a szinkron hálózati eseményeket, és biztosíthatják több száz sejtől álló csoportok időben összehangolt működését (Bonifazi és mtsai 2009; Case és Soltész, 2009). Egy folyamatosan és dinamikusan épülő és átépülő hálózatban pontosan ezekkel a tulajdonságokkal kell rendelkezniük az idegsejteknek ahhoz, hogy robusztus hatást kifejtve megbízhatóan szinkronizálják a fejlődő hálózatok elemeit.

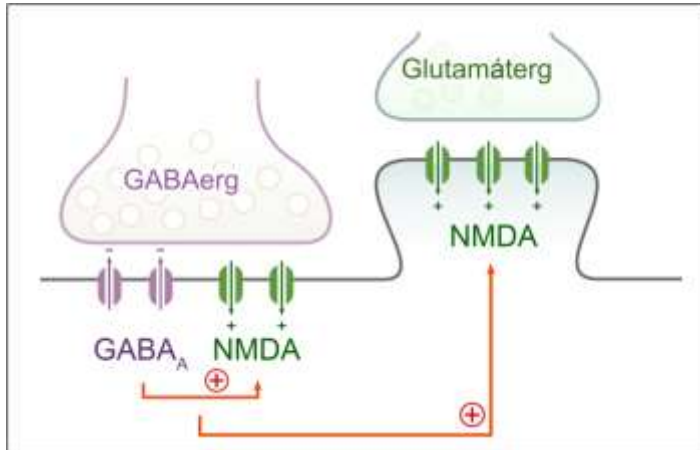
VIII.2. Szinaptikus transzmisszió, szinkron aktivitás és a GABA-NMDA együttműködés szerepe a neuronális hálózatok kialakulásában

A fejlődő idegrendszerben a különböző hálózati aktivitásmintázatok egymást szigorú sorrendben követve jelennek meg, kezdve a legegyszerűbb és lassabb kalcium-platókkal, melyet a megfelelő számú GABAerg kapcsolat megjelenésével felvált az első szinapszis-vezérelt szinkron aktivitás, az SSA (Crépel és mtsai 2007; Alléne és mtsai 2008, 2012; Ben-Ari 2001; Blankenship és Feller, 2010). Az SSA idegsejt-hálózatok fejlődésében betöltött kiemelt szerepét igazolja széleskörű megőrzöttsége mind az egyed- mind pedig a törzsfejlődés során (Ben-Ari, 2001, 2007; Khazipov és mtsai 2001; Khazipov és Luhmann, 2006). Ugyancsak elsődleges fontosságát bizonyítja, hogy mind az idegsejtek morfológiai, mind pedig szinaptikus kapcsolatrendszerének kialakulásához szükséges ez az aktivitásmintázat (Groc és mtsai 2002; Kastanenka és Landmesser, 2010; Colin-Le Brun és mtsai 2004; Huupponen és mtsai 2012). Feltehetőleg a

pajzsmirigy-hormonok is – legalább részben – az SSA elősegítésén keresztül fejtik ki az agy fejlődésében betöltött alapvető hatásukat (Westerholz és mtsai 2010). A spontán szinkron szinaptikus aktivitás eddigi ismereteink szerint két módon látja el a feladatát: egyrészt biztosítja a dendritikus és axonális arborizáció kialakulásához szükséges aktivitást, másrészt pedig az idegsejtek aktivitásának időbeli összehangolása során teremti meg a szinaptogenezis, szinaptikus plaszticitás és szinaptikus integráció lehetőségét (Katz és Shatz, 1996; Mohajerani és Cherubini, 2006; Caiati és mtsai 2013). Az SSA a felnőtt agy szinkron aktivitásmintázataival összevetve sokkal lassabb, a sejtek szinkron kisülésére biztosított időablak is szélesebb. Ezen kívül a fejlődésnek ebben a szakaszában a receptor-áramok is időben elnyújtottabb kinetikát mutatnak, és nagyságuk is sokszorososa az felnőtt agyban tapasztalható áramokhoz viszonyítva (Dingledine és mtsai 1999; Akerman és Cline, 2007). Ezen tulajdonságok jó összhangban vannak az SSA dinamikájával, ezáltal még jobban elősegítve a szinaptogenezist és szinaptikus integrációt.

Az SSA kialakulásához szükséges a GABAerg depolarizáció (Cherubini és mtsai 2011, Ben-Ari, 2007, Pfeiffer és mtsai 2009; Sipilä és mtsai 2006), és az NMDA-receptorok aktivációja is (Crépel és mtsai 2007; Alléne és mtsai 2008; Dupont és mtsai 2006). Ezen felül jól ismert az is, hogy a posztnatális fejlődés során GABAerg depolarizáció képes kilökní az NMDA-receptorok magnézium-blokkját, így elősegítve azok aktiválását. Ez a kölcsönhatás jelentős mértékben hozzájárul az SSA kialakulásához, de a fejlődés során lezajló szinaptikus plaszticitásban is részt vesz (Leinekugel és mtsai 1997; Pavlov és mtsai 2004). Az eredeti elképzelés szerint a GABA_A- és NMDA-receptorok együttműködése egy heteroszínaptikus kölcsönhatáson alapul, azaz a depolarizáció a GABAerg színapszisokból elektrotónusosan áterjed a glutamáterg színapszisokba, ahol elősegíti az NMDAR-aktivációt (Leinekugel és mtsai 1997; Wang és Kriegstein 2008). Munkánkban kimutattuk, hogy a posztnatális fejlődés során az NMDA-receptorok GluN1, GluN2A és GluN2B alegységei jelen vannak a glutamáterg színapszisokon kívül a GABAerg színapszisokban is. Az NMDAR-k mindkét színapszis-típusban kizárólag posztszínaptikusan helyezkedtek el, és a glutamáterg színapszisok csak 1,6-szer tartalmaztak több NMDA-receptort, mint a GABAerg színapszisok. Ez a különbség drámaian megváltozik a felnőtt állatban, ahol a glutamáterg színapszisok 5x több NMDAR-t tartalmaznak, mint a GABAergek.

Közvetlenül kimutattuk azt is, hogy az NMDA- és GABA_A-receptorok együtt fejeződnek ki a GABAerg szinapszisokban. Ezen eredményeink alapján felvázoljuk a GABA-NMDA együttműködés egy új, módosított elméletét, melynek elvét a 21. ábra mutatja.



21. ábra. A vázlat a GABA_A-receptorok és NMDA-receptorok posztnatális fejlődés során történő együttműködésének feltételezett működési elvét ábrázolja

Eredményeink, melyek szerint a GABA_A- és NMDA-receptorok

együtt vannak jelen a GABAerg szinapszisokban, anatómiai alapját képezhetik a posztnatális fejlődés során kiemelt szerepet játszó spontán szinkron aktivitás (SSA) új modelljének. A GABA_A-receptorok áramai által létrehozott posztszinaptikus depolarizáció vezet a GABAerg szinapszisokban elhelyezkedő NMDA-receptorok aktiválásához. Ez a GABAerg szinapszisokban lejátszódó homoszinaptikus receptor aktiváció erős lokális depolarizációt okoz, mely a csendes (AMPA-receptort nem tartalmazó) glutamáterg szinapszisok NMDA-receptorainak heteroszínaptikus aktiválását vonja maga után.

Elgondolásunk szerint a GABA-NMDA együttműködés elsősorban homoszinaptikus kölcsönhatáson alapszik, és csak ezt követően történik meg a heteroszínaptikus hatás, azaz a GABA_A-receptorok aktivációja során kialakuló helyi depolarizáció az ugyanezen szinapszisban elhelyezkedő NMDAR-k aktiválását segíti elő, és az így létrejövő erőteljes depolarizáció nagyobb hatásfokkal képes elérni a távolabbi glutamáterg szinapszisokat is. A GABA-NMDA együttműködés kritikus fontossággal bír az idegsejthálózatok fejlődése során, hiszen elengedhetetlen a szinkron hálózati aktivitás kialakulásához, a szinapszisok létrejöttéhez és a csendes szinapszisok megéréséhez is (Wang és Kriegstein, 2008; Voigt és mtsai 2005; Chancey és mtsai 2013; Kerchner és Nicoll, 2008; Anastasiades és Butt, 2012).

Ugyanakkor az NMDA-receptorok működése során posztszinaptikusan kialakuló aktivitás-függő kalciumjel más folyamatokban is fontos szerepet játszhat. Az NMDAR-aktiváció képes a posztszinaptikusan elhelyezkedő sejtvezeték szerkezetének felépülését, aktivitás-függő átalakulását beindítani (Ackermann és Matus, 2003), mely szerepet játszhat a szinaptogenezis elősegítésén kívül a dendritek morfológiájának kialakításában is. Az NMDA-receptorok aktivációja fontos szabályozója a GABA_A-receptorok oldalirányú mozgásának, szinaptikus felhalmozódásának (Muir és mtsai 2010), sőt, exocitózis során történő membránba kihelyeződésének is (Marsden és mtsai 2007). A fenti eredmények azt sejtetik, hogy a GABAerg szinapszisokban elhelyezkedő NMDA-receptorok minden bizonnyal fontos szerepet játszanak ezen szinapszisok aktivitás-függő plaszticitásának szabályozásában is.

VIII.3. Retrográd jelátvitel a fejlődő agy szinapszisaiban

A kifejlett agy megfelelő működésének alapvető feltétele a serkentés és gátlás egyensúlya (Eichler és Meier, 2008). Ugyanez különösen igaz a fejlődő agyra, ahol egyrészt a dinamikusan változó, átépülő hálózat eleve jobban ki van téve a kóros túlserkentettség káros hatásainak, másrészt pedig a GABAerg jelátvitel későbbi általános gátló működésével szembeni depolarizáló hatásával éppen fokozza a rendszer aktivitását (Turrigiano, 2011; Chapman és mtsai 2012). Ezek alapján az sem véletlen, hogy a kóros serkentettségi állapotok az újszülöttek leggyakoribb neurológiai eltérései közé tartoznak (Kirmse és mtsai 2011). Szükségszerű tehát, hogy a posztnatális fejlődés során – érett és robusztusan működő gátló-hálózat hiányában – jelen legyenek olyan mechanizmusok és szabályozórendszerek, melyek lehetővé teszik a kóros túlserkentettség állapotának elkerülését. Bár a GABAerg jelátvitel képes söntölésen keresztül valamekkora gátlásra (a GABA_A-receptorok egyensúlyi potenciálja az akcióspotenciál küszöbének közelében van, ezért egy erősen depolarizált állapotban levő sejtet még a fejlődés alatt is hiperpolarizáció irányába fog hajtani a rá érkező GABAerg bemenet; Banke és McBain, 2006), ez önmagában nem elegendő.

A retrográd szinaptikus jelátviteli rendszerek általános tulajdonsága, hogy a posztszinaptikus oldal állapotának függvényében befolyásolják a preszinaptikus végkészülék működését, azaz kimondottan alkalmasak egy szinaptikus negatív-visszacsatolás megvalósítására (Zilberter és mtsai 2005). Mivel a fejlődő agy spontán

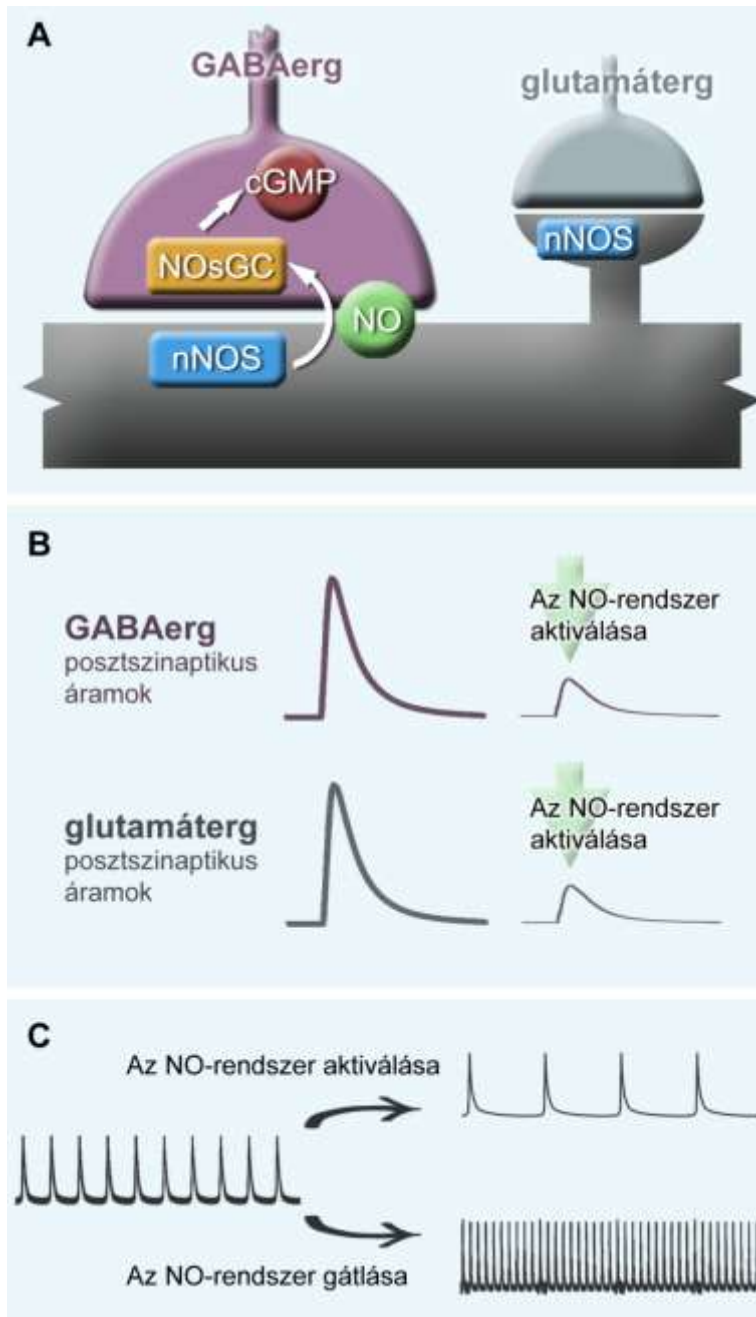
szinkron aktivitását elsősorban a szinaptikus jelátvitel hozza létre, felmerül ezen szinapszisok számos különböző módon történő szabályozásának lehetősége. Eddig több jelátviteli rendszer került már leírásra, melyek a posztnatális fejlődés során a preszinaptikus jelátvitelt befolyásolva szabályozzák a spontán aktivitást. Bár nem retrográd jelátvitel, meg kell említeni a GABAerg preszinaptikus végkészülékeken elhelyezkedő GABA_B-receptorok aktivációját, mely képes befolyásolni a szinkron aktivitás előfordulását (McLean és mtsai 1996). Jól ismert retrográd útvonal az endokannabinoid rendszer, melyről kimutatták, hogy aktivációja csökkentette a szinkron események előfordulását *in vivo* a fejlődő agyban (Bernard és mtsai 2005), továbbá azt is igazolták, hogy a GABAerg depolarizáció képes beindítani ezt a retrográd jelátviteli útvonalat (Urbanski és mtsai 2009). Csoportunknak sikerült igazolni a retrográd nitrogén-monoxid jelátviteli útvonal jelenlétét a posztnatális fejlődés során, mely eredményeinket a 22. ábra foglalja össze.

Kimutattuk, hogy a retrográd NO-jelátviteli útvonal molekuláris elemei jelen vannak a fejlődő hippocampusz GABAerg és glutamáterg szinapszisaiban is. Bizonyítottuk, hogy ez a molekuláris útvonal működőképes, mivel NO-donor hatására preszinaptikus cGMP termelés volt megfigyelhető. Igazoltuk, hogy a retrográd NO-rendszer csökkenti mind a GABAerg, mind pedig a glutamáterg szinaptikus transzmissziót, illetve ezen jelátviteli rendszer stimulálása erőteljesen csökkenti, gátlása pedig nagy mértékben megnöveli a spontán szinkron aktivitás eseményeinek számát. Eredményeink azt mutatják, hogy a szinaptikus retrográd nitrogén-monoxid jelátvitel már a posztnatális fejlődés során működő, általános szinaptikus visszacsatoló-rendszer, mely képes erőteljesen befolyásolni a szinaptikus jelátvitelt, ezen keresztül pedig a spontán szinkron aktivitás alapvető szabályozója.

Mivel az NO szabadon jut át az idegsejtek membránján, ezért az eredeti elgondolások szerint szabályozó hatását akár több száz mikrométerre eldiffundálva, úgynevezett térfogati-jelátvitel során fejt ki. Újabban azonban igazolást nyert, hogy *in vivo* az NO-koncentráció élettani tartománya 4-5 nagyságrenddel kisebb a korábbi elképzelésekben szereplőnél (Hall és Garthwaite, 2009; Wood és mtsai 2011).

Az élettani tartomány – mely a pikomolostól alacsony nanomólos koncentrációkig terjed – feletti nitrogén-monoxid dózisok egyértelműen a kóros állapotokkal hozhatók összefüggésbe. Ezen folyamatok során képződhetnek

peroxinitritek, egyéb szabadgyökök, és megjelenik az S-nitroziláció, tirozin-nitráció, melyek különböző támadási pontokon keresztül neurotoxicitáshoz és neurodegenerációhoz vezetnek (Benarroch, 2011).



22. ábra. Az NO-rendszer molekuláris elemeinek elhelyezkedése, a szinaptikus jelátvitelre és a szinkron hálózati aktivitásra kifejtett hatása

A, A posztnatális fejlődés során a GABAerg szinapszisokban sikerült kimutatnunk posztszinaptikusan az nNOS, preszinaptikusan pedig az NO-receptor jelenlétét. Igazoltuk, hogy NO-val aktiválva ez a receptor képes ezekben a végkészülékekben cGMP-t termelni. Továbbá a glutamaterg szinapszisokban is kimutattuk az nNOS posztszinaptikus jelenlétét. **B,** Az NO-rendszer képes mind a GABAerg, mind pedig a glutamaterg posztszinap-

tikus áramokat csökkenteni. **C,** Az NO-rendszer képes szabályozni a posztnatális fejlődés során kiemelt szerepet játszó spontán szinkron aktivitást (SSA). Az NO-rendszer aktiválása csökkenti, gátlása pedig növeli az időegység alatti szinkron események számát.

Fény derült arra is, hogy az NO-jel csak 1-2 mikrométeres távolságban érzékelhető az egyébként kimondottan érzékeny NOsGC által (Namiki és mtsai 2005; Iino és mtsai 2006, Hall és Garthwaite, 2009), továbbá, hogy a receptor deaktivációja is váratlanul gyors (Bellamy és mtsai 2000; Bellamy és Garthwaite, 2001). Ezek a tulajdonságok nemcsak egy gyors és hatékony, hanem szinapszis-specifikus információ-továbbításra képes jelátviteli rendszert festenek le. Felmerül a kérdés, hogy mi lehet a szerepe az nNOS-t kifejező interneuronokban diffúzan, nagy mennyiségben jelen levő NO-szintáznak, illetve az endothéltől felszabaduló, idegsejteket elérő NO-nak? Nyilvánvaló, hogy ezekből a forrásokból felszabaduló NO alkalmatlan a szinapszis-specifikus szabályozás megvalósítására. A két elgondolás – szinapszis-specifikus vs. térfogati-jelátvitel – egységes elméletbe foglalását John Garthwaite írja le (Garthwaite, 2008). Az elgondolás szerint – melyet kísérletes adatok is alátámasztanak – az endotheliális forrásból és az interneuronokból származó, alacsony koncentrációjú, tónusos nitrogén-monoxid-szintre mintegy ráépül a rövid ideig tartó pulzusokban felszabaduló NO, mely kis területen – a végkészülékek mérettartományában – magasabb koncentrációt elérve képes kifejteni szinapszis-specifikus hatását. Ezen felül az interneuronokból felszabaduló, tónusos NO a neuro-vaszkuláris jelátvitelben is szerepet játszva közvetítheti az agyterület aktuális aktivitási szintjét, ezáltal ahhoz igazítva a helyi vérátáramlás mértékét (Garthwaite, 2008). A pontszerű forrásból felszabaduló NO hatástalanítása elsősorban szétdiffundálása, szövetben való kihigulása során történik meg, míg a tónusos nitrogén-monoxid lebontását egyéb mechanizmusok végzik, melyek között szerepelhet a vörösvérsejtekben és a piramissejtekben is jelenlévő hemoglobin is (Garthwaite, 2008; Schelshorn és mtsai 2009).

Kísérleteink során igazoltuk tehát, hogy a szinapszisokban jelen levő nitrogén-monoxid jelpálya fontos szabályozója mind a szinaptikus működésnek, mind pedig a fejlődő hippokampusz spontán szinkron aktivitásának is. A retrográd NO-jelátvitel azonban más, a fejlődés szempontjából kiemelt fontosságú folyamatban is szerepet játszhat. Az NO-cGMP-jelpálya fontos szerepet játszik az axonok növekedésének szabályozásában, illetve az axonális növekedési kúpok irányításában is (Schmidt és mtsai 2002; Welshans és Rehder, 2005; Murray és mtsai 2009). Az új szinapszisok kialakulásában ugyancsak alapvető fontossággal bír ez a jelátviteli útvonal (Nikonenko

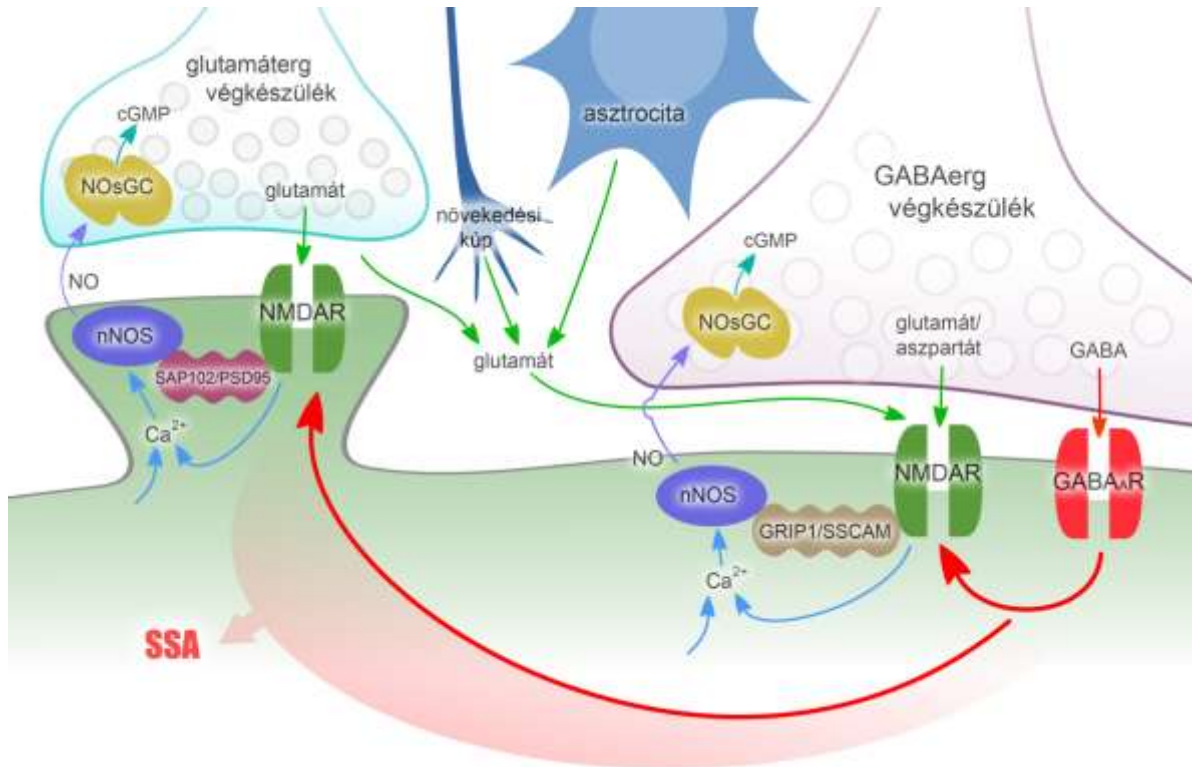
és mtsai 2008; Yoshihara és mtsai 2009). Vizsgálataink során a piramissejtek sejttestein és dendritjein is találtunk a szinapszisokon kívüli sejtmembránhoz társult nNOS-jelölést. Könnyen elképzelhető, hogy ezek a membránterületek leendő szinapszisok lennének, melyek nitrogén-monoxid felszabadításával irányítanak maguk felé a növekvő axonokat, majd hozzájárulnának – a pre- és posztszinaptikus oldal közötti jelátvitellel – a szinapszisok kialakulásához. Ezután ezek az újonnan létrejött szinapszisok egyből rendelkeznének is a saját aktivitásuk retrográd módon történő szabályozásához szükséges molekuláris jelátviteli útvonal elemeivel, mely NO rendszer felnőttkorban is megmarad – ahogyan azt a dolgozatban nem részletezett más munkáinkban korábban leírtuk (Szabadits és Cserép és mtsai 2007).

VIII.4. A posztszinaptikus fehérjeszerkezethez való lehetséges kapcsolódási pontok

A posztszinaptikus denzitás (PSD) felfedezése óta – mely során a preszinaptikus végkészülékkel szemben elhelyezkedő posztszinaptikus membránszakasz „megnövekedett denzitású megvastagodása”-ként írták le (Palay, 1956) – kiderült, hogy a PSD a szinapszisok működésének középpontjában álló, azt alapvetően meghatározó szerkezet, melynek megismerése a modern neurobiológia egyik fő feladata még napjainkban is (Gold, 2012; Iasevoli és mtsai 2013). A PSD az agy talán egyik legösszetettebb szerkezete, felépítésében több ezer molekula, köztük strukturális fehérjék, a sejtvázas különböző elemei, receptorfehérjék, szabályozómolekulák, enzimek vesznek részt (Kennedy, 2000). A GABAerg és a glutamáterg szinapszisok PSD-je nagymértékben eltérnek egymástól, mégis alapvetően ugyanazokat a feladatokat kell ellátniuk (Fritschy és mtsai 2012). A PSD biztosítja a szinapszisok szerkezeti hátterét, azaz a sejtvázas különböző elemei, a szinapszisban elhelyezkedő receptorok, a további jelátvitelben résztvevő molekulák, a különböző allosztérikus modulátorok és a sejt-sejt közötti (jelen esetben transz-szinaptikus) kapcsolatokért felelős membránfehérjék között teremt kapcsolatot. Legalább ennyire fontos azonban, hogy összetett kapcsolatrendszerén keresztül lehetőséget teremt az említett molekuláris elemek mennyiségének, elhelyezkedésének és működésének aktivitás-függő, dinamikus szabályozására, ezáltal alapvető szerepet töltve be a szinaptikus plaszticitás folyamataiban (Iasevoli és mtsai 2013). Az egyik eleme ennek a rendszernek az

úgynevezett „állványozó-fehérjék” csoportja, melyek saját enzimatis aktivitással nem rendelkeznek, viszont tartalmazznak olyan általános szerkezeti modulokat, melyek lehetővé teszik a PSD többi elemének az összekapcsolását (Verpelli és mtsai 2012). A egyik legelterjedtebb ilyen modul a PDZ-domén (Fanning és Anderson, 1996; Feng és Zhang, 2009), mely nevét azoknak a fehérjéknek a kezdőbetűi teszik ki, amelyekben először felfedezték (PSD95/postsynaptic density protein 95, Dlg1/Drosophila disc large tumor suppressor és ZO-1/zonula occludens 1; Ranganathan és Ross, 1997). Sok posztszinaptikus fehérje mellett az NMDA-receptorok és az nNOS is rendelkeznek PDZ-doménnel, és azt is kimutatták, hogy a felnőtt agyban ezeken a doméneken keresztül kapcsolódnak a glutamaterg szinapszisok PSD-jéhez is (Kornau és mtsai 1995; Niethammer és mtsai 1996; Brenman és mtsai 1996). Eredményeink, melyek szerint a posztnatális fejlődés során mind az NMDAR-k, mind pedig az nNOS jelen van a glutamatergen kívül a GABAerg szinapszisokban is, felvetik a kérdést, hogy vajon a GABAerg szinapszisokban is jelen vannak-e PDZ-doménnel rendelkező állványozó-fehérjék?

1997-ben fedezték fel a glutamaterg szinapszisokban a GRIP1 (glutamate-receptor interacting protein 1) nevű, PDZ-doménnel tartalmazó fehérjét (Dong és mtsai 1997). Később kimutatták, hogy a GRIP1 nem csak a glutamaterg, hanem a GABAerg szinapszisokban is jelen van, ahol az egyik legfontosabb GABAerg állványozó-fehérjével, a gephyrinnel is képes kapcsolódni (Charych és mtsai 2004; Li és mtsai 2005; Yu és mtsai 2008). A GRIP1 már embrionális korban is kifejeződik az agyban, ráadásul kiütése embrionális halálhoz vezet, igazolva a fejlődésben betöltött fontos szerepét (Yu és mtsai 2001; Bladt és mtsai 2002). A GRIP1 felfedezése után egy évvel, 1998-ban írták le egy új, PDZ-doménnel rendelkező szinaptikus állványozó-fehérjét, az SSCAM-et (synaptic scaffolding molecule), mely képes volt kötődni az NMDA-receptorokhoz is (Hirao és mtsai 1998, 2000). Később igazolták, hogy az SSCAM jelen van a GABAerg szinapszisokban is, illetve, hogy genetikai kiütése a születés utáni első napon halálhoz vezet, mely a fejlődésben betöltött fontos szerepére utal (Sumita és mtsai 2007; Iida és mtsai 2007). Feltételezésünk szerint ez lehet két olyan molekula, mely PDZ-doménjei segítségével rögzítheti az NMDA-receptorokat és az nNOS-t a GABAerg szinapszisok posztszinaptikus denzitásában (23. ábra), ezáltal megteremtve a két jelátviteli rendszer működésének szerkezeti alapját.



23. ábra. A fejlődő idegsejthálózatok vizsgálata során felderített molekuláris jelátviteli útvonalak rendszere

A GABAerg szinapszisokban a GABA_A-receptorok aktiválódása következtében létrejövő depolarizáció lehetővé teszi az ugyanezen szinapszisban elhelyezkedő NMDA-receptorok aktiválódását, melyek együttes hatásaként a „csendes” glutamaterg szinapszisokban helyet foglaló NMDA-receptorok aktiválódása is megtörténhet (piros nyilak). Ezen folyamatok együttesen segítik elő a spontán szinkron aktivitás (SSA) kialakulását. A GABAerg szinapszisokban helyet foglaló NMDA-receptorok ligandjai (glutamát vagy aszpartát) érkezhettek magukból a GABAerg végkészülekből, asztrocitákból, növekedési kúpokból, vagy akár a távolabb elhelyezkedő glutamaterg végkészülekekből is (zöld nyilak). Az NMDA-receptorok a GABAerg szinapszisokban rögzülhetnek a GRIP1, vagy akár az SSCAM fehérjékhez is, míg a glutamaterg szinapszisokban ugyanezt a feladatot a SAP102 és PSD95 fehérjék látják el. Ugyanezen fehérjék rögzíthetik az nNOS-t is a poszt-szinaptikus denzitáshoz ezekben a szinapszisokban. Az nNOS aktiválásához szükséges kalciumionok az NMDA-receptorokon keresztül, vagy más, sejten belüli illetve kívüli forrásból is származhatnak (kék nyilak). A poszt-szinaptikus kalciumszint emelkedésének következményeként megtermelődött nitrogén-monoxid (NO) a preszinaptikus végkészülekkébe diffundál (lila

nyilak), ahol receptorát (az NOsGC-t) aktiválja, így indítva be a végkészülékben a cGMP termelődését (türkíz nyilak), mely másodlagos jelátviteli folyamatokat beindítva csökkentheti a további jelátvivő-anyag felszabadulást.

A felnőtt agyban a PSD95 rögzíti az NMDA-receptorokat és az nNOS-t a glutamáterg PSD-ben, azonban a posztnatális fejlődés kezdetén alacsony a PSD95 kifejeződése, és szintje csak meglehetősen lassan emelkedik (Lu és mtsai 2000; Swulius és mtsai 2010). A fejlődésnek ebben a korai szakaszában jelen van azonban a glutamáterg szinapszisokban a SAP102 (synapse associated protein 102), egy PDZ-doménnel rendelkező állványozó-fehérje, mely ugyancsak képes az NMDA-receptorokkal kapcsolódni (Petralia és mtsai 2005; Müller és mtsai 1996; Sans és mtsai 2000). Feltételezéseink szerint a glutamáterg szinapszisokban a fejlődés során a SAP102, majd a fokozatosan növekvő mennyiségű PSD95 rögzíti az NMDA-receptorokat és az nNOS-t a posztszinaptikus denzitásban (23. ábra).

VIII.5. A molekuláris jelátviteli útvonalak ligandjainak lehetséges forrásai

Az NMDA-receptorok aktiválásához három feltétel egyidejű teljesülése szükséges: 1. a Mg^{2+} -blokkot kilökő depolarizáció, 2. a ko-agonista (glicin/D-szerin) kötődése és 3. az agonista (glutamát/aszpartát)-kötőhely telítése. A fejlődés általunk vizsgált szakaszában a depolarizációt elsősorban a GABAerg jelátvitel biztosítja, melyhez a fokozatosan megjelenő glutamáterg szinapszisok működése egyre növekvő mértékben járul hozzá (Ben-Ari és mtsai 1997; Leinekugel és mtsai 1999). Az NMDA-receptorok ko-agonistái közül a glicin elsősorban a kéreg alatti területeken termelődik, míg az agykéregben a D-szerin van jelen nagyobb mennyiségben (Schell és mtsai 1997), továbbá a D-szerin sokkal erőteljesebben (nanomólos tartományba eső ED_{50} -es értékkel) kötődik az NMDA-receptorok ko-agonista kötőhelyéhez, mint a glicin (Nishikawa, 2011). Bár a sejten kívüli térben található D-szerin szintje a posztnatális fejlődés során meredeken emelkedik, már a születés utáni első napon eléri az alacsony mikromólos szintet az agykéregben (Wang és Zhu, 2003). A D-szerin a vizsgálatok során asztrocitákból szabadul fel, és ebben a koncentrációban bőségesen elegendő az NMDA-receptorok aktiválásához (Auld és Robitaille, 2003; Yang és mtsai 2003). A

kérdés tehát az, hogy honnan származik az NMDA-receptorok aktiválásához szükséges glutamát vagy aszpartát?

A klasszikus szinaptikus transzmisszió során a preszinaptikus végkészülékből felszabaduló jelátvivő anyag a posztzinaptikus receptorhoz kötődve fejt ki hatását. Több kísérleti eredmény is arra utal, hogy a GABAerg szinapszisok a GABA mellett más jelátvivő-anyagokat is ürítenek. Kimutatták, hogy az NMDA-receptorok ligandjai, az aszpartát és a glutamát is aktivitás-függő módon szabadul fel a GABAerg szinapszisokból (Gundersen és mtsai 2004; Nadler, 2011; Noh és mtsai 2010). Ezeknek a ligandoknak a preszinaptikus vezikulákba történő felvételére alkalmas, 3-as típusú vezikuláris glutamát transzporter (vGluT3) jelenléte már a fejlődés korai szakaszában kimutatható (Gras és mtsai 2005). Így a GABAerg szinapszisokból felszabaduló ligandok hozzájárulhatnak az ugyanitt elhelyezkedő NMDA-receptorok aktiválásához (23. ábra). Az NMDA-receptorok ligandjainak ugyancsak forrásai lehetnek az asztrociták. Leírták, hogy az asztrociták aktivitás-függő vezikuláris módon képesek jelátvivőanyagok ürítésére (Montana és mtsai 2006), így képesek glutamátot és D-serint is felszabadítani (Bezzi és mtsai 2004; Bergersen és Gundersen, 2009; Bergersen és mtsai 2011). Azt is igazolták, hogy az ily módon felszabaduló glutamát képes az idegsejteken található NMDAR-k aktiválására is (Jourdain és mtsai 2007; Bardoni és mtsai 2010). A posztnatális fejlődés során ráadásul az asztrociták az idegsejtek által létrehozott SSA-val összehangolt spontán szinkron aktivitással is rendelkeznek, mely során aktivitás-függő módon üríthetik a glutamátot (Aguado és mtsai 2002). Jó esély van tehát arra, hogy az asztrocitákból származó ligandok hozzájárulnak a GABAerg szinapszisokban jelen levő NMDAR-k aktiválásához a posztnatális időszak során (23. ábra).

Az axonális növekedési kúpokról ismert, hogy különféle jelátvivő-anyagokat – például acetil-kolint, GABA-t, vagy éppen glutamátot – képesek üríteni (Yao és mtsai 2000; Gao és van den Pol, 2000; Soeda és mtsai 1997), feszültség-függő kalciumcsatornák aktiválása után (Soeda és mtsai 2002). Így ezekből a növekedési kúpokból felszabaduló glutamát is hozzájárulhat a GABAerg szinapszisokban található NMDAR-k aktiválásához (23. ábra).

A felnőtt agyban a szűk sejtközi tér, illetve a hatékony gliális glutamát-felvétel miatt korlátozott a glutamáterg szinapszisokból „kicsorgó” glutamát hatása (Kullmann

és Asztély, 1998). A fejlődő agyban azonban a tágasabb sejtközötti tér, illetve a gliális glutamát-felvevő rendszerek alacsonyabb kifejeződése miatt a glutamáterg szinapszisokból felszabaduló glutamát is könnyebben eljuthat a közelben levő GABAerg szinapszisokhoz, és részt vehet az azokban elhelyezkedő NMDA-receptorok aktiválásában (Thomas és mtsai 2011; 23. ábra).

Az nNOS a megnövekedett sejten belüli kalciumszint hatására kalcium-kalmodulin komplexet kötve aktiválódik (Prast és Philippu, 2001). A posztnatális fejlődés során a GABA_A-receptorok kinyílása során kialakuló depolarizáció képes mind feszültségfüggő kalciumcsatornák, mind pedig NMDA-receptorok aktiválásán keresztül posztszinaptikus kalcium-beáramlást okozni (Eilers és mtsai 2001; Kullmann és Kandler, 2008; Leinekugel és mtsai 1997). Ez a kalciumszint-emelkedés aktivitás-függő módon beindíthatja a retrográd nitrogén-monoxid jelátvitelt (23. ábra). A felnőtt agyban a PSD95 képes egy fehérjekomplexben rögzíteni az NMDA-receptorokat és az nNOS-t, mely lehetővé teszi, hogy az NMDA-receptorokon keresztül beáramló kalcium nagyon hatékonyan aktiválhassa az NO-jelátvitelt (Christopherson és mtsai 1999). A fejlődés során a glutamáterg szinapszisokban a SAP102, míg a GABAerg szinapszisokban a GRIP1 és az SSCAM is képes lehet erre PDZ-doménjeiken keresztül, ezáltal lehetővé téve az nNOS hatékony aktiválását. Jelenlegi ismeretink szerint úgy tűnik, hogy a felnőtt agyban az nNOS nem aktiválható sejten belüli kalciumraktárakból (Alagarsamy és mtsai 1994), ez azonban nem zárja ki, hogy a posztnatális fejlődés során ilyen módon aktiválódjon a retrográd nitrogén-monoxid jelátvitel.

IX. KÖVETKEZTETÉSEK

A GABA a felnőtt agy fő gátló jelátvivőanyaga, mely az idegrendszer fejlődése során depolarizáló hatást fejt ki. Ez a GABAerg depolarizáció kiemelten fontos szerepet játszik a az idegsejthálózatok megfelelő kifejlődésében. Többek között ez a hatás tudja kilökní az NMDA-receptorok Mg^{2+} -blokkját, hozzájárulva ezen receptorok aktiválásához. A $GABA_A$ - és az NMDA-receptorok illetén együttműködése ugyancsak alapvető szerepet tölt be az idegrendszer fejlődésében, illetve a spontán szinkron aktivitás (SSA) kialakításában is.

Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a fejlődés korai posztnatális szakaszában pontosan hol helyezkednek el az NMDAR-ok. Elektronmikroszkópos kísérleteink során kimutattuk, hogy az NMDA-receptorok GluN1, GluN2A és GluN2B alegységei jelen vannak mind a glutamáterg, mind pedig a GABAerg szinapszisokban, kizárólag posztszinaptikusan. A kvantitatív beágyazás-utáni immunarany módszerrel azt találtuk, hogy az NMDAR-ok 3x nagyobb sűrűséggel vannak jelen a glutamáterg szinapszisokban mint a GABAergekben, viszont mivel utóbbi szinapszisok közel 2x nagyobbak, a kétféle szinapszis hasonló számú NMDAR-t tartalmaz. Ez éles ellentétben áll a felnőtt agyban mért eredményeinkkel, ahol a glutamáterg szinapszisok 5x több NMDA-receptort fejeznek ki, mint a GABAergek. Ez arra utal, hogy a fejlődés során a GABAerg szinapszisokban elhelyezkedő NMDAR-ok kiemelten fontos szerepet töltenek be. Eredményeink alapján feltételezzük továbbá, hogy a fejlődés során fontos szerepet betöltő GABA-NMDA-együttműködés elsődleges helyszíne a GABAerg szinapszis, ahol az NMDAR-aktiváció hozzájárulhat az SSA kialakulásához, a hálózatok megfelelő kialakulásához elengedhetetlen posztszinaptikus kalciumjelekhez, illetve a GABAerg szinapszisok aktivitásfüggő plaszticitási folyamataihoz is.

Mivel a fejlődés ezen szakaszában a GABAerg jelátvitel serkentő hatású, szükségeszerű egy általános negatív visszacsatoló rendszer jelenléte. Vizsgálataink során arra kerestük a választ, hogy vajon a retrográd NO-jelátviteli rendszer betöltheti-e ezt a szerepet. Teljes-sejt elvezetéssel kimutattuk, hogy a NO-jelátvitel mind a glutamáterg, mind pedig a GABAerg szinaptikus jelátvitelt befolyásolja a korai posztnatális időszakban, mégpedig csökkenti a szinaptikus jelátvitel hatékonyságát. Fény- és elektronmikroszkópos módszerekkel felderítettük a retrográd NO-jelátviteli útvonal

molekuláris elemeinek pontos elhelyezkedését mindkét típusú szinapszisban. Multineuron-kalcium-képződést alkalmazva akut szeletekben kimutattuk, hogy az NO-jelátvitel részt vesz a szinkron hálózati aktivitás szabályozásában is, mivel az NO-jelátviteli útvonal serkentése csökkentette, gátlása pedig megemelte az SSA során időegység alatt lejátszódó szinkron események számát. Feltételezzük, hogy a retrográd NO-rendszer alkalmas lehet egy általános szinaptikus szabályozó szerep betöltésére, és hatékonyan befolyásolhatja a hálózati aktivitást, amikor a GABAerg jelátvitel még depolarizáló hatású.

X. ÖSSZEFOGLALÁS

A GABA – a felnőtt agy fő gátló jelátvivőanyaga – az idegrendszer fejlődése során depolarizáló hatást fejt ki. Ez a GABAerg depolarizáció az NMDAR-okkal együttműködve hozza létre a spontán szinkron aktivitást (SSA). Mindezek a folyamatok elengedhetetlenül fontosak az idegsejthálózatok megfelelő kifejlődéséhez.

Első kísérletsorozatunkban megállapítottuk, hogy a fejlődés korai posztnatális szakaszában pontosan hol helyezkednek el az NMDAR-ok. Elektronmikroszkópos kísérleteinkben azt találtuk, hogy a GluN1, GluN2A és GluN2B NMDAR alegységek jelen vannak mind a glutamáterg, mind pedig a GABAerg szinapszisokban, kizárólag posztszinaptikusan. A kvantitatív beágyazás-utáni immunarany módszerrel kimutattuk, hogy az NMDAR-ok sűrűsége 3x nagyobb a glutamáterg szinapszisokban mint a GABAergekben, viszont mivel utóbbi szinapszisok közel 2x nagyobbak, a kétféle szinapszis hasonló számú NMDAR-t tartalmaz. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a fejlődés során fontos szerepet betöltő GABA-NMDA-együttműködés elsődleges helyszíne a GABAerg szinapszis.

Mivel a fejlődés ezen szakaszában a GABAerg jelátvitel serkentő hatású, szükségeszerű egy általános negatív visszacsatoló rendszer jelenléte. Második kísérletsorozatunkban arra kerestük a választ, hogy vajon a retrográd NO-jelátviteli rendszer betöltheti-e ezt a szerepet. Teljes-sejt elvezetéssel kimutattuk, hogy a NO-jelátvitel mind a glutamáterg, mind pedig a GABAerg szinaptikus jelátvitelt befolyásolja a korai posztnatális időszakban. Fény- és elektronmikroszkópos módszerekkel felderítettük a retrográd NO-jelátviteli útvonal molekuláris elemeinek pontos elhelyezkedését mindkét típusú szinapszisban. Multineuron-kalcium-képzőanyagot alkalmazva akut szeletekben kimutattuk, hogy az NO-jelátvitel részt vesz a szinkron hálózati aktivitás szabályozásában is. Feltételezzük, hogy a retrográd NO-rendszer alkalmas lehet egy általános szinaptikus szabályozó szerep betöltésére, és hatékonyan befolyásolhatja a hálózati aktivitást, amikor a GABAerg jelátvitel még depolarizáló hatású.

SUMMARY

GABA – the main inhibitory transmitter in the adult brain – exerts depolarizing effects during development. This GABAergic depolarization cooperates with NMDAR-s to produce spontaneous synchronous activity. All these processes are indispensable for the proper formation of neuronal networks.

In the first series of experiments we determined the exact subcellular distribution of NMDAR-s during the early postnatal period of development. Using electron-microscopy, we found that GluN1, GluN2A and GluN2B NMDAR subunits are present both in glutamatergic and GABAergic synapses, exclusively postsynaptically. Quantitative post-embedding immunogold reactions confirmed that the density of NMDARs is 3x higher in glutamatergic than in GABAergic synapses. Since GABAergic synapses are about 2x larger, the two types of synapses contained similar amounts of NMDARs. Based on our results we suggest that the developmentally important GABA-NMDA cooperation takes place primarily in GABAergic synapses.

Since GABAergic transmission is mainly depolarizing during early postnatal development, the existence of a powerful negative feedback mechanism is necessary. In our second series of experiments we tested whether the retrograde NO-system could fulfill this role. Using whole-cell recording we showed that NO signaling modulates not only glutamatergic but also GABAergicsynaptic transmission during the earlypostnatal period. We identified the precise subcellular localizationof key elements of the underlying molecular cascade using immunohistochemistry at the light- and electron microscopiclevels. As predicted by these morpho-functional data, multineuroncalcium imaging in acute slices revealed that this NO-signalingmachinery is involved also in the control of synchronous networkactivity patterns. We suggest that the retrograde NO-signalingsystem is ideally suited to fulfill a general synaptic regulatoryrole and may effectively fine-tune network activity during earlypostnatal development, while GABAergic transmission is stilldepolarizing.

XI. IRODALOMJEGYZÉK

- Abe M, Fukaya M, Yagi T, Mishina M, Watanabe M, Sakimura K (2004) NMDA receptor GluRepsilon/NR2 subunits are essential for postsynaptic localization and protein stability of GluRzeta1/NR1 subunit. *J Neurosci* 24:7292-7304.
- Ackermann M, Matus A (2003) Activity-induced targeting of profilin and stabilization of dendritic spine morphology. *Nat Neurosci* 6:1194-1200.
- Aguado F, Espinosa-Parrilla JF, Carmona MA, Soriano E (2002) Neuronal activity regulates correlated network properties of spontaneous calcium transients in astrocytes in situ. *J Neurosci* 22:9430-9444.
- Akashi K, Kakizaki T, Kamiya H, Fukaya M, Yamasaki M, Abe M, Natsume R, Watanabe M, Sakimura K (2009) NMDA receptor GluN2B (GluR epsilon 2/NR2B) subunit is crucial for channel function, postsynaptic macromolecular organization, and actin cytoskeleton at hippocampal CA3 synapses. *J Neurosci* 29:10869-10882.
- Akazawa C, Shigemoto R, Bessho Y, Nakanishi S, Mizuno N (1994) Differential expression of five N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the cerebellum of developing and adult rats. *J Comp Neurol* 347:150-160.
- Akerman C, Cline H (2007) Refining the roles of GABAergic signaling during neural circuit formation. *Trends Neurosci* 30:382-389.
- Alagarsamy S, Lonart G, Johnson KM (1994) Regulation of nitric oxide synthase activity in cortical slices by excitatory amino acids and calcium. *J Neurosci Res* 38:648-653.
- Allene C, Picardo MA, Becq H, Miyoshi G, Fishell G, Cossart R (2012) Dynamic changes in interneuron morphophysiological properties mark the maturation of hippocampal network activity. *J Neurosci* 32:6688-6698.
- Allène C, Cattani A, Ackman J, Bonifazi P, Aniksztejn L, Ben-Ari Y, Cossart R (2008) Sequential generation of two distinct synapse-driven network patterns in developing neocortex. *J Neurosci* 28:12851-12863.
- Altman J, Bayer SA (1990) Prolonged sojourn of developing pyramidal cells in the intermediate zone of the hippocampus and their settling in the stratum pyramidale. *J Comp Neurol* 301:343-364.

- Amaral DG, Witter, MP. Hippocampal formation. In: Paxinos G, szerkesztő. The rat nervous system, 2. kiadás. San Diego: Academic Press 1995:433-495
- Anastasiades PG, Butt SJ (2012) A role for silent synapses in the development of the pathway from layer 2/3 to 5 pyramidal cells in the neocortex. *J Neurosci* 32:13085-13099.
- Ashby MC, Isaac JT (2011) Maturation of a recurrent excitatory neocortical circuit by experience-dependent unsilencing of newly formed dendritic spines. *Neuron* 70:510-521.
- Auld DS, Robitaille R (2003) Glial cells and neurotransmission: an inclusive view of synaptic function. *Neuron* 40:389-400.
- Azevedo FA, Carvalho LR, Grinberg LT, Farfel JM, Ferretti RE, Leite RE, Jacob Filho W, Lent R, Herculano-Houzel S (2009) Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J Comp Neurol* 513:532-541.
- Banke TG, McBain CJ (2006) GABAergic input onto CA3 hippocampal interneurons remains shunting throughout development. *J Neurosci* 26:11720-11725.
- Bardoni R, Ghirri A, Zonta M, Betelli C, Vitale G, Ruggieri V, Sandrini M, Carmignoto G (2010) Glutamate-mediated astrocyte-to-neuron signalling in the rat dorsal horn. *J Physiol* 588:831-846.
- Barkis WB, Ford KJ, Feller MB (2010) Non-cell-autonomous factor induces the transition from excitatory to inhibitory GABA signaling in retina independent of activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:22302-22307.
- Barnard EA, Skolnick P, Olsen RW, Mohler H, Sieghart W, Biggio G, Braestrup C, Bateson AN, Langer SZ (1998) International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev* 50:291-313.
- Bayer SA (1980) Development of the hippocampal region in the rat. II. Morphogenesis during embryonic and early postnatal life. *J Comp Neurol* 190:115-134.
- Behar TN, Schaffner AE, Scott CA, Greene CL, Barker JL (2000) GABA receptor antagonists modulate postmitotic cell migration in slice cultures of embryonic rat cortex. *Cereb Cortex* 10:899-909.

- Bellamy T, Garthwaite J (2001) Sub-second kinetics of the nitric oxide receptor, soluble guanylyl cyclase, in intact cerebellar cells. *J Biol Chem* 276:4287-4292.
- Bellamy T, Wood J, Goodwin D, Garthwaite J (2000) Rapid desensitization of the nitric oxide receptor, soluble guanylyl cyclase, underlies diversity of cellular cGMP responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:2928-2933.
- Ben Fredj N, Hammond S, Otsuna H, Chien CB, Burrone J, Meyer MP (2010) Synaptic activity and activity-dependent competition regulates axon arbor maturation, growth arrest, and territory in the retinotectal projection. *J Neurosci* 30:10939-10951.
- Ben-Ari Y (2001) Developing networks play a similar melody. *Trends Neurosci* 24:353-360.
- Ben-Ari Y, Tyzio R, Nehlig A (2011) Excitatory action of GABA on immature neurons is not due to absence of ketone bodies metabolites or other energy substrates. *Epilepsia* 52:1544-1558.
- Ben-Ari Y, Cherubini E, Corradetti R, Gaiarsa JL (1989) Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *J Physiol* 416:303-325.
- Ben-Ari Y, Gaiarsa J, Tyzio R, Khazipov R (2007) GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiol Rev* 87:1215-1284.
- Ben-Ari Y, Khazipov R, Leinekugel X, Caillard O, Gaiarsa JL (1997) GABA_A, NMDA and AMPA receptors: a developmentally regulated 'ménage à trois'. *Trends Neurosci* 20:523-529.
- Ben-Ari Y, Woodin MA, Sernagor E, Cancedda L, Vinay L, Rivera C, Legendre P, Luhmann HJ, Bordey A, Wenner P, Fukuda A, van den Pol AN, Gaiarsa JL, Cherubini E (2012) Refuting the challenges of the developmental shift of polarity of GABA actions: GABA more exciting than ever! *Front Cell Neurosci* 6:35.
- Benarroch EE (2011) Nitric oxide: A pleiotropic signal in the nervous system. *Neurology* 77:1568-1576.
- Bergersen LH, Gundersen V (2009) Morphological evidence for vesicular glutamate release from astrocytes. *Neuroscience* 158:260-265.

- Bergersen LH, Morland C, Ormel L, Rinholm JE, Larsson M, Wold JF, Røe AT, Stranna A, Santello M, Bouvier D, Ottersen OP, Volterra A, Gundersen V (2011) Immunogold Detection of L-glutamate and D-serine in Small Synaptic-Like Microvesicles in Adult Hippocampal Astrocytes. *Cereb Cortex*.
- Bergmann O, Frisén J (2013) Neuroscience. Why adults need new brain cells. *Science* 340:695-696.
- Bergmann O, Liebl J, Bernard S, Alkass K, Yeung MS, Steier P, Kutschera W, Johnson L, Landén M, Druid H, Spalding KL, Frisén J (2012) The age of olfactory bulb neurons in humans. *Neuron* 74:634-639.
- Bernard C, Milh M, Morozov Y, Ben-Ari Y, Freund T, Gozlan H (2005) Altering cannabinoid signaling during development disrupts neuronal activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:9388-9393.
- Bezaire MJ, Soltesz I (2013) Quantitative assessment of CA1 local circuits: Knowledge base for interneuron-pyramidal cell connectivity. *Hippocampus*.
- Bezzi P, Gundersen V, Galbete JL, Seifert G, Steinhäuser C, Pilati E, Volterra A (2004) Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat Neurosci* 7:613-620.
- Black M, Simmonds J, Senyah Y, Wettstein J (2002) Neonatal nitric oxide synthase inhibition: social interaction deficits in adulthood and reversal by antipsychotic drugs. *Neuropharmacology* 42:414-420.
- Blackshaw S, Eliasson M, Sawa A, Watkins C, Krug D, Gupta A, Arai T, Ferrante R, Snyder S (2003) Species, strain and developmental variations in hippocampal neuronal and endothelial nitric oxide synthase clarify discrepancies in nitric oxide-dependent synaptic plasticity. *Neuroscience* 119:979-990.
- Bladt F, Tafuri A, Gelkop S, Langille L, Pawson T (2002) Epidermolysis bullosa and embryonic lethality in mice lacking the multi-PDZ domain protein GRIP1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:6816-6821.
- Blankenship A, Feller M (2010) Mechanisms underlying spontaneous patterned activity in developing neural circuits. *Nat Rev Neurosci* 11:18-29.
- Bogen IL, Jensen V, Hvalby O, Walaas SI (2009) Synapsin-dependent development of glutamatergic synaptic vesicles and presynaptic plasticity in postnatal mouse brain. *Neuroscience* 158:231-241.

- Bon C, Garthwaite J (2003) On the role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci* 23:1941-1948.
- Bonifazi P, Goldin M, Picardo M, Jorquera I, Cattani A, Bianconi G, Represa A, Ben-Ari Y, Cossart R (2009) GABAergic hub neurons orchestrate synchrony in developing hippocampal networks. *Science* 326:1419-1424.
- Bony G, Szczurkowska J, Tamagno I, Shelly M, Contestabile A, Cancedda L (2013) Non-hyperpolarizing GABAB receptor activation regulates neuronal migration and neurite growth and specification by cAMP/LKB1. *Nat Commun* 4:1800.
- Borodinsky LN, O'Leary D, Neale JH, Vicini S, Coso OA, Fiszman ML (2003) GABA-induced neurite outgrowth of cerebellar granule cells is mediated by GABA(A) receptor activation, calcium influx and CaMKII and erk1/2 pathways. *J Neurochem* 84:1411-1420.
- Bregestovski P, Bernard C (2012) Excitatory GABA: How a Correct Observation May Turn Out to be an Experimental Artifact. *Front Pharmacol* 3:65.
- Brenman JE, Chao DS, Gee SH, McGee AW, Craven SE, Santillano DR, Wu Z, Huang F, Xia H, Peters MF, Froehner SC, Brecht DS (1996) Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell* 84:757-767.
- Brisson DR, Schultz RM (1997) Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor alpha. *Biol Reprod* 56:1088-1096.
- Brustein E, Côté S, Ghislain J, Drapeau P (2013) Spontaneous glycine-induced calcium transients in spinal cord progenitors promote neurogenesis. *Dev Neurobiol* 73:168-175.
- Buhl DL, Buzsáki G (2005) Developmental emergence of hippocampal fast-field "ripple" oscillations in the behaving rat pups. *Neuroscience* 134:1423-1430.
- Burette A, Zabel U, Weinberg R, Schmidt H, Valtschanoff J (2002) Synaptic localization of nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase in the hippocampus. *J Neurosci* 22:8961-8970.
- Buzsáki G (1989) Two-stage model of memory trace formation: a role for "noisy" brain states. *Neuroscience* 31:551-570.

- Buzsáki G, Watson BO (2012) Brain rhythms and neural syntax: implications for efficient coding of cognitive content and neuropsychiatric disease. *Dialogues Clin Neurosci* 14:345-367.
- Buzsáki G, Wang XJ (2012) Mechanisms of gamma oscillations. *Annu Rev Neurosci* 35:203-225.
- Bystron I, Blakemore C, Rakic P (2008) Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. *Nat Rev Neurosci* 9:110-122.
- Caiati MD, Safiulina VF, Fattorini G, Sivakumaran S, Legname G, Cherubini E (2013) PrPC controls via protein kinase A the direction of synaptic plasticity in the immature hippocampus. *J Neurosci* 33:2973-2983.
- Cancedda L, Fiumelli H, Chen K, Poo M (2007) Excitatory GABA action is essential for morphological maturation of cortical neurons in vivo. *J Neurosci* 27:5224-5235.
- Case M, Soltesz I (2009) Discreet charm of the GABAergic bourgeoisie: superconnected cells conduct developmental symphonies. *Neuron* 64:780-782.
- Catalani A, Sabbatini M, Consoli C, Cinque C, Tomassoni D, Azmitia E, Angelucci L, Amenta F (2002) Glial fibrillary acidic protein immunoreactive astrocytes in developing rat hippocampus. *Mech Ageing Dev* 123:481-490.
- Chancey JH, Adlaf EW, Sapp MC, Pugh PC, Wadiche JI, Overstreet-Wadiche LS (2013) GABA depolarization is required for experience-dependent synapse unsilencing in adult-born neurons. *J Neurosci* 33:6614-6622.
- Chang Y, Gottlieb D (1988) Characterization of the proteins purified with monoclonal antibodies to glutamic acid decarboxylase. *J Neurosci* 8:2123-2130.
- Chapman KE, Raol YH, Brooks-Kayal A (2012) Neonatal seizures: controversies and challenges in translating new therapies from the lab to the isolette. *Eur J Neurosci* 35:1857-1865.
- Charych EI, Yu W, Li R, Serwanski DR, Miralles CP, Li X, Yang BY, Pinal N, Walikonis R, De Blas AL (2004) A four PDZ domain-containing splice variant form of GRIP1 is localized in GABAergic and glutamatergic synapses in the brain. *J Biol Chem* 279:38978-38990.

- Cherubini E, Griguoli M, Safiulina V, Lagostena L (2011) The depolarizing action of GABA controls early network activity in the developing hippocampus. *Mol Neurobiol* 43:97-106.
- Christopherson KS, Hillier BJ, Lim WA, Brecht DS (1999) PSD-95 assembles a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain. *J Biol Chem* 274:27467-27473.
- Chung Y, Kim Y, Lee W (2004) Distribution of neuronal nitric oxide synthase-immunoreactive neurons in the cerebral cortex and hippocampus during postnatal development. *J Mol Histol* 35:765-770.
- Clancy B, Finlay BL, Darlington RB, Anand KJ (2007) Extrapolating brain development from experimental species to humans. *Neurotoxicology* 28:931-937.
- Colin-Le Brun I, Ferrand N, Caillard O, Tosetti P, Ben-Ari Y, Gaïarsa JL (2004) Spontaneous synaptic activity is required for the formation of functional GABAergic synapses in the developing rat hippocampus. *J Physiol* 559:129-139.
- Crépel V, Aronov D, Jorquera I, Represa A, Ben-Ari Y, Cossart R (2007) A parturition-associated nonsynaptic coherent activity pattern in the developing hippocampus. *Neuron* 54:105-120.
- Daff S (2010) NO synthase: structures and mechanisms. *Nitric Oxide* 23:1-11.
- Danglot L, Triller A, Marty S (2006) The development of hippocampal interneurons in rodents. *Hippocampus* 16:1032-1060.
- Datwani A, Iwasato T, Itohara S, Erzurumlu RS (2002) NMDA receptor-dependent pattern transfer from afferents to postsynaptic cells and dendritic differentiation in the barrel cortex. *Mol Cell Neurosci* 21:477-492.
- de Vente J, Steinbusch H, Schipper J (1987) A new approach to immunocytochemistry of 3',5'-cyclic guanosine monophosphate: preparation, specificity, and initial application of a new antiserum against formaldehyde-fixed 3',5'-cyclic guanosine monophosphate. *Neuroscience* 22:361-373.
- Dick O, tom Dieck S, Altmann WD, Ammermüller J, Weiler R, Garner CC, Gundelfinger ED, Brandstätter JH (2003) The presynaptic active zone protein

- bassoon is essential for photoreceptor ribbon synapse formation in the retina. *Neuron* 37:775-786.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51:7-61.
- Domek-Łopacińska K, Strosznajder JB (2005) Cyclic GMP metabolism and its role in brain physiology. *J Physiol Pharmacol* 56 Suppl 2:15-34.
- Domek-Łopacińska K, van de Waarenburg M, Markerink-van Ittersum M, Steinbusch H, de Vente J (2005) Nitric oxide-induced cGMP synthesis in the cholinergic system during the development and aging of the rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 158:72-81.
- Dong H, O'Brien RJ, Fung ET, Lanahan AA, Worley PF, Huganir RL (1997) GRIP: a synaptic PDZ domain-containing protein that interacts with AMPA receptors. *Nature* 386:279-284.
- Downs KM, Davies T (1993) Staging of gastrulating mouse embryos by morphological landmarks in the dissecting microscope. *Development* 118:1255-1266.
- du Bois TM, Huang XF (2007) Early brain development disruption from NMDA receptor hypofunction: relevance to schizophrenia. *Brain Res Rev* 53:260-270.
- Dupont E, Hanganu IL, Kilb W, Hirsch S, Luhmann HJ (2006) Rapid developmental switch in the mechanisms driving early cortical columnar networks. *Nature* 439:79-83.
- Dupuy S, Houser C (1996) Prominent expression of two forms of glutamate decarboxylase in the embryonic and early postnatal rat hippocampal formation. *J Neurosci* 16:6919-6932.
- Dzhala V, Talos D, Sdrulla D, Brumback A, Mathews G, Benke T, Delpire E, Jensen F, Staley K (2005) NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. *Nat Med* 11:1205-1213.
- Eichler SA, Meier JC (2008) E-I balance and human diseases - from molecules to networking. *Front Mol Neurosci* 1:2.
- Eilers J, Plant T, Marandi N, Konnerth A (2001) GABA-mediated Ca²⁺ signalling in developing rat cerebellar Purkinje neurones. *J Physiol* 536:429-437.
- Elias LA, Wang DD, Kriegstein AR (2007) Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex. *Nature* 448:901-907.

- Espósito MS, Piatti VC, Laplagne DA, Morgenstern NA, Ferrari CC, Pitossi FJ, Schinder AF (2005) Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *J Neurosci* 25:10074-10086.
- Fanning AS, Anderson JM (1996) Protein-protein interactions: PDZ domain networks. *Curr Biol* 6:1385-1388.
- Fanning AS, Anderson JM (1999) PDZ domains: fundamental building blocks in the organization of protein complexes at the plasma membrane. *J Clin Invest* 103:767-772.
- Fellin T, Pascual O, Gobbo S, Pozzan T, Haydon PG, Carmignoto G (2004) Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron* 43:729-743.
- Feng W, Zhang M (2009) Organization and dynamics of PDZ-domain-related supramodules in the postsynaptic density. *Nat Rev Neurosci* 10:87-99.
- Ferrendelli JA, Chang MM, Kinscherf DA (1974) Elevation of cyclic GMP levels in central nervous system by excitatory and inhibitory amino acids. *J Neurochem* 22:535-540.
- Fiala JC, Feinberg M, Popov V, Harris KM (1998) Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1. *J Neurosci* 18:8900-8911.
- Fong AY, Stornetta RL, Foley CM, Potts JT (2005) Immunohistochemical localization of GAD67-expressing neurons and processes in the rat brainstem: subregional distribution in the nucleus tractus solitarius. *J Comp Neurol* 493:274-290.
- Forrest D, Yuzaki M, Soares HD, Ng L, Luk DC, Sheng M, Stewart CL, Morgan JI, Connor JA, Curran T (1994) Targeted disruption of NMDA receptor 1 gene abolishes NMDA response and results in neonatal death. *Neuron* 13:325-338.
- Freund TF, Buzsáki G (1996) Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6:347-470.
- Fritschy JM, Panzanelli P, Tyagarajan SK (2012) Molecular and functional heterogeneity of GABAergic synapses. *Cell Mol Life Sci* 69:2485-2499.
- Fukaya M, Kato A, Lovett C, Tonegawa S, Watanabe M (2003) Retention of NMDA receptor NR2 subunits in the lumen of endoplasmic reticulum in targeted NR1 knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4855-4860.

- Gaiarsa JL, Kuczewski N, Porcher C (2011) Contribution of metabotropic GABA(B) receptors to neuronal network construction. *Pharmacol Ther* 132:170-179.
- Gao XB, van den Pol AN (2000) GABA release from mouse axonal growth cones. *J Physiol* 523 Pt 3:629-637.
- Garthwaite J (2008) Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *Eur J Neurosci* 27:2783-2802.
- Garthwaite J (2010) New insight into the functioning of nitric oxide-receptive guanylyl cyclase: physiological and pharmacological implications. *Mol Cell Biochem* 334:221-232.
- Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R (1988) Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 336:385-388.
- Garthwaite J, Southam E, Boulton C, Nielsen E, Schmidt K, Mayer B (1995) Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Mol Pharmacol* 48:184-188.
- Ge S, Goh E, Sailor K, Kitabatake Y, Ming G, Song H (2006) GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature* 439:589-593.
- George J, Baden DG, Gerwick WH, Murray TF (2012) Bidirectional influence of sodium channel activation on NMDA receptor-dependent cerebrocortical neuron structural plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:19840-19845.
- Gibb BJ, Garthwaite J (2001) Subunits of the nitric oxide receptor, soluble guanylyl cyclase, expressed in rat brain. *Eur J Neurosci* 13:539-544.
- Ginhoux F, Lim S, Hoeffel G, Low D, Huber T (2013) Origin and differentiation of microglia. *Front Cell Neurosci* 7:45.
- Giuli G, Luzi A, Poyard M, Guellaën G (1994) Expression of mouse brain soluble guanylyl cyclase and NO synthase during ontogeny. *Brain Res Dev Brain Res* 81:269-283.
- Gold MG (2012) A frontier in the understanding of synaptic plasticity: solving the structure of the postsynaptic density. *Bioessays* 34:599-608.
- Gonzalez-Islas C, Chub N, Garcia-Bereguian MA, Wenner P (2010) GABAergic synaptic scaling in embryonic motoneurons is mediated by a shift in the chloride reversal potential. *J Neurosci* 30:13016-13020.

- Gras C, Vinatier J, Amilhon B, Guerci A, Christov C, Ravassard P, Giros B, El Mestikawy S (2005) Developmentally regulated expression of VGLUT3 during early post-natal life. *Neuropharmacology* 49:901-911.
- Groc L, Petanjek Z, Gustafsson B, Ben-Ari Y, Hanse E, Khazipov R (2002) In vivo blockade of neural activity alters dendritic development of neonatal CA1 pyramidal cells. *Eur J Neurosci* 16:1931-1938.
- Groneberg D, Koesling D, Friebe A (2008) Evaluation of ODQ as specific inhibitor of NO-sensitive guanylyl cyclase using mice deficient for the enzyme. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*:40-40.
- Gundersen V, Holten AT, Storm-Mathisen J (2004) GABAergic synapses in hippocampus exocytose aspartate on to NMDA receptors: quantitative immunogold evidence for co-transmission. *Mol Cell Neurosci* 26:156-165.
- Götz M, Huttner WB (2005) The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:777-788.
- Hall C, Garthwaite J (2009) What is the real physiological NO concentration in vivo? *Nitric Oxide* 21:92-103.
- Hardingham GE, Bading H (2010) Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci* 11:682-696.
- Herlenius E, Lagercrantz H (2001) Neurotransmitters and neuromodulators during early human development. *Early Hum Dev* 65:21-37.
- Hirao K, Hata Y, Yao I, Deguchi M, Kawabe H, Mizoguchi A, Takai Y (2000) Three isoforms of synaptic scaffolding molecule and their characterization. Multimerization between the isoforms and their interaction with N-methyl-D-aspartate receptors and SAP90/PSD-95-associated protein. *J Biol Chem* 275:2966-2972.
- Hirao K, Hata Y, Ide N, Takeuchi M, Irie M, Yao I, Deguchi M, Toyoda A, Sudhof TC, Takai Y (1998) A novel multiple PDZ domain-containing molecule interacting with N-methyl-D-aspartate receptors and neuronal cell adhesion proteins. *J Biol Chem* 273:21105-21110.
- Holmgren CD, Mukhtarov M, Malkov AE, Popova IY, Bregestovski P, Zilberter Y (2010) Energy substrate availability as a determinant of neuronal resting

- potential, GABA signaling and spontaneous network activity in the neonatal cortex in vitro. *J Neurochem* 112:900-912.
- Huupponen J, Molchanova SM, Lauri SE, Taira T (2012) Ongoing Intrinsic Synchronous Activity is Required for the Functional Maturation of CA3-CA1 Glutamatergic Synapses. *Cereb Cortex*.
- Hájos N, Ellender T, Zemankovics R, Mann E, Exley R, Cragg S, Freund T, Paulsen O (2009) Maintaining network activity in submerged hippocampal slices: importance of oxygen supply. *Eur J Neurosci* 29:319-327.
- Iasevoli F, Tomasetti C, de Bartolomeis A (2013) Scaffolding proteins of the post-synaptic density contribute to synaptic plasticity by regulating receptor localization and distribution: relevance for neuropsychiatric diseases. *Neurochem Res* 38:1-22.
- Iida J, Ishizaki H, Okamoto-Tanaka M, Kawata A, Sumita K, Ohgake S, Sato Y, Yorifuji H, Nukina N, Ohashi K, Mizuno K, Tsutsumi T, Mizoguchi A, Miyoshi J, Takai Y, Hata Y (2007) Synaptic scaffolding molecule alpha is a scaffold to mediate N-methyl-D-aspartate receptor-dependent RhoA activation in dendrites. *Mol Cell Biol* 27:4388-4405.
- Iino M (2006) Ca²⁺-dependent inositol 1,4,5-trisphosphate and nitric oxide signaling in cerebellar neurons. *J Pharmacol Sci* 100:538-544.
- Imura T, Kanatani S, Fukuda S, Miyamoto Y, Hisatsune T (2005) Layer-specific production of nitric oxide during cortical circuit formation in postnatal mouse brain. *Cereb Cortex* 15:332-340.
- Inada H, Watanabe M, Uchida T, Ishibashi H, Wake H, Nemoto T, Yanagawa Y, Fukuda A, Nabekura J (2011) GABA regulates the multidirectional tangential migration of GABAergic interneurons in living neonatal mice. *PLoS One* 6:e27048.
- Inglis FM, Furia F, Zuckerman KE, Strittmatter SM, Kalb RG (1998) The role of nitric oxide and NMDA receptors in the development of motor neuron dendrites. *J Neurosci* 18:10493-10501.
- Iwasato T, Datwani A, Wolf AM, Nishiyama H, Taguchi Y, Tonegawa S, Knöpfel T, Erzurumlu RS, Itoharu S (2000) Cortex-restricted disruption of NMDAR1 impairs neuronal patterns in the barrel cortex. *Nature* 406:726-731.

- Jacobson AG, Tam PP (1982) Cephalic neurulation in the mouse embryo analyzed by SEM and morphometry. *Anat Rec* 203:375-396.
- Jagasia R, Steib K, Englberger E, Herold S, Faus-Kessler T, Saxe M, Gage FH, Song H, Lie DC (2009) GABA-cAMP response element-binding protein signaling regulates maturation and survival of newly generated neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci* 29:7966-7977.
- Jourdain P, Bergersen LH, Bhaukaurally K, Bezzi P, Santello M, Domercq M, Matute C, Tonello F, Gundersen V, Volterra A (2007) Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nat Neurosci* 10:331-339.
- Kahle KT, Barnett SM, Sassower KC, Staley KJ (2009) Decreased seizure activity in a human neonate treated with bumetanide, an inhibitor of the Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransporter NKCC1. *J Child Neurol* 24:572-576.
- Kahle KT, Staley KJ, Nahed BV, Gamba G, Hebert SC, Lifton RP, Mount DB (2008) Roles of the cation-chloride cotransporters in neurological disease. *Nat Clin Pract Neurol* 4:490-503.
- Kanold PO, Shatz CJ (2006) Subplate neurons regulate maturation of cortical inhibition and outcome of ocular dominance plasticity. *Neuron* 51:627-638.
- Karpova A, Mikhaylova M, Bera S, Bär J, Reddy PP, Behnisch T, Rankovic V, Spilker C, Bethge P, Sahin J, Kaushik R, Zuschratter W, Kähne T, Naumann M, Gundelfinger ED, Kreutz MR (2013) Encoding and transducing the synaptic or extrasynaptic origin of NMDA receptor signals to the nucleus. *Cell* 152:1119-1133.
- Karten YJ, Jones MA, Jeurling SI, Cameron HA (2006) GABAergic signaling in young granule cells in the adult rat and mouse dentate gyrus. *Hippocampus* 16:312-320.
- Kastanenka KV, Landmesser LT (2010) In vivo activation of channelrhodopsin-2 reveals that normal patterns of spontaneous activity are required for motoneuron guidance and maintenance of guidance molecules. *J Neurosci* 30:10575-10585.
- Kasugai Y, Swinny JD, Roberts JD, Dalezios Y, Fukazawa Y, Sieghart W, Shigemoto R, Somogyi P (2010) Quantitative localisation of synaptic and extrasynaptic GABAA receptor subunits on hippocampal pyramidal cells by freeze-fracture replica immunolabelling. *Eur J Neurosci* 32:1868-1888.

- Katz LC, Shatz CJ (1996) Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science* 274:1133-1138.
- Kennedy MB (2000) Signal-processing machines at the postsynaptic density. *Science* 290:750-754.
- Kerchner GA, Nicoll RA (2008) Silent synapses and the emergence of a postsynaptic mechanism for LTP. *Nat Rev Neurosci* 9:813-825.
- Khazipov R, Luhmann HJ (2006) Early patterns of electrical activity in the developing cerebral cortex of humans and rodents. *Trends Neurosci* 29:414-418.
- Khazipov R, Esclapez M, Caillard O, Bernard C, Khalilov I, Tyzio R, Hirsch J, Dzhala V, Berger B, Ben-Ari Y (2001) Early development of neuronal activity in the primate hippocampus in utero. *J Neurosci* 21:9770-9781.
- Kirmse K, Witte OW, Holthoff K (2010) GABA depolarizes immature neocortical neurons in the presence of the ketone body β -hydroxybutyrate. *J Neurosci* 30:16002-16007.
- Kirmse K, Witte OW, Holthoff K (2011) GABAergic depolarization during early cortical development and implications for anticonvulsive therapy in neonates. *Epilepsia* 52:1532-1543.
- Klausberger T, Somogyi P (2008) Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science* 321:53-57.
- Kleppisch T, Feil R (2009) cGMP signalling in the mammalian brain: role in synaptic plasticity and behaviour. *Handb Exp Pharmacol*:549-579.
- Kobiałka M, Gorczyca WA (2000) Particulate guanylyl cyclases: multiple mechanisms of activation. *Acta Biochim Pol* 47:517-528.
- Koesling D, Russwurm M, Mergia E, Mullershausen F, Friebe A (2004) Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase: structure and regulation. *Neurochem Int* 45:813-819.
- Komuro H, Rakic P (1996) Intracellular Ca^{2+} fluctuations modulate the rate of neuronal migration. *Neuron* 17:275-285.
- Kornau HC, Schenker LT, Kennedy MB, Seeburg PH (1995) Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* 269:1737-1740.
- Kristiansen LV, Huerta I, Beneyto M, Meador-Woodruff JH (2007) NMDA receptors and schizophrenia. *Curr Opin Pharmacol* 7:48-55.

- Kullmann DM, Asztely F (1998) Extrasynaptic glutamate spillover in the hippocampus: evidence and implications. *Trends Neurosci* 21:8-14.
- Kullmann P, Kandler K (2008) Dendritic Ca²⁺ responses in neonatal lateral superior olive neurons elicited by glycinergic/GABAergic synapses and action potentials. *Neuroscience* 154:338-345.
- Kumamoto E, Murata Y (1995) Characterization of GABA current in rat septal cholinergic neurons in culture and its modulation by metal cations. *J Neurophysiol* 74:2012-2027.
- Kutsuwada T, Sakimura K, Manabe T, Takayama C, Katakura N, Kushiya E, Natsume R, Watanabe M, Inoue Y, Yagi T, Aizawa S, Arakawa M, Takahashi T, Nakamura Y, Mori H, Mishina M (1996) Impairment of suckling response, trigeminal neuronal pattern formation, and hippocampal LTD in NMDA receptor epsilon 2 subunit mutant mice. *Neuron* 16:333-344.
- Lahtinen H, Palva JM, Sumanen S, Voipio J, Kaila K, Taira T (2002) Postnatal development of rat hippocampal gamma rhythm in vivo. *J Neurophysiol* 88:1469-1474.
- Laube B, Kuhse J, Betz H (1998) Evidence for a tetrameric structure of recombinant NMDA receptors. *J Neurosci* 18:2954-2961.
- Law AJ, Weickert CS, Webster MJ, Herman MM, Kleinman JE, Harrison PJ (2003) Expression of NMDA receptor NR1, NR2A and NR2B subunit mRNAs during development of the human hippocampal formation. *Eur J Neurosci* 18:1197-1205.
- Leamey CA, Ho-Pao CL, Sur M (2001) Disruption of retinogeniculate pattern formation by inhibition of soluble guanylyl cyclase. *J Neurosci* 21:3871-3880.
- Leinekugel X, Medina I, Khalilov I, Ben-Ari Y, Khazipov R (1997) Ca²⁺ oscillations mediated by the synergistic excitatory actions of GABA(A) and NMDA receptors in the neonatal hippocampus. *Neuron* 18:243-255.
- Leinekugel X, Khazipov R, Cannon R, Hirase H, Ben-Ari Y, Buzsáki G (2002) Correlated bursts of activity in the neonatal hippocampus in vivo. *Science* 296:2049-2052.

- Leinekugel X, Khalilov I, McLean H, Caillard O, Gaiarsa JL, Ben-Ari Y, Khazipov R (1999) GABA is the principal fast-acting excitatory transmitter in the neonatal brain. *Adv Neurol* 79:189-201.
- Li RW, Serwanski DR, Miralles CP, Li X, Charych E, Riquelme R, Huganir RL, de Blas AL (2005) GRIP1 in GABAergic synapses. *J Comp Neurol* 488:11-27.
- Lisman J, Buzsáki G (2008) A neural coding scheme formed by the combined function of gamma and theta oscillations. *Schizophr Bull* 34:974-980.
- LoTurco JJ, Blanton MG, Kriegstein AR (1991) Initial expression and endogenous activation of NMDA channels in early neocortical development. *J Neurosci* 11:792-799.
- LoTurco JJ, Owens DF, Heath MJ, Davis MB, Kriegstein AR (1995) GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron* 15:1287-1298.
- Low CM, Wee KS (2010) New insights into the not-so-new NR3 subunits of N-methyl-D-aspartate receptor: localization, structure, and function. *Mol Pharmacol* 78:1-11.
- Lu X, Rong Y, Baudry M (2000) Calpain-mediated degradation of PSD-95 in developing and adult rat brain. *Neurosci Lett* 286:149-153.
- Luskin MB, Parnavelas JG, Barfield JA (1993) Neurons, astrocytes, and oligodendrocytes of the rat cerebral cortex originate from separate progenitor cells: an ultrastructural analysis of clonally related cells. *J Neurosci* 13:1730-1750.
- Malenka RC, Nicoll RA (1997) Silent synapses speak up. *Neuron* 19:473-476.
- Marsden KC, Beattie JB, Friedenthal J, Carroll RC (2007) NMDA receptor activation potentiates inhibitory transmission through GABA receptor-associated protein-dependent exocytosis of GABA(A) receptors. *J Neurosci* 27:14326-14337.
- Martin DL, Martin SB, Wu SJ, Espina N (1991) Regulatory properties of brain glutamate decarboxylase (GAD): the apoenzyme of GAD is present principally as the smaller of two molecular forms of GAD in brain. *J Neurosci* 11:2725-2731.
- Marín O (2013) Cellular and molecular mechanisms controlling the migration of neocortical interneurons. *Eur J Neurosci* 38:2019-2029.

- Mazzuca M, Minlebaev M, Shakirzyanova A, Tyzio R, Taccola G, Janackova S, Gataullina S, Ben-Ari Y, Giniatullin R, Khazipov R (2011) Newborn Analgesia Mediated by Oxytocin during Delivery. *Front Cell Neurosci* 5:3.
- McKenna MC (2007) The glutamate-glutamine cycle is not stoichiometric: fates of glutamate in brain. *J Neurosci Res* 85:3347-3358.
- McLean H, Caillard O, Khazipov R, Ben-Ari Y, Gaiarsa J (1996) Spontaneous release of GABA activates GABAB receptors and controls network activity in the neonatal rat hippocampus. *J Neurophysiol* 76:1036-1046.
- Melone M, Burette A, Weinberg RJ (2005) Light microscopic identification and immunocytochemical characterization of glutamatergic synapses in brain sections. *J Comp Neurol* 492:495-509.
- Ming GL, Song H (2005) Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 28:223-250.
- Ming GL, Song H (2011) Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron* 70:687-702.
- Minlebaev M, Valeeva G, Tcheremiskine V, Coustillier G, Khazipov R (2013) Cell-attached recordings of responses evoked by photorelease of GABA in the immature cortical neurons. *Front Cell Neurosci* 7:83.
- Mohajerani M, Cherubini E (2006) Role of giant depolarizing potentials in shaping synaptic currents in the developing hippocampus. *Crit Rev Neurobiol* 18:13-23.
- Monaghan DT, Irvine MW, Costa BM, Fang G, Jane DE (2012) Pharmacological modulation of NMDA receptor activity and the advent of negative and positive allosteric modulators. *Neurochem Int* 61:581-592.
- Montana V, Malarkey EB, Verderio C, Matteoli M, Parpura V (2006) Vesicular transmitter release from astrocytes. *Glia* 54:700-715.
- Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, Herb A, Higuchi M, Lomeli H, Burnashev N, Sakmann B, Seeburg PH (1992) Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* 256:1217-1221.
- Morales-Medina J, Mejorada A, Romero-Curiel A, Flores G (2007) Alterations in dendritic morphology of hippocampal neurons in adult rats after neonatal administration of N-omega-nitro-L-arginine. *Synapse* 61:785-789.

- Muir J, Arancibia-Carcamo IL, MacAskill AF, Smith KR, Griffin LD, Kittler JT (2010) NMDA receptors regulate GABAA receptor lateral mobility and clustering at inhibitory synapses through serine 327 on the $\gamma 2$ subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:16679-16684.
- Murray A, Peace A, Shewan D (2009) cGMP promotes neurite outgrowth and growth cone turning and improves axon regeneration on spinal cord tissue in combination with cAMP. *Brain Res* 1294:12-21.
- Müller BM, Kistner U, Kindler S, Chung WJ, Kuhlendahl S, Fenster SD, Lau LF, Veh RW, Haganir RL, Gundelfinger ED, Garner CC (1996) SAP102, a novel postsynaptic protein that interacts with NMDA receptor complexes in vivo. *Neuron* 17:255-265.
- Nadler JV (2011) Aspartate release and signalling in the hippocampus. *Neurochem Res* 36:668-676.
- Namiki S, Kakizawa S, Hirose K, Iino M (2005) NO signalling decodes frequency of neuronal activity and generates synapse-specific plasticity in mouse cerebellum. *J Physiol* 566:849-863.
- Nardou R, Yamamoto S, Chazal G, Bhar A, Ferrand N, Dulac O, Ben-Ari Y, Khalilov I (2011) Neuronal chloride accumulation and excitatory GABA underlie aggravation of neonatal epileptiform activities by phenobarbital. *Brain* 134:987-1002.
- Nicoll RA, Roche KW (2013) Long-term potentiation: Peeling the onion. *Neuropharmacology*.
- Niethammer M, Kim E, Sheng M (1996) Interaction between the C terminus of NMDA receptor subunits and multiple members of the PSD-95 family of membrane-associated guanylate kinases. *J Neurosci* 16:2157-2163.
- Nikonenko I, Boda B, Steen S, Knott G, Welker E, Muller D (2008) PSD-95 promotes synaptogenesis and multiinnervated spine formation through nitric oxide signaling. *J Cell Biol* 183:1115-1127.
- Nishikawa T (2011) Analysis of free D-serine in mammals and its biological relevance. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 879:3169-3183.

- Noh J, Seal RP, Garver JA, Edwards RH, Kandler K (2010) Glutamate co-release at GABA/glycinergic synapses is crucial for the refinement of an inhibitory map. *Nat Neurosci* 13:232-238.
- Nyíri G, Cserép C, Szabadits E, Mackie K, Freund TF (2005) CB1 cannabinoid receptors are enriched in the perisynaptic annulus and on preterminal segments of hippocampal GABAergic axons. *Neuroscience* 136:811-822.
- Obata K, Oide M, Tanaka H (1978) Excitatory and inhibitory actions of GABA and glycine on embryonic chick spinal neurons in culture. *Brain Res* 144:179-184.
- Oertel WH, Schmechel DE, Mugnaini E, Tappaz ML, Kopin IJ (1981a) Immunocytochemical localization of glutamate decarboxylase in rat cerebellum with a new antiserum. *Neuroscience* 6:2715-2735.
- Oertel WH, Schmechel DE, Brownstein MJ, Tappaz ML, Ransom DH, Kopin IJ (1981b) Decrease of glutamate decarboxylase (GAD)-immunoreactive nerve terminals in the substantia nigra after kainic acid lesion of the striatum. *J Histochem Cytochem* 29:977-980.
- Palay SL (1956) Synapses in the central nervous system. *J Biophys Biochem Cytol* 2:193-202.
- Paoletti P (2011) Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. *Eur J Neurosci* 33:1351-1365.
- Pavlov I, Riekkki R, Taira T (2004) Synergistic action of GABA-A and NMDA receptors in the induction of long-term depression in glutamatergic synapses in the newborn rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 20:3019-3026.
- Pescosolido MF, Yang U, Sabbagh M, Morrow EM (2012) Lighting a path: genetic studies pinpoint neurodevelopmental mechanisms in autism and related disorders. *Dialogues Clin Neurosci* 14:239-252.
- Petralia R, Sans N, Wang Y, Wenthold R (2005) Ontogeny of postsynaptic density proteins at glutamatergic synapses. *Mol Cell Neurosci* 29:436-452.
- Petralia RS, Esteban JA, Wang YX, Partridge JG, Zhao HM, Wenthold RJ, Malinow R (1999) Selective acquisition of AMPA receptors over postnatal development suggests a molecular basis for silent synapses. *Nat Neurosci* 2:31-36.

- Petralia RS, Wang YX, Hua F, Yi Z, Zhou A, Ge L, Stephenson FA, Wenthold RJ (2010) Organization of NMDA receptors at extrasynaptic locations. *Neuroscience* 167:68-87.
- Pfeffer CK, Stein V, Keating DJ, Maier H, Rinke I, Rudhard Y, Hentschke M, Rune GM, Jentsch TJ, Hübner CA (2009) NKCC1-dependent GABAergic excitation drives synaptic network maturation during early hippocampal development. *J Neurosci* 29:3419-3430.
- Picardo MA, Guigue P, Bonifazi P, Batista-Brito R, Allene C, Ribas A, Fishell G, Baude A, Cossart R (2011) Pioneer GABA cells comprise a subpopulation of hub neurons in the developing hippocampus. *Neuron* 71:695-709.
- Prast H, Philippu A (2001) Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog Neurobiol* 64:51-68.
- Ranganathan R, Ross EM (1997) PDZ domain proteins: scaffolds for signaling complexes. *Curr Biol* 7:R770-773.
- Rheims S, Holmgren CD, Chazal G, Mulder J, Harkany T, Zilberter T, Zilberter Y (2009) GABA action in immature neocortical neurons directly depends on the availability of ketone bodies. *J Neurochem* 110:1330-1338.
- Richter K, Langnaese K, Kreutz MR, Olias G, Zhai R, Scheich H, Garner CC, Gundelfinger ED (1999) Presynaptic cytomatrix protein bassoon is localized at both excitatory and inhibitory synapses of rat brain. *J Comp Neurol* 408:437-448.
- Riou M, Stroebel D, Edwardson JM, Paoletti P (2012) An alternating GluN1-2-1-2 subunit arrangement in mature NMDA receptors. *PLoS One* 7:e35134.
- Ruusuvuori E, Kirilkin I, Pandya N, Kaila K (2010) Spontaneous network events driven by depolarizing GABA action in neonatal hippocampal slices are not attributable to deficient mitochondrial energy metabolism. *J Neurosci* 30:15638-15642.
- Sadler TW (2005) Embryology of neural tube development. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 135C:2-8.
- Sadler, (1999a) *Langman Orvosi Embriológia, Medicina, Budapest, 1999:79*
- Sadler, (1999b) *Orvosi Embriológia, Medicina, Budapest, 1999:385-410*
- Sankar R, Painter MJ (2005) Neonatal seizures: after all these years we still love what doesn't work. *Neurology* 64:776-777.

- Sans N, Petralia RS, Wang YX, Blahos J, Hell JW, Wenthold RJ (2000) A developmental change in NMDA receptor-associated proteins at hippocampal synapses. *J Neurosci* 20:1260-1271.
- Sauer JF, Bartos M (2010) Recruitment of early postnatal parvalbumin-positive hippocampal interneurons by GABAergic excitation. *J Neurosci* 30:110-115.
- Schell MJ, Brady RO, Molliver ME, Snyder SH (1997) D-serine as a neuromodulator: regional and developmental localizations in rat brain glia resemble NMDA receptors. *J Neurosci* 17:1604-1615.
- Schelshorn DW, Schneider A, Kuschinsky W, Weber D, Krüger C, Dittgen T, Bürgers HF, Sabouri F, Gassler N, Bach A, Maurer MH (2009) Expression of hemoglobin in rodent neurons. *J Cereb Blood Flow Metab* 29:585-595.
- Schmidt H, Werner M, Heppenstall P, Henning M, Moré M, Kühbandner S, Lewin G, Hofmann F, Feil R, Rathjen F (2002) cGMP-mediated signaling via cGKIalpha is required for the guidance and connectivity of sensory axons. *J Cell Biol* 159:489-498.
- Sipilä S, Schuchmann S, Voipio J, Yamada J, Kaila K (2006) The cation-chloride cotransporter NKCC1 promotes sharp waves in the neonatal rat hippocampus. *J Physiol* 573:765-773.
- Smigrodzki R, Levitt P (1996) The alpha 1 subunit of soluble guanylyl cyclase is expressed prenatally in the rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 97:226-234.
- Soeda H, Tatsumi H, Katayama Y (1997) Neurotransmitter release from growth cones of rat dorsal root ganglion neurons in culture. *Neuroscience* 77:1187-1199.
- Soeda H, Tatsumi H, Kozawa Y, Mishima H, Imai K, Katayama Y (2002) Functional characterization of calcium channels localized on the growth cones of cultured rat dorsal root ganglion cells. *Neurosci Lett* 325:5-8.
- Solecki DJ (2012) Sticky situations: recent advances in control of cell adhesion during neuronal migration. *Curr Opin Neurobiol* 22:791-798.
- Spitzer NC (2002) Activity-dependent neuronal differentiation prior to synapse formation: the functions of calcium transients. *J Physiol Paris* 96:73-80.
- Staley K (1992) Enhancement of the excitatory actions of GABA by barbiturates and benzodiazepines. *Neurosci Lett* 146:105-107.

- Staley K, Smith R (2001) A new form of feedback at the GABA(A) receptor. *Nat Neurosci* 4:674-676.
- Stein V, Hermans-Borgmeyer I, Jentsch TJ, Hübner CA (2004) Expression of the KCl cotransporter KCC2 parallels neuronal maturation and the emergence of low intracellular chloride. *J Comp Neurol* 468:57-64.
- Stuhlmiller TJ, García-Castro MI (2012) Current perspectives of the signaling pathways directing neural crest induction. *Cell Mol Life Sci* 69:3715-3737.
- Sumita K, Sato Y, Iida J, Kawata A, Hamano M, Hirabayashi S, Ohno K, Peles E, Hata Y (2007) Synaptic scaffolding molecule (S-SCAM) membrane-associated guanylate kinase with inverted organization (MAGI)-2 is associated with cell adhesion molecules at inhibitory synapses in rat hippocampal neurons. *J Neurochem* 100:154-166.
- Sun H, Luhmann HJ, Kilb W (2012) Resonance properties of different neuronal populations in the immature mouse neocortex. *Eur J Neurosci* 36:2753-2762.
- Swilius MT, Kubota Y, Forest A, Waxham MN (2010) Structure and composition of the postsynaptic density during development. *J Comp Neurol* 518:4243-4260.
- Szabadits E, Cserép C, Ludányi A, Katona I, Gracia-Llanes J, Freund T, Nyíri G (2007) Hippocampal GABAergic synapses possess the molecular machinery for retrograde nitric oxide signaling. *J Neurosci* 27:8101-8111.
- Sánchez-Islas E, León-Olea M (2004) Nitric oxide synthase inhibition during synaptic maturation decreases synapsin I immunoreactivity in rat brain. *Nitric Oxide* 10:141-149.
- Tanaka DH, Nakajima K (2012) Migratory pathways of GABAergic interneurons when they enter the neocortex. *Eur J Neurosci* 35:1655-1660.
- Tanaka J, Markerink-van Ittersum M, Steinbusch HW, De Vente J (1997) Nitric oxide-mediated cGMP synthesis in oligodendrocytes in the developing rat brain. *Glia* 19:286-297.
- Tang Y, Nyengaard JR, De Groot DM, Gundersen HJ (2001) Total regional and global number of synapses in the human brain neocortex. *Synapse* 41:258-273.
- Tarusawa E, Matsui K, Budisantoso T, Molnár E, Watanabe M, Matsui M, Fukazawa Y, Shigemoto R (2009) Input-specific intrasynaptic arrangements of ionotropic

- glutamate receptors and their impact on postsynaptic responses. *J Neurosci* 29:12896-12908.
- Thomas CG, Tian H, Diamond JS (2011) The relative roles of diffusion and uptake in clearing synaptically released glutamate change during early postnatal development. *J Neurosci* 31:4743-4754.
- Todd AJ, Hughes DI, Polgár E, Nagy GG, Mackie M, Ottersen OP, Maxwell DJ (2003) The expression of vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in neurochemically defined axonal populations in the rat spinal cord with emphasis on the dorsal horn. *Eur J Neurosci* 17:13-27.
- tom Dieck S, Sanmartí-Vila L, Langnaese K, Richter K, Kindler S, Soyke A, Wex H, Smalla KH, Kämpf U, Fränzer JT, Stumm M, Garner CC, Gundelfinger ED (1998) Bassoon, a novel zinc-finger CAG/glutamine-repeat protein selectively localized at the active zone of presynaptic nerve terminals. *J Cell Biol* 142:499-509.
- Tozuka Y, Fukuda S, Namba T, Seki T, Hisatsune T (2005) GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron* 47:803-815.
- Trommer BL, Kennelly JJ, Colley PA, Overstreet LS, Slater NT, Pasternak JF (1995) AP5 blocks LTP in developing rat dentate gyrus and unmasks LTD. *Exp Neurol* 131:83-92.
- Turrigiano G (2011) Too many cooks? Intrinsic and synaptic homeostatic mechanisms in cortical circuit refinement. *Annu Rev Neurosci* 34:89-103.
- Tyzio R, Represa A, Jorquera I, Ben-Ari Y, Gozlan H, Aniksztejn L (1999) The establishment of GABAergic and glutamatergic synapses on CA1 pyramidal neurons is sequential and correlates with the development of the apical dendrite. *J Neurosci* 19:10372-10382.
- Tyzio R, Cossart R, Khalilov I, Minlebaev M, Hübner CA, Represa A, Ben-Ari Y, Khazipov R (2006) Maternal oxytocin triggers a transient inhibitory switch in GABA signaling in the fetal brain during delivery. *Science* 314:1788-1792.
- Tyzio R, Allene C, Nardou R, Picardo MA, Yamamoto S, Sivakumaran S, Caiati MD, Rheims S, Minlebaev M, Milh M, Ferré P, Khazipov R, Romette JL, Lorquin J, Cossart R, Khalilov I, Nehlig A, Cherubini E, Ben-Ari Y (2011) Depolarizing

- actions of GABA in immature neurons depend neither on ketone bodies nor on pyruvate. *J Neurosci* 31:34-45.
- Urbanski MJ, Kovacs FE, Szabo B (2009) Depolarizing GABAergic synaptic input triggers endocannabinoid-mediated retrograde synaptic signaling. *Synapse* 63:643-652.
- Valtschanoff JG, Weinberg RJ (2001) Laminar organization of the NMDA receptor complex within the postsynaptic density. *J Neurosci* 21:1211-1217.
- Van Staveren W, Steinbusch H, Markerink-Van Ittersum M, Repaske D, Goy M, Kotera J, Omori K, Beavo J, De Vente J (2003) mRNA expression patterns of the cGMP-hydrolyzing phosphodiesterases types 2, 5, and 9 during development of the rat brain. *J Comp Neurol* 467:566-580.
- Vanhatalo S, Palva J, Andersson S, Rivera C, Voipio J, Kaila K (2005) Slow endogenous activity transients and developmental expression of K⁺-Cl⁻ cotransporter 2 in the immature human cortex. *Eur J Neurosci* 22:2799-2804.
- Verpelli C, Schmeisser MJ, Sala C, Boeckers TM (2012) Scaffold proteins at the postsynaptic density. *Adv Exp Med Biol* 970:29-61.
- Voigt T, Opitz T, de Lima AD (2005) Activation of early silent synapses by spontaneous synchronous network activity limits the range of neocortical connections. *J Neurosci* 25:4605-4615.
- Waddell J, Kim J, Alger BE, McCarthy MM (2011) The depolarizing action of GABA in cultured hippocampal neurons is not due to the absence of ketone bodies. *PLoS One* 6:e23020.
- Wang D, Kriegstein A (2008) GABA regulates excitatory synapse formation in the neocortex via NMDA receptor activation. *J Neurosci* 28:5547-5558.
- Wang DD, Kriegstein AR (2011) Blocking early GABA depolarization with bumetanide results in permanent alterations in cortical circuits and sensorimotor gating deficits. *Cereb Cortex* 21:574-587.
- Wang LZ, Zhu XZ (2003) Spatiotemporal relationships among D-serine, serine racemase, and D-amino acid oxidase during mouse postnatal development. *Acta Pharmacol Sin* 24:965-974.

- Wang PY, Petralia RS, Wang YX, Wenthold RJ, Brenowitz SD (2011) Functional NMDA receptors at axonal growth cones of young hippocampal neurons. *J Neurosci* 31:9289-9297.
- Watanabe M, Inoue Y, Sakimura K, Mishina M (1992) Developmental changes in distribution of NMDA receptor channel subunit mRNAs. *Neuroreport* 3:1138-1140.
- Watanabe M, Fukaya M, Sakimura K, Manabe T, Mishina M, Inoue Y (1998) Selective scarcity of NMDA receptor channel subunits in the stratum lucidum (mossy fibre-recipient layer) of the mouse hippocampal CA3 subfield. *Eur J Neurosci* 10:478-487.
- Welagen J, Anderson S (2011) Origins of neocortical interneurons in mice. *Dev Neurobiol* 71:10-17.
- Welshhans K, Rehder V (2005) Local activation of the nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway in growth cones regulates filopodial length via protein kinase G, cyclic ADP ribose and intracellular Ca²⁺ release. *Eur J Neurosci* 22:3006-3016.
- Wenzel A, Fritschy JM, Mohler H, Benke D (1997) NMDA receptor heterogeneity during postnatal development of the rat brain: differential expression of the NR2A, NR2B, and NR2C subunit proteins. *J Neurochem* 68:469-478.
- Westerholz S, de Lima AD, Voigt T (2010) Regulation of early spontaneous network activity and GABAergic neurons development by thyroid hormone. *Neuroscience* 168:573-589.
- Wood KC, Batchelor AM, Bartus K, Harris KL, Garthwaite G, Vernon J, Garthwaite J (2011) Picomolar nitric oxide signals from central neurons recorded using ultrasensitive detector cells. *J Biol Chem* 286:43172-43181.
- Workman AD, Charvet CJ, Clancy B, Darlington RB, Finlay BL (2013) Modeling transformations of neurodevelopmental sequences across mammalian species. *J Neurosci* 33:7368-7383.
- Yamanaka Y, Ralston A, Stephenson RO, Rossant J (2006) Cell and molecular regulation of the mouse blastocyst. *Dev Dyn* 235:2301-2314.

- Yang Y, Ge W, Chen Y, Zhang Z, Shen W, Wu C, Poo M, Duan S (2003) Contribution of astrocytes to hippocampal long-term potentiation through release of D-serine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15194-15199.
- Yao WD, Rusch J, Poo M, Wu CF (2000) Spontaneous acetylcholine secretion from developing growth cones of *Drosophila* central neurons in culture: effects of cAMP-pathway mutations. *J Neurosci* 20:2626-2637.
- Ybot-Gonzalez P, Savery D, Gerrelli D, Signore M, Mitchell CE, Faux CH, Greene ND, Copp AJ (2007) Convergent extension, planar-cell-polarity signalling and initiation of mouse neural tube closure. *Development* 134:789-799.
- Yoshihara Y, De Roo M, Muller D (2009) Dendritic spine formation and stabilization. *Curr Opin Neurobiol* 19:146-153.
- Yu G, Zerucha T, Ekker M, Rubenstein J (2001) Evidence that GRIP, a PDZ-domain protein which is expressed in the embryonic forebrain, co-activates transcription with DLX homeodomain proteins. *Brain Res Dev Brain Res* 130:217-230.
- Yu W, Charych EI, Serwanski DR, Li RW, Ali R, Bahr BA, De Blas AL (2008) Gephyrin interacts with the glutamate receptor interacting protein 1 isoforms at GABAergic synapses. *J Neurochem* 105:2300-2314.
- Zilberter Y, Harkany T, Holmgren CD (2005) Dendritic release of retrograde messengers controls synaptic transmission in local neocortical networks. *Neuroscientist* 11:334-344.

XII. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Az értekezés témájában megjelent első szerzős közlemények:

Cserép C, Szabadits E, Szőnyi A, Watanabe M, Freund TF, Nyiri G. (2012) NMDA Receptors in GABAergic Synapses during Postnatal Development. PLoS ONE 7(5):e37753.

Cserép C, Szőnyi A, Veres JM, Németh B, Szabadits E, de Vente J, Hájos N, Freund TF and Nyiri G. (2011) Nitric oxide signaling modulates synaptic transmission during early postnatal development. Cerebral Cortex 21:2065-2074

Szabadits E*, **Cserép C***, Ludányi A, Katona I, Gracia-Llanes J, Freund TF, Nyiri G. (2007) Hippocampal GABAergic synapses possess the molecular machinery for retrograde nitric oxide signaling. J Neurosci. 27(30):8101-11.* Megosztott elsőszereplőség

Az értekezés témájában megjelent nem első szerzős közlemények:

Szabadits E., **Cserép C.**, Szőnyi A., Fukazawa Y., Shigemoto R., Watanabe M., Itohara S., Freund TF and Nyiri G. (2011) NMDA receptors in hippocampal GABAergic synapses and their role in nitric oxide signaling. J Neurosci. 31(16):5893-5904

Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – közlemények:

Nyiri G, **Cserép C**, Szabadits E, Mackie K, Freund TF (2005) CB1 cannabinoid receptors are enriched in the perisynaptic annulus and on preterminal segments of hippocampal GABAergic axons. Neuroscience 136(3):811-22;

Nyiri G, Szabadits E, **Cserép C**, Mackie K, Shigemoto R, Freund TF. (2005) GABA(B) and CB1 cannabinoid receptor expression identifies two types of septal cholinergic neurons. Eur J Neurosci. 21:3034-3042.

XIII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Először szeretnék köszönetet mondani Szüleimnek, akik áldozatos munkájukkal lehetővé tették számomra, hogy az agykutatói pályán elindulhassak. Hálával tartozom Feleségemnek, aki végig mellettem állt a legnehezebb időkben is, és aki nélkül egészen biztosan nem készülhetett volna el a munkám. Köszönöm Testvéreim kitartó támogatását is. Hálásan köszönöm Prof. Freund Tamás laborvezetőnek és Dr. Nyiri Gábor témavezetőmnek a tőlük kapott tudást, és hogy mellettük sajátíthattam el többek között a neurobiológiai kutatás helyes szemléletét és módszertanát. Végül, de nem utolsósorban szeretnék köszönetet mondani az Agykéreg Kutatócsoport, a Thalamusz Kutatócsoport, a Molekuláris Neurobiológia Kutatócsoport és a Hálózat- Idegéltan Kutatócsoport munkatársainak, hogy egy kivételesen inspiráló és baráti légkörben dolgozhatok.