

NMDA receptor függő nitrogén-monoxid jelátvitel a hippokampusz GABAerg szinapszisaiban

Doktori tézisek

Dr. Cserépné Dr. Szabadits Eszter

Semmelweis Egyetem
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók: Dr. Halasy Katalin, D.Sc., egyetemi tanár
Dr. Altdorfer Károly, Ph.D., 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

1. Bevezetés

A nitrogén-monoxid (NO) a szinaptikus plaszticitás számos formájában résztvesz, beleértve a szinapszisok hosszútávú potenciozódását (LTP) és depresszióját (LTD), ezáltal a NO jelpálya képes lehet befolyásolni a tanulás- és memóriefolyamatokat. Ezeket a hippokampális folyamatokat alapvetően a különböző interneuron populációk által szabályozott piramisajt-hálózat működése határozza meg. A NO hatása elsősorban a glutamáterg szinapszisokban létrejövő retrográd jelátvitelhez köthető, mely során a NO posztszinaptikus szabadul fel, és a preszinaptikus oldal transzmitter felszabadulását szabályozza.

A NO szintézisét a piramis sejtekben a posztszinaptikus neuronális NO-szintáz (nNOS) végzi L-argininből. A felszabaduló NO fiziológiai körülmények között legfeljebb nanomoláris koncentrációjú, hatótávolsága 1-1,5 μm -re tehető, mégis a preszinaptikusan elhelyezkedő receptora, a NO-szenzitív guanilat-cikláz (NOsGC) olyan nagy affinitású, hogy pár molekula NO is képes aktiválni. A receptoraktiváció cGMP szintézishez, és számos másodlagos jelátviteli útvonal beindításához vezet, ami képes a vezikula felszabadulás befolyásolására. A szinaptikusan felszabaduló NO alacsony koncentrációjának következtében nem viselkedik reaktív oxigén-gyökként, így nem-specifikus hatásaival nem kell számolni. Gyors szöveti elnyelődése pedig szinapszis-specifikus szabályozást tesz lehetővé.

Az nNOS Ca^{2+} -kalmodulin függő enzim és a glutamáterg szinapszisokban posztszinaptikus denzitás fehérjék közreműködésével PDZ-doméneken keresztül kötődik a szinaptikus aktív zónához, ezáltal az NMDA receptorok szoros szomszédságába kerül. Az NMDA receptorokon keresztüli lokális kalcium beáramlás a NO szintéziséhez, és ennek eredményeképpen cGMP felszabaduláshoz vezet a hippokampuszban.

Az NMDA receptorok feszültség- és ligandfüggő kation (elsősorban kalcium) csatornák. Funkcionálisan heterotetramert képeznek, mely kötelezően két GluN1(korábban NR1) alegységet és a GluN2 (korábban NR2) alegységek (GluN2A-D) közül valamely kettőt tartalmazza. A felnőtt hippokampusz piramisajtjeiben azonban csak a GluN1, GluN2A és GluN2B alegység fejeződik ki.

2. Célkitűzések

A piramis sejtekre érkező gátlás alapvető fontosságú a hálózati szinkron-működésekhez. Ezt a gátló bemenetet a piramis sejtek aktivitása visszaható (retrográd) módon befolyásolhatja. Ilyen, a GABAerg szinapszisokban is jól feltérképezett retrográd rendszer az endokannabinoid rendszer, ami a periszomatikus gátlósejtek közül csak a kolecisztokinin (CCK) tartalmúak szinapszisaiban található meg. Egy másik, a serkentő szinapszisok plaszticitásában jelentős szereppel bíró retrográd jelátviteli útvonal a nitrogén-monoxid jelpálya. Míg a serkentő (glutamáterg) szinapszisokban betöltött szerepéről hatalmas szakirodalom található, mindezidáig nem vizsgálták gátló (GABAerg) szinapszisokban való előfordulását. Fő kérdésünk tehát az volt, megtalálható-e a nitrogén-monoxid rendszer az oly fontos periperiszomatikus gátlósejtek szinapszisaiban, mutat-e sejt-specikus

eloszlást, mint az endokannabinoid rendszer, vagy éppen ellenkezőleg egy általános retrográd jelátviteli útvonalat képvisel.

Az alábbi kérdéseket tettük fel:

- Megtalálható-e a neuronális nitrogén-monoxid szintáz (nNOS) a GABAerg szinapszisokban?
- Mely periperiszomatikus szinapszispopuláció (CCK/PV) fejez ki nNOS-t?
- Megtalálható-e a nitrogén-monoxid receptora a GABAerg terminálisokban?
- Mely GABAerg alpopulációk fejezik ki a receptort?
- Milyen alegység-összetétellel rendelkezik az NO receptor ezekben a sejtekben?

A nitrogén-monoxid jelpálya aktiválása az intracelluláris kalcium-koncentráció függvénye. A továbbiakban arra kerestük a választ, milyen kalcium források vezethetnek NO szintézishez. A második kísérletsorozatban arra voltunk kíváncsiak, a GABAerg szinapszisokban is képes-e betölteni az NMDA receptor ezt a szerepet.

Kérdéseink az alábbiak voltak:

- Az NMDA képes-e beindítani az NO-rendszert a GABAerg szinapszisokban fiziológiás túlélő szeletben?
- Anatómiai módszerekkel kimutatható-e az NMDA receptor a piramissejtek periperiszomatikus GABAerg szinapszisaiban?
- Ha igen, milyen alegységek vesznek részt ezen receptorok alkotásában?
- A periperiszomatikus szinapszisok mekkora hányada rendelkezik NMDA receptorokkal?
- Interneuron specifikus-e az NMDA receptorok GABAerg szinapszisokban való megjelenése, vagy általános mechanizmusról van szó?

Kérdéseink megválaszolásához kvalitatív (beágyazás előtti immunarany és immunperoxidáz módszer) és kvantitatív (beágyazás utáni immunarany és fagyasztva tört replika immunarany módszer) anatómiai módszereket, molekuláris biológiai módszert (in situ hibridizáció) és farmakológiai (in vitro fiziológiás túlélő szeletek drog-kezelése) kísérleteket végeztünk.

3. Kísérleti módszerek

3.1. Transzkardiális perfúziók

Az általános anesztéziát követően az állatokat transzkardiális perfúzió során fixáltuk. A beágyazás előtti nNOS-immunarany reakcióhoz az egereket 1% paraformaldehidet tartalmazó oldattal perfundáltuk 60 percig; a beágyazás előtti "tükrkép" kísérletekhez, az immunfluoreszcens, a beágyazás előtti és utáni NMDA-R immunarany reakciókhoz és az in situ hibridizációhoz 4% paraformaldehidet tartalmazó oldattal perfundáltunk 30 percig. A replika kísérletek esetében 2% paraformaldehidet és 15% telített pikrinsavat tartalmazó oldattal fixáltuk az egereket 12 percen át. Ezt követően az agy eltávolításra került a

koponyából, és ezt utólagos immerziós fixálás nélkül követte a vibratómos metszetkészítés.

3.2. Antitestek specificitásának vizsgálata

A különböző interneuron típusok megjelölésére használt elsődleges antitesteket (kolecisztokinin, parvalbumin, szomatosztatin, P-anyag receptor, kannabinoid 1 receptor) a gyártó laboratóriumokban már korábban tesztelték, és munkánk során mi is a várt festődési mintázatot kaptunk a hippocampusban. Az nNOS antitestet nNOS génkiütött egereken teszteltük, és nem kaptunk jelölést ezekben az állatokban. A nitrogén-monoxid szenzitív guanilát-cikláz (NOsGC) ellen készült antitestek specificitását szintén teszteltük. A cGMP és a glutaminsav-dekarboxiláz 65 (GAD65) antitestek specificitását korábban már alaposan megvizsgálták. A vezikuláris glutamát transzporter 3 (vGluT3) antitest specificitását vGluT3 génkiütött állat felhasználásával bizonyítottuk. A GABA_A receptor (GABA_AR) β3 alegység ellen készült antitest szintén specifikusan jelölte meg a piramis sejtek sejttestjére érkező GABAerg szinapsziseket. Az NMDA receptor 1 (GluN1), 2A (GluN2A) és 2B (GluN2B) alegységének C-terminálisa ellen termeltetett antitesteket korábban már alaposan tesztelték immunoblot, antigén-peptid, teljes és/vagy régióspecifikus génkiütött egerek segítségével mind beágyazás előtti, mind beágyazás utáni (Lowicryl) immunarany kísérletekben. A beágyazás előtti NMDA receptor immunarany kísérletekben ugyanazt az emésztési protokolt használtuk, amit az antitestek tesztelésénél is használtunk. További kontroll kísérleteket végeztünk, hogy bizonyítsuk, hogy pontosan a mi kísérleti körülményeink közt specifikus festődést adnak-e az NMDA receptor antitestek. Fagyasztva-töréses replikákat készítettünk vad típusú és kortkális GluN1KO egerek hippocampuszaiból, hogy a replika immunarany kísérletekben is bizonyítsuk a GluN1 antitest specificitását. Nem találtunk szinaptikus arany szemcséket a piramis sejteken, és elhanyagolható mennyiségű háttér arany szemcsét találtunk a piramis sejtek szómáján. Ezenkívül, a GluN1, GluN2A és GluN2B immunarany jelölés ugyanazt a mintázatot és eloszlást mutatta a szövetben mindhárom anatómiai kísérletsorozatban. Továbbá, a beágyazás utáni (Lowicryl) immunarany kísérletekben úgynevezett „tükrökép” kísérleteket is végeztünk: ugyanazon szinapszis egymást követő metszetein külön-külön készítettünk GluN1, GluN2A és GluN2B immunarany festést. Amennyiben egy szinapszis pozitívnak bizonyult valamelyik alegységre, azt a szinapszist megvizsgáltuk a másik alegység jelölésre a szomszédos metszeten. Eredményeink azt mutatták, hogy a GluN2 jelölt szinapszisek nagy részében megtalálható volt a GluN1 alegység is a szomszédos metszetek egyikén (23 szinapsziseből 12 pozitív, 2 egér), vagyis a három antitest ugyanazt a sejtmembrán domént jelöli, ami tovább bizonyítja az antitestek specificitását.

Vizsgáltuk továbbá a fluoreszcens és arany-kötött másodlagos antitestek lehetséges keresztreakcióit egymással vagy a másik elsődleges antitesttel a kettős jelölésű kísérletekben. Egyik esetben sem találtunk keresztreakciókat. Az antitestekkel kapott specifikus jelölés nem volt megfigyelhető az elsődleges

antitestek hiányában, illetve a fluoreszcens kísérletek esetében még az autofluoreszcencia jelensége is kizárható volt.

3.3. Farmakológiai hatóanyagok

A túlélő hippokampusz szeletek farmakológiai befolyásolásához a következő hatóanyagokat használtuk: az IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthine), BAY-736691, L-arginine, L-NAME (L-NG-Nitroarginine methyl-ester-hydrochloride) és az MK801 a Sigma-Aldrich terméke. Az NMDA, D-AP5 (D-(-)-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid), ODO (1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one), nifedipin és az SNX482 a Tocris Bioscience-től származott. A tetrodotoxint (TTX) az Alomone Labs-tól, a nitroprusszid-nátriumot (SNP) a Flukatól rendeltük.

3.4. In situ hibridizációs kísérletek (társ-munkacsoport munkája)

Ribopróbák készítéséhez patkány NOSGC $\alpha 1$ és $\alpha 2$ alegységek alapvetően nem átfedő kódoló szekvenciáit amplifikálták polimeráz-lánreakció (PCR) segítségével. A PCR termékeket pBluescript II SK – SmaI helyére klónozták. A klónok megőrzöttségét és irányultságát szekvenálás során igazolták. Az $\alpha 1$ alegység elleni egyszálú sense próbát PstI, az antisense próbát XbaI emésztéssel, míg az $\alpha 2$ alegység elleni sense próbát HindIII, az antisense próbát NotI emésztéssel készítették el. Az egyszálú minta DNS-eket gélikivonás után $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tárolták. Az in vitro átírást követően a ribopróbákat digoxigeninnel jelölték, DNÁ-zal kezelték, majd az RNeasy MinElute Cleanup kit segítségével tisztították. Ezután gélelektroforézis használatával határozták meg a ribopróbák megőrzöttségét és mennyiségét.

Az $50\text{ }\mu\text{m}$ agyseletek inkubálását RNÁz-mentes, steril sejt kultúra-tál kamrában végezték. A metszeteket először mosták, majd hibridizációs pufferben inkubálták. Az inkubáció után a metszeteket első, majd második mosóoldattal mosták $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on. Ezt követően alkalikus-foszfáttal jelölt digoxigenin-ellenes Fab IgG-fragmentumot tartalmazó oldatban inkubálták. További mosások után a metszeteket kromogén oldatban előhívták, végül üveg tárgylemezre szedték ki, és Vectashield-del fedték le.

3.5. Kettős immunfluoreszcens kísérletek

$40\text{ }\mu\text{m}$ -es metszeteket készítettünk, majd mosás és blokkolás után a következő antitestek keverékének oldataiban inkubáltuk őket: NOSGC $\alpha 1$ és kolecisztokinin, vagy NOSGC $\alpha 1$ és parvalbumin, vagy NOSGC $\alpha 1$ és nNOS, vagy NOSGC $\alpha 1$ és szomatosztatin, vagy nNOS és 1-es típusú kannabinoid receptor, vagy nNOS és P-anyag receptor. Mosás után a metszeteket fluoreszcens festékekkel jelölt másodlagos antitestek keverékében inkubáltuk. Az immunfestés során nem használtunk detergenset. A metszeteket réz-szulfát oldattal kezeltük, hogy lecsökkentsük a metszék autofluoreszcenciáját, majd kiszedték mikroszkópos tárgylemezre, és Vectashield felhasználásával lefedték.

3.6. Beágyazás előtti immunperoxidáz kísérletek

60 μm -es metszeteket készítettünk, és blokkolás után 2 napon át a NOsGC $\alpha 1$ és $\beta 1$ alegység ellen termeltetett elsődleges antitesttel inkubáltuk. Alapos mosás követően a metszeteket biotin-kötött másodlagos antitestekkel, majd avidin-biotin komplexhez kötött torna-peroxidáz oldattal kezeltük. Az immunperoxidáz reakció megjelenítéséhez 3,3-diaminobenzidin kromogént használtunk. A metszeteket ezt követően ozmium-tetroxiddal kezeltük, majd mindet víztelenítettük felszálló alkoholsorban és propilén-oxidban, végül epoxi-alapú gyantába ágyaztuk.

3.7. Beágyazás előtti immunarany és kombinált immunarany-immunperoxidáz kísérletek

Az nNOS lokalizációjához 60 μm -es metszeteket készítettünk, majd az elsődleges antitestek oldatában inkubáltuk 2 napig: nNOS, illetve a kettős festések esetében nNOS és CCK, vagy nNOS és PV. Alapos mosás után a metszeteket blokkoltuk, majd arany-kötött másodlagos antitestek oldatában inkubáltuk. Ezt követően a metszeteket mostuk, majd az arany szemcséket intenzifikáltuk. A kizárólag immunarany reakcióban résztvevő metszetek ezután ozmium-tetroxid kezelésben részesültek, majd víztelenítettük őket. Az immunarany-immunperoxidáz kettős festések esetében a metszeteket az intenzifikálás után biotin-kötött másodlagos antitest-oldatban inkubáltuk, majd avidin-biotin komplexhez kötött torna-peroxidázzal kezeltük. Az immunperoxidáz reakciót 3,3-diamino-benzidin segítségével tettük láthatóvá. A metszeteket a 3.6. fejezetben leírtak alapján víztelenítettük. Az elektron-mikroszkópos vizsgálatokhoz kis gyantába ágyazott szövetmintákat vágunk ki és ragasztottuk Durcupan blokkokra, majd 70 nm vastagságú sorozatmetszeteket készítettünk Leica EM UC6 típusú ultramikrotómon.

Az NMDA receptorok szinaptikus detektálásához elengedhetetlen az immunreakció előtti pepszines emésztés, ezért pepszin tartalmú sósav-oldattal kezeltük a metszeteket. Az ezt követő blokkolás után vagy csak az NMDA-R alegységek ellen termelt elsődleges antitesteket, vagy az NMDA-R alegységek és vGluT3, illetve NMDA-R alegységek és PV ellenes elsődleges antitestek keverékében inkubáltuk a metszeteket. Alapos mosás után 1,4 nm méretű arany szemcsével kötött másodlagos antitesttel inkubáltuk a metszeteket, majd újabb mosás után ezüst-intenzifikálás következett. A kombinált immunarany-immunperoxidáz kísérletek esetében a metszeteket biotin-kötött másodlagos antitestek oldatával, Elite ABC-oldattal, majd DAB kromogén oldatával kezeltük, és víztelenítés után epoxi-alapú (Durcupan) gyantába ágyaztuk. Az elektron-mikroszkópos vizsgálatokhoz a hippokampális szövetmintákat kis Durcupan tartalmú öntőformába ágyaztuk, majd 60nm vastagságú sorozatmetszeteket készítettünk Leica EM UC6 típusú ultramikrotómon.

A kiértékeléseket Hitachi H-7100 típusú elektron-mikroszkópon végeztük. Az nNOS illetve a szemikvantitatív NMDA-R immunarany mérések esetében az arany szemcsék sűrűségét az anatómiailag meghatározott GABAerg szinapszis és a nem-szinaptikus plazmamembrán mentén mértük. A membrán síkjától számított 40

illetve 50nm-es távolságon belül elhelyezkedő arany szemcséket tekintettük membrán-asszociálnak.

3.8. Lowicryl beágyazás és beágyazás utáni kvantitatív immunarany kísérletek

Fixálást követően 300 μm vastagságú metszeteket, majd alapos PB mosást követően a metszeteket növekvő koncentrációjú szaharóz-oldatban inkubáltuk. A metszeteket Leica CPC segítségével folyékony nitrogén hőmérsékletűre hűtött arannyal bevont réz korongokra csaptuk, majd a fagyott metszeteket átszállítottuk Leica AFS-be, amiben az alacsony hőmérsékletű víztelenítést és a Lowicryl HM20 gyantába történő fagyasztva beágyazást végeztük. A hippokampuszokból 50 és 70 nm vastagságú sorozatmetszeteket készítettünk. A sorozatmetszeteket nikkelt gridekre szedtük fel, majd blokkolást követően elsődleges antitest-oldat cseppeiben inkubáltuk azokat. Az NMDA-R alegységek elleni elsődleges antitestekkel való kezelést követő mosás után arany-kötött másodlagos antitestek oldatából készült cseppekben inkubáltuk őket. A kiértékelést Hitachi H-7100 típusú elektronmikroszkópon végeztük. A kétoldali kvantitatív immunarany NMDA-R mérések esetén az arany szemcsék sűrűségét az anatómiailag meghatározott GABAerg és glutamaterg szinapszis és a nem-szinaptikus plazmamembrán mentén mértük. A membrán síkjától számított kétszer 45nm-es távolságon (a membrán egyik ill. másik oldala felé) belül elhelyezkedő arany szemcséket tekintettük membrán-asszociálnak.

3.9. SDS-kezelt fagyasztva tört replika immunarany kísérletek

A perfúziót követően 130 μm vastag koronális hippokampusz szeleteket metszettünk Dosaka típusú vibratómon, majd egy éjszakán át inkubáltuk a szeleteket 30%-os glicerolt tartalmazó PB oldatban 4 C°-on. A metszetekből kivágtuk a hippokampuszt, majd ezt követően „réz-pofák” közé szorítva nagy nyomású fagyasztógéppel folyékony nitrogén hőmérsékletűre hűtöttük, majd a fagyott metszeteket kettős replika asztalra helyeztük, és -140 C°-on kettétörtük. A fagyasztva tört felszíneket 8 nm szén, 2 nm platina, végül 15 nm szén depozíciójával replikáltuk a fagyasztva-törő replika gépben. A mintákat 20 órán át inkubáltuk 2,5% nátrium-dodecil-szulfátot (SDS) és 20% szaharózt tartalmazó 15 mM koncentrációjú Tris pufferben (pH=8,3) 80 C°-on, hogy eltávolítsuk a szövetet a replikákról. A replikákat ezután 0,05% BSA tartalmazó 25mM-os TBS-ben mostuk, majd 1 órán át blokkoló oldatba tettük (5%BSA 25mM-os TBS-ben). A replikákat először csak az NMDA-R alegységeket felismerő elsődleges antitestek (nyúl poliklonális antitestek Prof. Watanabe M. laborjából, GluN1 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$, GluN2A 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, GluN2B 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ blokkoló oldatban hígítva) oldatában inkubáltuk egy éjszakán át szobahőn. TBS mosásokat követően a GABAAR $\beta 3$ alegység elleni elsődleges (1:25, tengerimalac szérum, Prof. Shigemoto R. laborjából) és az NMDA-R alegységeket felismerő arany-kötött nyúl ellenes másodlagos (5nm kecske poliklonális antitest, 1:25, BBI) antitestek keverékében inkubáltuk a replikákat egész éjszaka szobahőmérsékleten. Ezt követte a GABAAR megjelölésére szolgáló arany-kötött tengerimalac ellenes másodlagos antitest (10nm kecske poliklonális antitest, 1:25, BBI). TBS és desztillált vizes mosás után a

replikákat pioloformmal fedett sávos réz gridekre szedtük fel. A kiértékelést Philips Tecnai 10 és Hitachi H-7100 típusú elektronmikroszkópon végeztük.

3.10. Farmakológiai kísérletek túlélő szeleten, cGMP immunfluoreszcens kísérletek

A túlélő szeletek elkészítéséhez az erekeket mély izoflurán anesztéziában dekapitáltuk, az agyakat eltávolítottuk a koponyából, majd „vágó-oldatban” 300 μ m vastagságú koronális hippokampusz szeleteket metszettünk. A kísérletek előtt a szeleteket 1 órán át inkubáltuk karbogén gázzal telített mesterséges agy-gerivelői folyadékkal töltött kamrában szobahőmérsékleten. Ezt követően a szeleteket 12 kamrás steril sejt kultúrára tálba raktuk, ahol minden egyes kamrát egyénileg, egyenlő mértékben buborékoltattunk karbogén gázzal. Minden kamrát 1 ml módosított ACSF (mACSF) oldattal töltöttünk meg, ami foszfodieszteráz-gátlókat tartalmazott. 20 perces mACSF oldatban történő előkezelés után a kontroll kamrához nem adtunk semmit, míg SNP-t (NO donort) adtunk 10 percre az “SNP-kamrákhoz” és 5 μ M NMDA-t adtunk 3 percre az “NMDA-kamrákhoz”. Azokban a kísérletekben, ahol az nNOS-t, NOsGC-t, a feszültségfüggő kalcium csatornákat (VDCC) vagy az NMDA-receptorokat gátoltuk, az előinkubáláshoz használt mACSF oldatot kiegészítettük az adott gátlószerrel, és ezzel az oldattal végeztük a szeletek előkezelését 20 percig, majd hozzáadtuk az 5 μ M NMDA-t adtunk 3 percre. Az inkubálásokat követően az oldatokat gyorsan jéghideg paraformaldehid fixálóra cseréltük, majd a szeleteket 48 órán át tovább fixáltuk ugyanebben az oldatban 4C^o-on.

A cGMP immunfluoreszcens megjelenítéséhez a szeleteket 2%-os agarba ágyasztuk, és újrametsztük 50 μ m vastagságúra. Ezt követte az elsődleges antitestek oldata: bárányban készült cGMP ellenes és kettős immunfluoreszcens jelölés esetén egérben készült glutamát-dekarboxiláz 65 ellenes antitesteket hígítottuk. Mosások után az összes metszetet fluorokrómval jelölt másodlagos antitestek keverékében inkubáltuk, majd alapos mosás után a metszeteket mikroszkópos tárgylemezre szedtük ki és lefedtük. A kísérleteket Olympus Optical FluoView300 pásztázó konfokális lézer mikroszkóppal vagy Zeiss Axioplan 2 epifluoreszcens mikroszkóppal értékeltük ki.

3.11. Statisztikai analízisek

A NOsGC α 1 fluoreszcens kolokalizációs kísérletek során véletlenszerű mintát vettünk a dorzális hippokampusz teljes rostromcaudális kiterjedésében. A kolokalizáció csak abban az esetben került vizsgálat alá, ha a sejt sejtmagja látható volt. A mérendő sejtek kiválasztása egy, a képekre szisztematikus random módon elhelyezett háló segítségével történt. A sejtek méréséhez a “NIH ImageJ image analyzer” szoftvert, az adatok elemzéséhez pedig a “StatSoft Statistica” (Tulsa, OK, verzió7) szoftvert használtuk. Nem volt célunk, hogy meghatározzuk a különböző markerekkel vizsgált sejtek abszolút számát a hippokampuszban, de az arányszámok kvantitatív mérését végeztünk el Abercrombie korrekció használatával kiegészítve. Abban az esetben, amikor az adatok Gauss-eloszlást mutattak a Shapiro-Wilks’s W-teszt alapján, parametrikus statisztikai jellemzőket alkalmaztunk (átlag \pm sztenderd

deviáció). Az adatok nagy része azonban nem mutatott Gauss-eloszlást, így nem-parametrikus statisztikákat használtunk. A kétszoportos összehasonlítást a nem-parametrikus Mann–Whitney U-teszttel, a sokcsopoportos összehasonlítást a szintén nem-parametrikus Kruskal–Wallis teszttel végeztük el. Azokban a mérésekben, amikor az aranyzemcsék és a szinapszis méretek közti korrelációt vizsgáltuk, az adatok szintén nem normál eloszlást mutattak, ezért a nem-parametrikus Spearman R-korrelációt alkalmaztuk. A null hipotézist akkor vetettük el, ha p-érték nem érte el a 0,05 értékhatárt, ekkor a populációk közti különbség illetve az adatok közti korreláció szignifikánsnak lett minősítve.

4. Eredmények

4.1. A neuronális nitrogén-monoxid szintáz (nNOS) asszociálódik a GABAerg szinapszisok posztszinaptikus denzitásával a CA1 piramis sejteken

Korábban kimutatták, hogy a nitrogén-monoxidot előállító enzim, az nNOS a piramis sejtek serkentő szinapszisainak posztszinaptikus oldalán található meg. Azonban gyengén fixált agyszöveten, beágyazás előtti immunarany technika használatával először sikerült kimutatnunk, hogy az nNOS nemcsak a dendritikus tüskékben, de a piramis sejteken lévő szimmetrikus GABAerg szinapszisokban is megtalálható. Egyazon kísérletből származó nNOS immunarany jelölés teljesen hiányzott az nNOS génkiütött egerekből, míg a vad típusú egerekben erősen jelölt periszomatikus szinapszisok voltak láthatók. Az immunarany jelölés ráadásul nem véletlenszerűen asszociálódott a piramis sejtek membránjához, hanem specifikusan halmozódott a szimmetrikus szinapszisokban éppúgy, mint az aszimmetrikus tüske szinapszisokban. Az immunarany jel relatív lineáris sűrűségméréséből kiderült, hogy míg a jelsűrűség a szimmetrikus szinapszisok aktív zónájában $1,35 \pm 0,31$ aranyzemcsé/ μm (átlag \pm S.D.) volt, addig mindössze $0,03 \pm 0,02$ aranyzemcsé/ μm sűrűség volt a szinapszis közeli extraszinaptikus membránterületeken. Az nNOS pozitív interneuronok sejttestjében és dendritjeiben erős jelölést tapasztaltunk. A piramis sejtek szómáját kétféle interneuron idegzi be: a parvalbumin (PV) immunreaktív interneuronok, melyek a sejttestre érkező terminálisok körülbelül kétharmadát adják, és a kolecisztokinin (CCK) pozitív kosársejtek, melyek körülbelül egyharmadát képezik a periszomatikus terminálisoknak. Az egér hippocampusban teljesen rekonstruált szimmetrikus szinapszisokat vizsgáltunk, és azt találtuk, hogy a teljesen rekonstruált periszomatikus szinapszisok legalább 76%-a (az egyes állatokban mért százalékok mediánja, ami az alábbi arányokból adódott: 16/19, 15/20 és 16/21 a 3 egérben), míg az axon iniciális szegmensten (AIS) rekonstruált szinapszisoknak legalább 32%-a (medián, az alábbi arányokból: 7/22, 10/26 és 6/20 a 3 egérben) bizonyult pozitívnak az aranyzemcsék posztszinaptikus denzitáshoz való asszociációja alapján. Mivel a periperiszomatikus GABAerg gátlást összesen háromféle interneuron látja el (a CCK- és PV-pozitív kosársejtek és a PV-pozitív axo-axonikus sejtek), így ezek az adatok jól interpretálhatók. Más a helyzet azonban a dendriteken lévő szinapszisokkal, amit számos interneuron innervál, ezért a dendritikus szinapszisok elektronmikroszkópos mérését nem végeztük el. Mindazonáltal számos

dendritikus szimmetrikus szinapszist intenzíven immunpozitívnak találtunk mindhárom egérben. Tehát mind a periperiszomatikus, mind bizonyos dendritikus szinapszisokban megtalálható az nNOS posztszinaptikusan. Az NO receptorának eloszlása a hippokampuszban tovább erősítette ezt a megállapítást.

4.2. Az NO receptor α_1 és α_2 alegységének sejtípus specifikus mRNS megoszlása a hippokampuszban

Az NO receptora, az NOsGC heterodimerként fordul elő az agyban, két alegysége: α (α_{1-2}) és β (β_{1-2}). Az agyban azonban csak kétféle alegység összetételű funkcionális NO receptor létezik, ami az NO jelátvitel továbbítására képes: az $\alpha_1\beta_1$ és az $\alpha_2\beta_1$ kompozíciójú heterodimerek. Mivel a különböző alegység összetételű receptorok kötődése a szinaptikus horgonyzó fehérjékhez eltérő, és a jelátviteli regulációjuk is más lehet az egyes neuronokban, megvizsgáltuk, hogy az NOsGC egyes α alegységei mely neuronokban fejeződnek ki. Digoxigenin-jelölt ribopróbával készített in situ hibridizációs kísérleteinkből (amit kromogén pufferben oldott 5-bromo-4-kloro-3-indolyl-foszfát és nitro-kék tetrazolium-klorid segítségével jelenítettük meg) kiderült, hogy az α_1 alegység mRNS csak interneuronokban volt jelen, és ezeket az idegsejteket az egér hippokampusz CA1 régiójának minden rétegében megfigyeltük. Az NO receptor α_2 alegység mRNS viszont hiányzott az interneuronokból és kizárólag piramis sejtekben volt jelen a CA1 hippokampusz régióban.

4.3. Az NOsGC α_1 alegység megtalálható az interneuronokban és azok termináisaiban, de hiányzik a piramis sejtekből

Tekintve, hogy mRNS szinten az NOsGC α_1 alegység csak az interneuronokban fordult elő, beagyzás előtti immunperoxidáz festést végeztünk az α_1 alegység fehérjéjének kimutatására, hogy megtalálható-e az interneuronok termináisaiban is.

Azt is megvizsgáltuk, vajon a heterodimer másik alegysége, a β_1 alegység is megtalálható-e ezekben a sejtekben. Eredményeink azt mutatták, hogy az mRNS eloszlásához hasonlóan, az α_1 alegység fehérje a hippokampusz alveus - stratum lacunosum-moleculare tengelyen számos interneuronban erősen jelen volt. Fénymikroszkóposan a stratum pyramidale-ban a piramis sejtek körül kosársejt-terminális festésre emlékeztető jelölést kaptunk mindkét fajban. Ezt megerősítendő, elektronmikroszkóppal vizsáltuk meg az immunperoxidáz festett metszeteket. Ennek során random módon gyűjtött terminálisokat rekontruáltunk az egér hippokampuszban, és azt találtuk, hogy a periszomatikus terminálisoknak legalább ~79%-a (medián százalék az alábbi arányokból: 20/23, 18/24 és 23/29 a 3 egérben), az AIS terminálisoknak pedig legalább 42%-a (medián százalék az alábbi arányokból: 10/21, 4/21 és 8/19 a 3 egérben) volt pozitív az NOsGC α_1 alegységre. Ezenkívül mindhárom egérben számos dendritikus szimmetrikus szinapszist létesítő terminálist is találtunk, ami erős immunpozitivitást mutatott az α_1 alegységre. Hasonlóan az egér hippokampuszhoz, a rekonstrukció során patkányban is számos α_1 alegység pozitív periszomatikus, dendritikus és AIS terminálist találtunk. Ezentúl patkányban a β_1 alegység eloszlását is megvizsgáltuk elektronmikroszkópos szinten, és ahogy várható is volt számos GABAerg terminális pozitivitást mutatott

$\beta 1$ alegységre. Ezek az eredmények megerősítették, hogy ezek a GABAerg terminálisok kifejeznek $\alpha 1\beta 1$ alegységösszetételű NO receptort, és elhelyezkedésükből kifolyólag alkalmasak a piramis sejtekből érkező retrograde NO jelátvitel detektálására. Az $\alpha 1$ alegység mindig heterodimert képez a $\beta 1$ alegységgel. Megvizsgáltuk, léteznek-e olyan interneuronok, melyek esetleg nagy mennyiségben kifejezik a $\beta 1$ alegységet $\alpha 1$ alegység nélkül, ezért kolokalizációs kísérleteket végeztünk a patkány hippocampusz interneuronjain az $\alpha 1$ és $\beta 1$ alegység között.

Mivel mindkét antitest nyúlban készült, így a direkt kolokalizáció nem megvalósítható, ezért ún. "tükrökép-módszert" használtuk, mely során az egyik metszet felszínén félbevágott sejtek vizsgálhatók a szomszédos metszeten. Ennek megfelelően az egyik metszetet $\alpha 1$ alegység ellenes, a szomszédos metszetet pedig $\beta 1$ alegység ellenes antitesttel inkubáltuk. A vártak megfelelően a $\beta 1$ alegységet mind a piramis sejtekben, mind interneuronokban, míg az $\alpha 1$ alegység ellenes antitest csak interneuronokat jelölt. Azt találtuk, hogy gyakorlatilag az $\alpha 1$ alegység pozitív interneuronok mind $\beta 1$ alegység pozitívak is voltak (négy patkányból: 27/27, 41/42, 34/37 és 18/19), és fordítva, a $\beta 1$ alegység pozitív interneuronok $\alpha 1$ alegység pozitívak is voltak (négy patkányból: 28/29, 41/43, 39/40 és 16/17; néhány fals-negatív sejt előfordulhat a metszetekben az $\alpha 1$ alegység szolubilis természetéből kifolyólag, vagy abból eredően, hogy a metszetkészítés közben a sejttetek egy kisebb-nagyobb darabja elveszhet). Amellett, hogy az $\alpha 1$ alegység ellenes antitest specificitását ezzel igazoltuk, ezek az eredmények azt is sugallják, hogy mivel nincs $\beta 1$ alegység pozitív interneuron $\alpha 1$ alegység nélkül, ezért nincs olyan interneuron, ami $\alpha 2\beta 1$ alegységösszetételű receptort tartalmazna, ami összhangban van az in situ hibridizációs eredményeinkkel.

4.4. Mind a periperiszomatikus, mind a dendritikus GABAerg neuronok tartalmazzák NOsGC $\alpha 1$ alegységet

Ahogy korábbi kísérleteinkből már látható volt, az NOsGC $\alpha 1$ alegység mRNS-e számos interneuronban kifejeződött, és fehérje szinten is számos $\alpha 1$ és $\beta 1$ alegységet tartalmazó interneuron festődött, de koránt sem az összes. Ennek érdekében kvantitatív immunfluoreszcens vizsgálatokat végeztünk, hogy megállapítsuk, hogy nagyobb interneuron csoportok, mint a CCK-, PV-, nNOS-, vagy SOM-pozitív periszomatikus vagy dendritikus interneuronok tartalmazzák-e ezt az NO receptort. Habár nincs adat az összes felsorolt sejtmarker direkt kolokalizációjára a patkány hippocampusz CA1 régiójában, indirekt megfigyelések alapján gyakorlatilag ez a négy sejtmarker különböző, át nem fedő interneuron populációt alkot. Az általános festődési mintázat ezekre a markerekre hasonló volt a korábban leírtakhoz. Az NOsGC $\alpha 1$ alegység elleni immunfluoreszcens jel megfelelt a korábban immunperoxidáz (DAB) módszerrel kapott festődésnek. Az $\alpha 1$ alegység festésénél különböző immunfluoreszcens intenzitású jelet kaptunk, azonban azt nem vizsgáltuk, hogy az $\alpha 1$ jelintenzitás és a különböző interneuron markerek korrelálnak-e egymással. Vékony axonszerű nyúlványokat szintén megfigyeltünk a neuropil körül az immunfluoreszcens festéssel is. A dorzális hippocampusz CA1-ben jelölt interneuronjainak random mintavételezése és vizsgálata után a következő median arányokat kaptuk: az összes vizsgált NOsGC $\alpha 1$ pozitív sejt közül ~21%

(n=1383; 23, 15 és 21%) volt CCK pozitív, 40% (n=1527; 38, 41 és 40%) volt PV pozitív, 11% (n=1322; 11, 10 és 20%) nNOS és 7% (n=1599; 4, 7 és 7%) SOM pozitív volt. Az interneuron markerek oldaláról vizsgálva az NOsGC $\alpha 1$ pozitív sejteket, a következő arányokat kaptuk: a CCK interneuronok ~68%-a (n=432; 68, 45 és 80%), a PV interneuronok ~74%-a (n=771; 74, 74 és 90%), az nNOS interneuronok ~20%-a (n=756; 18, 20 és 34%) és a SOM interneuronok ~32%-a (n=264; 37, 32 és 31%) volt $\alpha 1$ pozitív.

Habár direkt és indirekt adatok azt sugallták, hogy ez a négy interneuronmarker csak elhanyagolható mértékű kolokalizációt mutat, kevés információ állt rendelkezésre az nNOS és a CCK pozitív interneuronok között fennálló esetleges kolokalizációra. Tekintve, hogy gyakorlatilag minden CCK pozitív interneuron CB1 cannabinoid receptor pozitív is, ezért CB1 receptor-nNOS kettős immunfluoreszcens festéssel teszteltük a lehetséges kolokalizációt, de a random minta elemzése során nem találtunk kettősen jelölt sejteket (n=206 CB1-pozitív sejt összesen három patkányból).

4.5. NMDA indukálta cGMP termelés a túlélő hippocampusz CA1 régiójának GABAerg terminálisiban

A hippocampális GABAerg terminálisok funkcionális NO receptorral rendelkeznek és képesek cGMP termelésre is. Túlélő szeleteket készítettünk egér dorzális hippocampuszokból és mACSF inkubáltuk őket, ami foszfodiészteráz gátlókat (a cGMP hidrolízisét megelőzendő) és L-arginint (az nNOS szubsztatrát) tartalmazott a szükséges ionokon és glükózon kívül. Fixálást követően a cGMP termelést immunfluoreszcens módszerrel tettük láthatóvá cGMP ellenes antitest segítségével. A kontroll szeletekben (n=20, 10 egerből) idegi eredetű cGMP jel csak néhány interneuron sejttestben és dendritben volt megfigyelhető.

Kosársejt-terminális festés teljesen hiányzott a CA1 hippocampális régióból, míg gyenge és ritkán előforduló kosársejt-terminális szerű jelet figyeltünk meg a CA3ab pyramissejt rétegében. Kettős immunfluoreszcens módszer használatával megállapítottuk, hogy ezek a terminálisok GABAergiek (átlag \pm SD: 96,5 \pm 2,7% volt GAD65 pozitív, n=118, 4 szelet, 2 egér). A másik oldalról vizsgálva a kolokalizációt pedig 38,9 \pm 2,7% -a a GAD65 pozitív kosársejt-terminálisoknak volt cGMP immunreaktív CA3ab régióban (n=330, 4 szelet, 2 egér). Egyáltalán nem kaptunk kosár-terminális szerű jelet a gyrus dentatusban. Habár kísérleteink során a CA1 régióra koncentráltunk, a CA3c régió minden kísérletben azonos festődési mintázatot mutatott. Néhány gliasejt jelölést minden hippocampális régióban meg lehetett figyelni, minden bizonnyal annak eredményeként, hogy az asztrogliaik mind NO szenzitív, mind NO inszenzitív guanilát-cikláz is kifejeznek.

NO donor, nitroprusszid-nátrium (SNP; 200 μ M, 10 percre) hozzáadására hatalmas cGMP szint növekedést tapasztaltunk a legtöbb idegi elemben. A legerősebb jelintenzitást a CA1 és CA3 kosársejt terminálisiban kaptuk, a gyrus dentatus kosársejt terminálisai azonban jelöletlenek maradtak (5 szelet, 2 egér).

Amikor 5 μ M NMDA-át adtunk 3 percre a kontroll szeletekhez, jelentős régióspecifikus cGMP halmozódást tapasztaltunk (27 szelet, 10 egér). A stratum radiatumban és oriensben megfigyelt erős homogén neuropil festődés mellett

határozott cGMP jel emelkedést tapasztaltunk a CA1 kosársejt terminálisiban. A cGMP jelölt terminálisok GABAerg terminálisok voltak a CA1 piramisajt rétegében, mivel kettős immunfluoreszcens kísérleteink során a cGMP jelölt terminálisok 96,3±0,6%-a bizonyult GAD65 pozitívnak (n=375, 9 szelet, 3 egér), ami 57,3±0,6% GAD65 pozitív terminálisnak felelt meg a CA1 régióban (n= 513, 9 szelet, 3 egér). Nem tapasztaltunk festődést a stratum lacunosum-moleculareban, a stratum radiatumban viszont jelentős cGMP halmózódást figyeltünk meg, mely kevésbé intenzív jelet adott, mint a piramisajt réteg terminálisai, és gyakran GAD65 enzimet is kifejeztek. Voltak azonban olyan cGMP jelölt profilok a stratum radiatum és oriensben, amelyek nem festődtek GAD65-re, valószínűleg ezek serkentő kapcsolatok és/vagy gliális nyúlványok. A CA3ab régióban a cGMP szintje változatlan maradt az NMDA adagolása után, és továbbra is a GABAerg terminálisokra szorítkozott a jel (95,6±2,5% volt GAD65 pozitív n=201, 9 szelet, 3 egér). Ez az arány 39,8±2,8%-nak felel meg az összes GAD65 pozitív kosársejt terminális tekintve a CA3ab régióban (n=290, 4 szelet, 2 egér). Röviden összefoglalva, nem találtunk cGMP jelölt kosársejt terminális a gyrus dentatusban sem NMDA adagolás előtt, sem utána; a CA3ab régióban találtunk néhány gyengén jelölt kosársejt terminális a kontroll szeletekben, de az NMDA adagolásának semi hatása nem volt a jel intenzitására vagy sűrűségére (38,9%-ról 39,8%-ra változott). A CA1 és CA3c régiókban azonban markáns változást tapasztaltunk NMDA hatására a cGMP jelölt GABAerg axonok tekintetében (az eredeti 0%-ról 57,3%-ra nőtt a jelölt terminálisok száma a CA1-ben). A jelölt terminálisok intenzitása is jóval erősebbnek bizonyult a CA3ab terminálisaival összehasonlítva. Kompetitív (D-AP5, 50µM) és non-kompetitív (MK-801, 50µM) NMDA receptor antagonistával történő előkezelés kivédte a CA1 régióban az NMDA cGMP-re gyakorolt hatását, míg semi hatással sem volt a CA3ab kosársejt terminálisaira, ami arra utal, hogy csak a CA1 kosársejt terminálisai szabályozhatók NMDA indukálta NO termeléssel (n=4 szelet, 2 egér). Azért, hogy kizárjuk annak a lehetőségét, hogy feszültségfüggő kalcium csatornák hozzájárulnak az NMDA indukálta hatáshoz, gátoltuk a posztszinaptikusan elhelyezkedő L- és R-típusú kalcium csatornákat (20µM nifedipin + 100nM SNX482). Az 5µM NMDA adagolására bekövetkező hatás mit sem változott (a kettős immunfluoreszcens mérésekből származó arányok azonosak voltak), ami azt sugallja, hogy az NMDA receptorok működése szükséges és elégséges feltétele az NO-cGMP jelpálya beindításához (n=10 szelet, 2 egér). Az NMDA okozta hatás szintén teljesen kivédhető volt, ha nNOS gátlóval (L-NAME; 100µM, n=5 szelet, 3 egér) vagy NO receptor gátlóval (ODQ; 20µM, n=14 szelet, 5 egér) előinkubáltuk a szeleteket.

Megvizsgáltuk a továbbiakban azt is, hogy a piramisajt és interneuronok spontán akciós potenciál generálása mennyiben járult hozzá az NMDA hatásához, ezért a kísérletsorozatot megismételtük olyan magnéziummentes ACSF-ben, amibe 1µM tetrodotoxint (TTX) tettünk, és az eredmények teljesen azonosak lettek. Hogy bizonyítsuk az nNOS kizárólagos szerepét a kísérleteinkben nNOS génkiütött egerekből is készítettünk túlélő szeleteket. Minden idegi cGMP festés eltűnt a kontroll (n=8 szelet, 4 egér) és az NMDA kezelt szeletekből is (n=9 szelet, 4 egér) a hippokampusz minden régiójában. Megmaradt a cGMP jel azonban az erekben az

nNOS génkiütött állatban is az endoteliálisan található eNOS aktivitásnak köszönhetően. Eredményeink azt sugallják, hogy a legvalószínűbb mechanizmus az NMDA receptorokon keresztüli lokális kalcium beáramlás, ami nNOS-függő cGMP termelést vált ki a hippokampális CA1 és CA3c régió GABAerg terminálsaiban. Habár ebben a munkában a GABAerg szinapszisokra fókuszáltunk, érdemes megemlíteni, hogy az NMDA-indukálta cGMP termelés jelen volt a CA1 stratum radiatum neuropiljében, míg hiányzott a stratum lacunosum-moleculare-ból. Érdekes, hogy ebben a két régióban az LTP és LTD létrejöttéhez szükséges feltételek jellemzően különböznek, amit részben megmagyarázhat a fent említett NO-jelátvitelbeli különbség. Technikai oldalról nézve, a korábbi, NMDA receptor agonista vagy antagonistá adásával járó, elektrofiziológiai és farmakológiai kísérletek értelmezésénél figyelbe kell venni egyrészt a GABAerg szinaptikus áramokban létrejövő, másrészt a hálózati aktivitásban bekövetkező indirekt hatását az NMDA-NO-cGMP jelátviteli útvonalnak.

4.6. A CA1 piramis sejtekre érkező periperiszomatikus GABAerg szinapszisokban kifejeződik az NMDA-receptor GluN1, GluN2A és GluN2B alegysége

A fenti kísérletek azt sugallták, hogy az NMDA receptoroknak közel kell lennie a GABAerg szinapszisokhoz. Éppen ezért, kvantitatív beágyazás utáni immunarany jelölést végeztünk GluN1, 2A és 2B alegységre, olyan antitestekkel, amik bizonyítottan specifikus jelölést adnak. A piramis sejtek tuskéiben kifejeződnek ezek az alegységek, amit mi is csak megerősíteni tudtunk.

Ezen felül a GluN1, 2A és a 2B alegység egyértelműen megtalálható volt a piramis sejtek szómájára érkező GABAerg szinapszisok posztszinaptikus aktív zónájában. Az immunarany jel átlagos távolsága a posztszinaptikus membrántól, amit a szinapszis síkjára merőlegesen mértünk, 3,63 nm-nek adódott az intracelluláris oldalon (medián; 0-12,8 interkvartilis távolság; 72,8%-a az aranyaknak posztszinaptikus volt és 27,2%-a volt a szinaptikus részben, n=104 arany szemcse), ami azt mutatja, hogy az NMDA receptorok a GABAerg szinapszisokban is posztszinaptikusan helyezkednek el. Nem találtunk preszinaptikus jelet. Ezt követően, ezzel a teljesen kvantitív módszerrel megbecsültük a serkentő és periperiszomatikus gátló szinapszisok NMDA receptor sűrűségét. A GluN1 alegység immunarany sűrűségét mértük, mivel az minden NMDA receptorban egyformán van jelen. Random mintát vettünk a periperiszomatikus GABAerg (n=54 szinapszis 2 egérből) és a dendritikus tüske szinapszisokból (a stratum radiatumból, n=98 szinapszis, 2 egér). A GABAerg szinapszisokban az NMDA receptor sűrűsége $9,73 \pm 1,34$ -szer kisebb volt, mint a tüske szinapszisokban (GABAerg: $2,55 \pm 0,13$; tüske: $24,84 \pm 4,71$ arany szemcse/ μm). Mindazonáltal, a GABAerg szinapszisok 1,8-szor nagyobbak, mint a tüske szinapszisok, így az NMDA receptorok becsült száma csak $5,4 \pm 0,75$ -szor kevesebb a GABAerg szinapszisokban. Néhány NMDA receptort extraszinaptikusan is találtunk a piramis sejtek sejttestjén ($0,198 \pm 0,03$ arany szemcse/ μm). Azért, hogy közvetlenül bizonyítsuk, hogy a különböző NMDA receptor alegységek egyazon szinapszisban is megtalálhatók, az alegységeket ugyanazon szinapszis egymást követő metszein lokalizáltuk. Azt találtuk, hogy a GluN1-2A, GluN1-2B és

GluN2A-2B alegységek gyakran kolokalizáltak. Ezentúl a három különböző alegységet ugyanazon szinapszisban is kimutattuk. Eredményeink azt mutatták, hogy egyazon GABAerg szinapszis mind GluN2A, mind GluN2B alegység összetételű NMDA receptort hasznosít posztzinaptikusan.

4.7. A CA1 piramis sejtekre érkező periszomatikus GABAerg szinapszisok nagy része mindhárom NMDA receptor alegységgel rendelkezik - kvantitatív adatok

Ahhoz, hogy megvizsgáljuk, hogy a GABAerg szinapszisok milyen arányban tartalmaznak NMDA receptorokat, nagyszámú rekonstruált szinapszisa van szükség, ezért SDS-kezelt fagyasztva tört replika immunjelölést végeztünk. A piramis sejtek sejttestjének felszínén teljes szinaptikus aktív zónák tárnak fel, ahogy a plazmamembrán lipid kettős rétege kettébe törik: az extracelluláris (E)-oldalra és a protoplazmatikus (P)-oldalra.

Egy, a GABA_A receptor (GABA_AR) β3 alegység ellen készített antitest a P-oldal intramembrán fehérjéinek (IMP) sűrű csoportját jelölte meg. A GABAerg szinapszisokban nagy a helyi GABA_AR alegység immunarány sűrűség, ezért egy ezen alapuló nem elfogult körülhatároló módszerrel határoztuk meg a vélt GABAerg szinapszisok határát. Ezt követően GABA_AR és NMDAR alegységek elleni kettős immunarány jelölés segítségével megbecsültük az NMDA receptor alegységet tartalmazó GABAerg szinapszisok minimum arányát. Mindegyik NMDA receptor alegység ellenes antitest erős jelölést adott a piramis sejt-tüskéken, de asszociálódott a GABAAR tartalmú periszomatikus szinapszisokkal is. Az antitest háttérjelölését a periszomatikus E-oldalon mértük és elhanyagolható mértékűnek bizonyult (0,31±0,08 aranyzemcse/μm² a GluN1 estében, 0,79±0,16 aranyzemcse/μm² a GluN2A és 0,55±0,18 aranyzemcse/μm² a GluN2B alegység esetében). Az NMDAR jelsűrűség a GABAerg szinapszisokban azonban 29,80±6,85 aranyzemcse/μm² (n=82 szinapszis, 3 egér) volt a GluN1, 47,77±6,77 aranyzemcse/μm² (n=48 szinapszis, 2 egér) a GluN2A és 45,83±11,58 aranyzemcse/μm² (n=44 szinapszis, 2 egér) a GluN2B immunarány reakció esetében. Másképpen fogalmazva, a szinaptikus NMDAR sűrűség a mért háttérjelölés 99,06-szorosa a GluN1, 62,78-szorosa a GluN2A és 94,79-szorosa volt a GluN2B immunreakció esetében. Ennek megfelelően, azt találtuk, hogy a periszomatikus GABAerg szinapszisok 66,2±6,8%-a (n=82) volt GluN1 pozitív, 65,5±11,1%-a (n=48) volt GluN2A és 70,5±9,6%-a (n=44) volt GluN2B pozitív, és a szinaptikus receptorsűrűség minden egyes szinapszis estében meghaladta a háttér mértékének 30-szorosát. Az egy szinapszisban lévő átlagos NMDAR aranyzemcseszám az NMDAR pozitív szinapszisokban 3,02±0,51 aranyzemcse/szinapszis volt a GluN1, 5,21±0,95 a GluN2A és 4,41±0,54 aranyzemcse/szinapszis a GluN2B esetében. A mérési eredményeink kissé alulbecsülhetik a tényleges szinaptikus NMDAR sűrűséget a többi membránnal összehasonlítva, mert a nagy sűrűségű GABA_AR jelölés akadályozhatja az NMDAR-asszociált immunarány részecskék hozzáférését a szinapszishoz. Az aranyzemcsék száma és a szinaptikus terület szignifikáns pozitív korrelációt mutatott minden alegység-jelölés esetében (Spearman-R korreláció; r=0,3652,

$p=0,00074$ a GluN1 esetében; $r=0,5002$, $p=0,00029$ a GluN2A esetében; $r=0,4018$, $p=0,0069$ a GluN2B esetében), vagyis minél nagyobb egy szinapszis, annál több NMDAR alegységet tartalmazott. Az arany szemcsék sűrűsége viszont nem változott a szinaptikus területtel (Spearman-R korreláció; $r=-0,0031$, $p=0,9781$ a GluN1 esetében; $r=0,1357$, $p=0,3576$ a GluN2A esetében; $r=-0,2923$, $p=0,0542$ a GluN2B esetében). Nem találtunk szinaptikus GluN1-re jelölt arany szemcséket a piramis sejtek szómáján a piramis sejt specifikus GluN1 génkiütött egerekben ($n=34$ szinapszis, 2 egér). Az interneuronok dendrit törzsére érkező glutamaterg szinapszisok viszont intenzíven jelölődtek ezekben a génkiütött állapotokban.

Tekintve, hogy elektrofiziológiai kísérletek már mutatták, hogy extraszinaptikusan is vannak NMDA receptorok, megvizsgáltuk az extraszinaptikus sejttest membránokat is. Az extraszinaptikus NMDAR sűrűség $6,76\pm 1,72$, $9,10\pm 1,51$ és $2,65\pm 0,66$ arany szemcse/ μm^2 volt külön-külön a GluN1, 2A és 2B alegységek elleni immunreakcióban. Ez a sűrűség 4,49-szor, 5,41-szor és 17,62-szor volt alacsonyabb a szinaptikus sűrűségéknél, de még mindig 22,05-szor, 12,02-szor és 5,49-szor nagyobb a hatter festődésnél a GluN1, 2A és 2B alegységek elleni reakciókban egyenként.

Összefoglalva, a CA1 piramis sejtekre érkező periszomatikus GABAerg szinapszisok legalább kétharmada tartalmaz NMDA receptor alegységeket a felnőtt hippocampusban.

4.8. Mindkét kosársejt-típus által képzett szinapszisban megtalálhatók a posztzinaptikus NMDA receptorok

Azért, hogy meghatározzuk az NMDAR pozitív GABAerg szinapszisok forrását, és hogy tovább erősítsük, hogy kizárólag posztzinaptikusak az NMDA receptorok, beágyazás előtti immunarany kísérleteket végeztünk GluN1, 2A és 2B alegység ellen a CA1 hippocampális régióban. Minden alegység festés posztzinaptikusan helyezkedett el a periszomatikus GABAerg szinapszisokban. GABAerg terminálisok nem festődtek. A periszomatikus GABAerg szinapszisokban mért arany szemcsék lineáris sűrűsége a GluN1 reakcióban $0,520$ arany szemcse/ μm volt, míg az extraszinaptikus jelölés jóval alacsonyabb volt ($0,058$ arany szemcse/ μm). Ez az eredmény tovább megerősíti, hogy az NMDA receptorok specifikusan a GABAerg szinapszisokhoz asszociálódnak.

Ezt követően immunarany-immunperoxidáz kettős jelölést végeztünk NMDAR-parvalbumin (PV) és NMDAR-vezikuláris glutamate transzporter 3 (vGluT3) ellen. Az utóbbiról jól ismert, hogy kizárólag a kolecisztokinin (CCK)-tartalmú interneuronokban található meg a hippocampusban, és körül-belül 90%-át jelöli meg CCK-pozitív kosárterminálisoknak a CA1 régióban. Azt találtuk, hogy a PV pozitív terminálisok által képzett szinapszisok 42,6%-a ($n=47$ szinapszis 2 egérből) volt jelölt GluN1 alegységre, 36,4% ($n=33$, 2 egér) GluN2A alegységre és 30,6% ($n=36$, 2 egér) volt jelölt GluN2B alegységre. A vGluT3 pozitív terminálisok szinapszisaiban 61,0% ($n=41$, 2 egér) volt pozitív GluN1-re, 42,9% ($n=28$, 2 egér) GluN2A-ra és 37,9% ($n=29$, 2 egér) GluN2B-re. Habár a munkánk során a periszomatikus szinapszisokra fókuszáltunk, néhány dendritikus gátló szinapszis szintén pozitív volt NMDAR alegységekre.

Mivel az nNOS és az NMDA receptor antitestek mind nyúlban készültek, így nincs megbízható módszer arra, hogy direkt kolokalizáljuk ezeket az antitesteket. Ennek ellenére, az a tény az nNOS és az NMDA receptor jelen volt a kosársejt-szinapszisokban, szintén erősen azt sugallja, hogy kolokalizálódnak a periperiszomatikus GABAerg szinapszisok posztszinaptikus kompartmentjében.

5. Következtetések

Jelen értekezés legfontosabb következtetései:

(1) a hippokampális piramissejtekben az nNOS asszociálódik a különböző -mind PV, mind CCK/vGluT3 kosársejtek által képzett- GABAerg szinapszisok posztszinaptikus aktív zónájával,

(2) az NOsGC megtalálható az interneuronoknak mind a szomato-dendritikus mind az axon terminális kompartmentjében,

(3) NOsGC $\alpha 1\beta 1$ kizárólag az interneuronokban fejeződik ki, míg $\alpha 2\beta 1$ alegység kompozíció piramissejtekben található,

(4) NMDA adagolása határozott cGMP növekedést okozott a GABAerg kosárterminálisokban NMDAR-, nNOS- és NOsGC-függő módon specifikusan a hippokampusz CA1 és CA3c régiójában, míg a CA3ab esetében a cGMP halmozódás NMDAR független módon jött létre,

(5) az NMDAR GluN1, GluN2A és GluN2B alegységei feldúsulást mutattak a GABAerg szinapszisokban, és kizárólag posztszinaptikusan helyezkedtek el,

(6) a periszomatikus GABAerg szinapszisok legalább kétharmada tartalmazott NMDA receptort -mindhárom vizsgált alegységet- tizedakkora sűrűségben, mint a glutamaterg szinapszok,

(7) mind a PV, mind a CCK/vGluT3 tartalmú kosársejt terminálisok által képzett szinapszisok tartalmaztak NMDA receptorokat.

Eredményeink tükrében a CA1 piramissejtek periperiszomatikus GABAerg szinapszisaiban kifejeződő NMDA receptorok helyi aktivációja képes megfelelő mennyiségű kalciumot biztosítani az nNOS aktiválásához. Következésképpen az NMDAR-nNOS-NO-NOsGC-cGMP jelpálya hatékony aktivitás-függő szabályozója lehet ezen szinapszisok neurotranszmissziójának.

Az NMDA receptorok koincidencia detektor tulajdonsága miatt, a NO rendszer aktiválása csak a pre- és posztszinaptikus sejt, vagy a hálózati aktivitásra reagáló gliasejt és a posztszinaptikus sejt együttes aktivációja során, lokális kalciumszint növekedéssel és szinapszis-specifikusan alakul ki, precíz szabályozást téve lehetővé a pre- és posztszinaptikus sejt kommunikációjában.

6. Saját publikációk jegyzéke

6.1. Az értekezés témájában megjelent első szerzős közlemények:

NMDA receptors in hippocampal GABAergic synapses and their role in nitric oxide signaling

Szabadits E., Cserép C., Szőnyi A., Fukazawa Y., Shigemoto R., Watanabe M., Itohara S., Freund TF and Nyíri G.

The Journal of Neuroscience, 2011; 31(16):5893-5904

Hippocampal GABAergic synapses possess the molecular machinery for retrograde nitric oxide signaling.

Szabadits E*, Cserép C*, Ludányi A, Katona I, Gracia-Llanes J, Freund TF, Nyíri G.

The Journal of Neuroscience, 2007 Jul 25;27(30):8101-11.

* Megosztott elsőszereplőség

6.2. Az értekezés témájában megjelent nem első szerzős közlemények:

NMDA Receptors in GABAergic Synapses during Postnatal Development.

Cserép C, **Szabadits E**, Szőnyi A, Watanabe M, Freund TF, Nyíri G.

PLoS ONE 2012; 7(5):e37753. Epub 2012 May 25

Nitric oxide signaling modulates synaptic transmission during early postnatal development.

Cserép C, Szőnyi A, Veres JM, Németh B, **Szabadits E**, de Vente J, Hájos N, Freund TF and Nyíri G.

Cerebral Cortex, 2011;21:2065-2074

6.3. Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – közlemények:

CB1 cannabinoid receptors are enriched in the perisynaptic annulus and on preterminal segments of hippocampal GABAergic axons

Nyíri G, Cserép C, **Szabadits E**, Mackie K, Freund TF

Neuroscience, 2005, Quantitative Neuroanatomy Special Issue, 2005., 136(3):811-22;

GABA(B) and CB1 cannabinoid receptor expression identifies two types of septal cholinergic neurons

Nyíri G, **Szabadits E**, Cserép C, Mackie K, Shigemoto R, Freund TF

Eur J Neurosci. 2005; 21:3034-3042.