

NMDA-receptor függő nitrogén-monoxid jelátvitel a hippokampusz GABAerg szinapszisaiban

Doktori értekezés

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.
MTA Kíséreti Orvostudományi Kutatóintézet

„A dolgok nem kívül kezdődnek, hanem belül, és nem alul, hanem felül, és nem a láthatóban, hanem a láthatatlanban.”

(Hamvas Béla)

I. TARTALOMJEGYZÉK

I. Tartalomjegyzék.....	3
II. Rövidítések jegyzéke.....	7
III. Bevezetés.....	11
III.1. Agyunkról és a megismerésről, filozófiai megfontolások.....	11
III.2. Az központi idegrendszerről általában.....	12
III.3 A hippocampusz felépítése és szerepe.....	12
III.3.1. A hippocampusz nevezéktana, rétegződése.....	12
III.3.2. A hippocampusz principális sejtjei, a „háromszinapszisos hurok”.....	15
III.3.3. A hippocampusz szerkezetének szerepe a deklaratív memória kialakításában.....	16
III.3.4. A hippocampusz interneuronjai.....	18
III.3.4.1. A dendritikus gátlósejtek.....	19
III.3.4.2. A periszomatikus gátlósejtek.....	21
III.3.4.3. Az interneuron-specifikus interneuronok.....	26
III.3.4.4. A vetítő GABAerg interneuronok.....	26
III.3.5. A hippocampusz interneuronok szerepe a neuronhálózat működésében.....	27
III.3.5.1. A théta oszcilláció.....	28
III.3.5.2. A gamma oszcilláció.....	28
III.3.5.3. Az éles-hullámok.....	29
III.3.5.4. A távolra vetítő GABAerg neuronok szerepe az oszcillációkban.....	29
III.3.5.5. Homeosztatisz szabályozás.....	30
III.4. A retrográd jelátvitel.....	31
III.4.1. Retrográd jelátvitel az aktivitásfüggő szinaptikus plaszticitásban.....	32
III.4.1.1. Membrán-permeábilis faktorok.....	32
III.4.1.2. Membrán-kötött sejtkapcsoló fehérjék.....	34
III.4.1.3. Szekretált fehérjék.....	35
III.4.1.4. A retrográd jelátvitel távoli hatásai.....	35
III.4.2. Retrográd jelátvitel a hippocampuszban.....	36

III.4.2.1. DSI/DSE.....	37
III.4.2.2. NMDA-vezérelt eCB-STD.....	37
III.4.2.3. metabotróp receptorok vezérelte eCB-STD.....	38
III.4.2.4. eCB-LTD/LTDi, heteroszínaptikus moduláció.....	38
III.5. Nitrogén-monoxid, mint neurotranszmitter.....	40
III.5.1. A nitrogén-monoxid szintézise, nitrogén-monoxid szintázok.....	40
III.5.2. A nitrogén-monoxid szintézisének szabályozása.....	42
III.5.3. A nitrogén-monoxid kémiai tulajdonságai, koncentrációja.....	43
III.5.4. A nitrogén-monoxid receptorai, NO-szenzitív guanilát-ciklázok.....	45
III.5.5. A nitrogén-monoxid „lebontása”, szöveti elnyelődése	47
III.5.6. NO indukálta másodlagos jelátviteli útvonalak.....	47
III.5.7. A NO fiziológiai hatásai.....	48
III.5.7.1. nNOS tartalmú interneuronok a hippocampusban és szerepük a neuronhálózat működésében.....	48
III.5.7.2. Az NO jelátvitel szerepe a glutamáterg szinapszisok plaszticitásában	49
III.6. N-metil-D-aszpartát (NMDA) típusú glutamát receptorok.....	50
III.6.1. NMDA receptorok felépítése, alegységek szerkezete.....	50
III.6.2. NMDA receptorok funkcionális heterogenitása.....	53
III.6.3. NMDA receptorok szubcelluláris elhelyezkedése.....	54
III.6.3.1. Színaptikus NMDA receptorok.....	54
III.6.3.2. Extraszínaptikus NMDA receptorok.....	55
III.6.4. Az NMDA receptorok fiziológiai hatásai.....	56
III.6.4.1. NMDA receptorok szerepe a hosszútávú plasztikus változásokban.....	57
III.6.4.2. NMDA receptorok szerepe a kóros túlszerezésben (excitotoxicitás).....	58
IV. Célkitűzések.....	59
V. Kísérleti módszerek	61
V.1. Kísérleti állatok.....	61
V.2. Transzkardiális perfúziók.....	61

V.3. Antitestek specificitásának vizsgálata.....	62
V.4. Farmakológiai hatóanyagok.....	64
V.5. In situ hibridizációs kísérletek.....	64
V.5.1. NOsGC alegységek kimutatásához szükséges ribopróbák szintézise.....	64
V.5.2. In situ hibridizáció.....	65
V.6. Kettős immunfluoreszcens kísérletek.....	66
V.7. Beágyazás előtti immunperoxidáz kísérletek.....	67
V.8. Beágyazás előtti immunarany és kombinált immunarany-immunperoxidáz kísérletek.....	67
V.9. Lowicryl beágyazás és beágyazás utáni kvantitatív immunarany kísérletek.....	70
V.10. SDS-kezelt fagyasztva tört replika immunarany kísérletek.....	71
V.10.1. GABAerg szinapszisok meghatározása a replikált piramis sejtek felszínén.....	72
V.11. Farmakológiai kísérletek túlélő szeleten, cGMP immunfluoreszcens kísérletek.....	75
V.12. Statisztikai analízisek.....	76
VI. Eredmények.....	78
VI.1. A neuronális nitrogén-monoxid szintáz (nNOS) asszociálódik a GABAerg szinapszisok poszt-szinaptikus denzitásával a CA1 piramis sejtek sejttestjén, dendritjén és axon iniciális szegmentjén.....	78
VI.2. Az NO receptor $\alpha 1$ és $\alpha 2$ alegységének sejt típus specifikus mRNS megoszlása a hippocampusban.....	82
VI.3. Az NOsGC $\alpha 1$ alegység megtalálható az interneuronokban és azok terminálisaiban, de hiányzik a piramis sejtekből.....	83
VI.4. Mind a periszomatikus, mind a dendritikus GABAerg neuronok tartalmaznak NOsGC $\alpha 1$ alegységet.....	87
VI.5. Az NOsGC $\alpha 1$ alegység tartalom és bizonyos interneuron típusok sejttest mérete közti korreláció.....	89
VI.6. NMDA indukálta cGMP termelés a túlélő hippocampusz CA1 régiójának GABAerg terminálisaiban.....	90

VI.7. A CA1 piramissejtekre érkező periszomatikus GABAerg szinapszisokban kifejeződik az NMDA-receptor GluN1, GluN2A és GluN2B alegysége.....	97
VI.8. A CA1 piramissejtekre érkező szomatikus GABAerg szinapszisok nagy része mindhárom NMDA receptor alegységgel rendelkezik- kvantitatív adatok.....	99
VI.9. Mindkét kosársejt-típus által képzett szinapszisban megtalálhatók a poszszinaptikus NMDA receptorok.....	102
VII. Megbeszélés.....	106
VII.1. Szinapszis specifikus NO termelés a GABAerg szinapszisokban.....	106
VII.2. Sejtípus specifikus NOsGC alegység expressziók és asszociációjuk nNOS-sal.....	108
VII.3. Az nNOS és NOsGC mediálta jelátvitel a periszomatikus és a dendritikus GABAerg sejtek szinapszisa számára is elérhető, de nem egyforma mértékben.....	110
VII.4. Az NO lehetséges hatásai a neurotranszmitter felszabadulásra.....	111
VII.5. NMDA indukálta NO jelátvitel a hippocampusz GABAerg szinapszisaiban.....	112
VII.6. Az NMDAR és az nNOS kolokalizál a GABAerg szinapszisokban.....	114
VII.7. Lehetséges mechanizmusok a GABAerg szinapszisokban lévő NMDA receptorok aktiválására.....	117
VII.8. Az NO rendszer funkcionális összehasonlítása az endokannabinoid rendszerrel a GABAerg szinapszisokban.....	118
VIII. Következtetések.....	120
IX. Összefoglalás.....	121
X. Irodalomjegyzék.....	121
XI. Saját közlemények jegyzéke.....	141
XII. Köszönetnyilvánítás.....	142

II. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

2-AG	2-arachidonil-glicerol
5-HT3	szerotonin
ACSF	mesterséges agy-gerincvelői folyadék
AIS	axon iniciális szakasz
AKD	agonista-kötő domén
AMPA	(2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il)propánsav
BDNF	agyi neurotrofikus faktor
BH4	tertahidrobiopterin
CA1-3	Cornu Ammonis (Ammon-szarv) 1-3 régiói
CAMKII	kalcium-kalmodulin-függő kináz
cAMP	ciklikus adenzin monofoszfát
CASK	kalcium-kalmodulin-függő szerin kináz
CB1R	1-es típusú kannabinoid receptor
CCK	kolecisztokinin
CCK-R	kolecisztokinin-receptor
cDNS	komplementer DNS
cGMP	ciklikus guanozin monofoszfát
CNG	ciklikus nukleotid-szabályozott ioncsatorna
COX	ciklooxygenáz
CREB	cAMP-függő szakasz-kötő fehérje
CRIP	kannabinoid-receptorral kölcsönható fehérje
D-AP5	D(-)-2-amino-5-foszfonovaleriánsav
DAB	3,3'-diaminobenzidin
DAG	diacilglicerol
DEPC	dietilpirokarbonát
DLC	dinein-könnyűlánc
DSE	depolarizáció-indukálta serkentésnyomás
DSI	depolarizáció-indukálta gátlásnyomás
EC	sejten kívüli
eCB	endokannabinoid

eNOS	endoteliális nitrogén-monoxid szintáz
EPSP	serkentő posztszinaptikus potenciál
ER	endoplazmás retikulum
FAD	flavin-adenin dinukleotid
FMN	flavin mononukleotid
GABA	gamma-amino vajsav
GABA _A R	A-típusú GABA-receptor
GAD65	glutaminsav dehidrogenáz (65 kD-os)
GC	guanilát-cikláz
GKAP	guanilát-kináz kapcsolt fehérje
GluN1-3	NMDA-típusú glutamát-receptor 1-3-as alegysége
GRIP1	glutamát-receptor kölcsönható fehérje
GTP	guanozin trifoszfát
HCN	hiperpolarizáció-aktiválta ciklikus nukleotid-szabályozott ioncsatorna
HSA	humán szérum-albumin
IBMX	3-izobutil-1-metilxantin
IC	sejten belüli
IN	interneuron
iNOS	indukálható nitrogén-monoxid szintáz
IP3	inozitol-trifoszfát
IPSP	gátló posztszinaptikus potenciál
IS-1-3	interneuron-szelektív interneuron 1-3-as típusa
KO	génkiütött
L-NAME	L-nitroarginin-metil-észter
LOX	lipoxigenáz
LTDi	gátló szinapszis hosszú-távú depressziója
LTP	hosszú távú potencírozódás
mAChR	muszkarinos típusú acetilkolin-receptor
mEPSP	miniatűr serkentő posztszinaptikus potenciál
mGluR	metabotropikus glutamát-receptor
mRNS	hírvivő ribonukleinsav
NADPH	nikotinamid-adenin-dinukleotid

NCAM	neuronális sejt-adhéziós molekula
NGF	idegi növekedési faktor
NHA	N-hidroxi-arginin
NMDA	N-metil-D-aszpartát
nNOS	neuronális nitrogén-monoxid szintáz
NO	nitrogén-monoxid
NOsGC	nitrogén-monoxid-szenzitív guanilát-cikláz
NTD	N-terminális domén
O-LM	oriens-laonosum-moleculare interneuron
ODQ	oxadiazolo-quinoxalin
PB	foszfát puffer
PCR	polimeráz-lánreakció
PDZ	PSD-95/Discs large/Zonula occludens domén
PKA	protein-kináz-A
PKG	protein-kináz-G
PLC	foszfolipáz-C
PP	perforáns-pálya
PP1	protein-foszfatáz
PSD-95	posztszinaptikus denzitás-95 fehérje
PV	parvalbumin
RhoA	Ras-homológ géncsládba tartozó fehérje
ROS	reaktív oxigéngyök
SAP-102	szinapszis-asszociált fehérje-102
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
sGC	szolubilis guanilát-cikláz
SKA	Schaffer-kollaterális asszociált sejt
SNP	nátrium-nitroprusszid
SOM	szomatosztatin
SPR	P-anyag-receptor
SSCAM	synaptic scaffolding protein/szinaptikus állványozófehérje
STD	rövid távú depresszió
str.	Stratum/réteg

TBS	Tris-pufferelt sóoldat
THB	tetrahydrobiopterin
TTX	terrodotoxin
VASP	vazodilatátor-stimulált foszfoprotein
VDCC	feszültségfüggő kalciumcsatorna
vGluT3	3-as típusú vezikuláris glutamáttranszporter
VIP	vazoaktív intesztinális polipeptid

III. BEVEZETÉS

Ebben a fejezetben egy rövid általános bevező után ismertetem a hippokampusz, mint kísérleteink modellterületének a szerkezetét és működését, majd részletezem az értekezés témájában kulcsfontosságú retrográd jelátvitel általános ismérveit. Ezt követően tárgyalom a dolgozat alapjául szolgáló nitrogén-monoxid jelátvitel elemeit, valamint az NMDA receptorok jellemzőit.

III.1 Agyunkról és a megismerésről, filozófiai meggondolások

Agyunk a természet talán legsodálatosabb és legbonyolultabb képződménye. Szinte felfoghatatlan, hogy idegsejtek közötti kapcsolatok és ingerületek képesek olyan komplex folyamatokat létrehozni, mint az emberi gondolkodás, logika, személyiség vagy kreativitás. A nagy kérdés, hogy a „megismerés tárgya” kutatható, felfogható-e ugyanazzal, amit megismerni kívánunk. A görög „gignoscó” (megismer) szó eredeti jelentése: szagol, szimatol, de más a tudással („oida”), gondolkodással („noeó”) kapcsolatos szavak eredeti jelentése is a érzékszervi működéssel, főleg a látással függött össze. Az ókori görög filozófiában tehát a megismerést és gondolkodást egyfajta „értelemmel megtöltött szemlélődésnek” tekintették. *Elmén* a léleknek azt a részét értették, melyben érzeteinket és észleleteinket tároljuk. A szó maga Platónnál jelenik meg először, és más alapokra helyezi a megismerés filozófiáját (Steiger K., 2008). A platóni anamnézis (visszaemlékezés)-elmélet (Platón: Menón) lényege, hogy a lélekben benne lakozik minden tudás, csak megfelelő kérdésekkel elő kell vezetni, fel kell eleveníteni az „elfelejtett” tudást- vissza kell emlékezni. Platón ezen elmélete alapján a megfelelő kérdések felvetésével lehetőségünk nyílhat akár az agy megismerésére is. Platón azonban a Barlang hasonlat című dialógussal (Platón: Állam VII, 514a-517a) tovább megy a megismerésről való gondolkodásban. A szinte teljes tudatlanságtól (a barlang árnyai) az alapvető megismerésen (a „kinti világ”) át a legmagasabb szintű gondolkodásig (Platónnál az ideák világa, a hasonlatban a Nap szemlélése) terjedő lépéseken keresztül vezet az út. De vajon melyik lépcsőfokon áll a mai tudományos megismerés? Valóban azt észleljük kísérleteink során, ami meghatározza agyunk működését, tényleg úgy működik, ahogy mi elképzeljük? Látjuk az árnyakat adó

tárgyakat, vagy már esetleg kijutottunk a barlangból is? Vagy még mindig csak az árnyakat látjuk a barlangban lekötözve? És eljuthatunk-e egyáltalán a Nap felfedezéséig? Az olvasóra bízom, én nem merek állást foglalni a kérdésben, de egy biztos, csak megfelelő alázattal lehet a tudományhoz és agyunk megismeréséhez nyúlni.

III.2. Az központi idegrendszerről általában

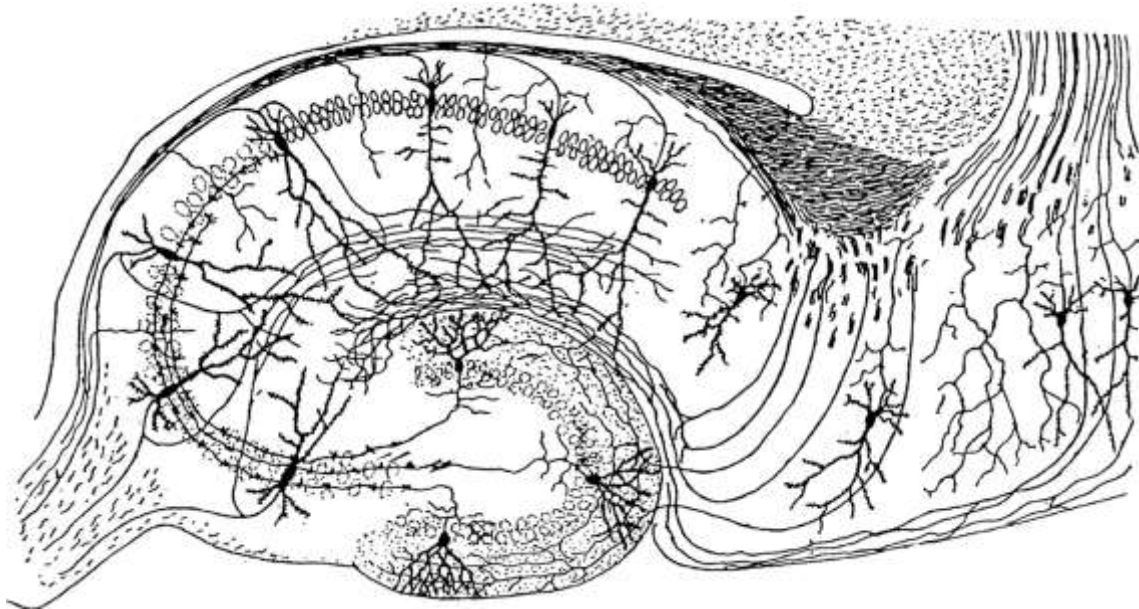
Az emberi agyat nagyságrendileg 10^{11} (száz-milliárd) idegsejt alkotja, a közöttük létrejövő szinapszisok száma 10^{14} -ra (százezer-milliárdra) tehető (Drachman, 2005). Ezen kapcsolatok képezik minden idegi működés alapját. Az idegsejtek precízen huzalozott mikrohálózataiban specifikus információ tárolására nyílik lehetőség. Idegrendszerünk nem a sejtek szaporításával (sejtosztódás) éri el az újonnan beérkező ingerek, információ feldolgozását és tárolását, hanem a meglévő idegsejtek kapcsolatainak (szinapszisainak) erősítésével, új szinapszisok létrehozásával. Kivétel természetesen ez alól is akad, idegi őssejtek találhatóak több helyen is az emlős központi idegrendszerben és néhol, például a szaglógumóban és a hippokampusz gyrus dentatus-ának szemcsesejtjei között képesek új idegsejteket létrehozni, és azokat a hálózatba építeni. Ezen új sejteknek alapvető szerepe van az egyedre jellemző hálózat kialakításában (Bergmann and Frisén, 2013; Freund et al., 2013). Talán a legfontosabb szabályozási mód, amivel az idegrendszer alkalmazkodik a bejövő ingerekhez, illetve amivel a bejövő ingereket integrálja belső világunk állapotával, az a szinaptikus plaszticitás. A szinapszisok nem állandósult képződmények, folyamatosan változnak, leépülnek kapcsolatok, amik már feleslegessé váltak, míg mások megerősödnek, nagyobbak lesznek. Minden emlék egy speciális szinapszis mintázattal rendelkezik. Az, hogy ki mennyire képes komplex, kreatív gondolkodásra, ezen idegi mikro-hálózatok kapcsoltságától, szinaptikus erősségeitől függ, és nem az idegsejtek számától (normális agyi működést feltételezve).

III.3 A hippokampusz felépítése és szerepe

III.3.1. A hippokampusz nevezéktana, rétegződése

A dolgozat témáját képező kísérletek rágsálókban készültek és a legtöbb szakirodalmi adat is azokról áll rendelkezésre, így a dolgozatban a rágsáló hippokampusz anatómiájáról adok rövid bevezetést. A hippokampusz az archipallium része, fejlődéstanilag az agy ősbib részéhez tartozik. Hippokampusz jelentése: csikóhal, szerkezetére jellemző kettős „C” alakja miatt kapta a nevét. A hippokampusz formáció két jól meghatározott része: az Ammon-szarv (Cornu Ammonis) és a gyrus dentatus.

A „Cornu Ammonis” („kosszarv”) név szintén az alakjára vezethető vissza. A kétoldali hippokampuszt a fimbria-fornix (másnéven lyra davidis vagy psalterium; jelentése: ókori sokhúros hárfaszerű hangszer, szintén alakjára utal) köti össze.



1. Ábra. A hippokampusz sematikus ábrája Ramón y Cajal (1893) nyomán

Az ábrán a hippokampusz-szubikuláris komplex principális sejtjeinek vázlatos kapcsolat rendszere látható. A hippokampusz speciális memóriefolyamatokban játszott működésében alapvető fontosságú szerepet játszik a gyrus dentatus szemcsesejtjei és az Ammon-szarv CA3, majd CA1 piramissejtjei közt létrejövő ún. „háromszinapszisos hurok”. A hippokampusz legjelentősebb serkentő bemenetét a külső- és belső világunkból származó információkat egyaránt integráló entorhinális kéregből jövő rostok alkotják (perforáns pálya).

A hippocampusz jól elkülönül az agykéregtől (neopallium), az entorhinális kéreg 6 rétegű sejtállományából szubikulumon, mint átmeneti kéregterületen keresztül jutunk az archikortikális hippocampuszba (1.ábra). Santiago Ramón y Cajal (1893, 1911), majd később tanítványa, Lorente de Nó (1934) Golgi impregnációs vizsgálatai vezettek a hippocampusz különböző sejtjeinek (principális és „nem-principális” sejtnek) meghatározásához, valamint ezek alapján a hippocampusz régióinak nevezéktanának bevezetéséhez (Lorente de Nó, 1934), amit a mai napig használunk. Az Ammon-szarv régiói: (a „Cornu Ammonis” rövidítése alapján) CA1 régió, íves, kanyarodó részét, CA3ab régió, a gyrus dentatus hilusába nyúló részét CA3c régió, nevezük. Megkülönböztetnek CA2 régiót is, melyek CA3 piramis sejt tulajdonságokat mutatnak, de nem kapnak moharost bemenetet. Rágcsálókban e régió mérete kicsi. Ezen kívül megkülönböztetjük a gyrus dentatus-t, melynek szintén „C” alakja révén jön létre a hippocampuszra jellemző kettős „C” forma. A gyrus dentatus elsődleges principális sejtjei, a szemcsesejtek, melyek a hilus körül egy alsó (vagy külső) és egy felső (vagy belső) élbe rendeződnek. Az Ammon-szarv és gyrus dentatus közötti hasadékot nevezük fissura hippocampinak. A hippocampusz egyes régióit további rétegekre lehet osztani (O’Keefe, Nadel, 1978; Amaral, Witter, 1995).

Az Ammon-szarv rétegződése:

- *alveus* (csak a CA1 régióban)
- *stratum oriens*
- *stratum pyramidale*
- *stratum lucidum* (a CA3 specifikus, egyedülálló rétege)
- *stratum radiatum*
- *stratum lacunosum-moleculare*:

A gyrus dentatus-ban az alábbi rétegek találhatóak:

- *stratum moleculare*:
- *stratum granulosum*
- *hilus*

III.3.2. A hippocampusz principális sejtjei, a „háromszinapszisos hurok”

A hippocampusz principális sejtjei az Ammon-szarv piramis sejtjei, valamint a gyrus dentatusban lévő szemcsesejtek és mohasejtek. A CA1 piramis sejtjei lokális kollaterálisai más piramis sejtet kismértékben idegzik be, a maradék helyi kollaterálisai főként helyi ún. visszacsatoló gátló interneuronokon végződnek. A CA3 piramis sejtjei jóval nagyobbak a CA1 piramis sejtjeinél, apikális dendritjük a piramis sejt-réteg alatti str. lucidumban rögtön elágazik és számos túske is található rajta. Speciális képződményük az ún. „thorny excrescences”, szarv szerű kitüremkedések, melyen a szemcsesejtek óriás mohaterminalisai végződnek. A CA3 piramis sejtjei erőteljes rekurrens illetve ellenoldali, asszociációs kapcsolatokkal rendelkeznek. A CA3c piramis sejtjei kissé különböznek a CA3ab sejtjeitől: apikális és bazális dendritjeik nem nagyon különböztethetők meg, és mindkettő gazdagon rendelkezik szarv-szerű kitüremkedésekkel.

A gyrus dentatus szemcsesejtjeinek nincsenek bazális dendritjeik, apikális dendritjük a str. moleculare-ban fut egészen a fissura hippocampiig. Nincsenek helyi rekurrens kapcsolataik, egymást nem idegzik be, helyi kollaterálisokat adnak viszont a hilusban elhelyezkedő mohasejtekre. A mohasejtek érdekes sejtípust képviselnek. Serkentő sejtjei, számos tüskével a dendritjeiken, de nem tömörülnek külön rétegbe, a hilusban elszórtan található. Terminálisai a szemcsesejtjei proximális dendritszakaszaira (esetenként sejttestjére) vetítenek vissza. Egyes elméletek szerint származásukat tekintve lecsúszott piramis sejtjei, ami annak tükrében, hogy morfológiailag nehezen különböztethetők meg a CA3c piramis sejtjeitől és a CA3 bizonyítottan visszavetíti a gyrus dentatus szemcsesejtjeire, nem lehetetlen.

A hippocampusz serkentő kapcsolatrendszerének legfontosabb információfeldolgozó mechanizmusa az ún. „háromszinapszisos hurok”. A hippocampusz legjelentősebb glutamáterg bemenete az entorhinális kéregből érkezik a szubikulumon keresztül. Az entorhinális kéreg integrálja a különböző agykérgi, érzékszervi területekről származó, már előzetesen feldolgozott külső és belső világunkat reprezentáló információt, és ezt közvetíti a hippocampusz felé a *perforáns pályán* keresztül. A perforáns pálya (PP) az Ammon-szarv és gyrus dentatus határán futva lép be egyrészt a CA1-3 régió str. lacunosum-moleculare-ba, másrészt a gyrus dentatus str.

moleculare-ba. A PP rostjai a str. moleculare külső 2/3-ában a szemcsesejtek dendritjein (illetve bizonyos interneuronok dendritjein, lásd III.3.4. alfejezetet) végződnek, topografikusan. Ez a PP-szemcsesejt szinapszis a jelfeldolgozás első lépcsője. A szemcsesejtek ingerülete a *mohaterminálisokon* keresztül tevődik át a CA3 piramis sejtek proximális dendritszakaszaira (illetve bizonyos interneuronokra, lásd III.3.3. alfejezetet), kialakítva a CA3 régió külön, speciális rétegét a str. lucidumot. Ez képezi a információ feldolgozás második állomását. A CA3 piramis sejtek ingerülete a Schaffer Károly (1864-1939) után elnevezett *Schaffer-kollaterálisokon* keresztül jut végül a CA1 piramis sejtek apikális és bazális dendritjeire, mely a 3. szinapszist képezi a „háromszinapszisos-hurokban”. A CA1 piramis sejtek rostjai az alveusban összeszedődve a szubikulumon keresztül visszatérnek az entorhinális kéregbe (de másik rétegébe). A hippocampusz által feldolgozott/átdolgozott információ tehát áttételesen az entorhinális kéregből jut vissza a többi agykérgi területre (O’Keefe, Nadel, 1978; Amaral, Witter, 1995).

III.3.3. A hippocampusz szerkezetének szerepe a deklaratív memória kialakításában

A hippocampusznak kétségbevonhatatlan szerepe van a tanulás- és memóriefolyamatokban. Az új információk feldolgozása során két folyamatra van szükség: első körben egy generalizáló folyamat megy végbe (a „tárgy” besorolása a megfelelő, agyunkban már létező „skatulya” megkeresésével), majd egy specifikáció jön létre (a „skatulyán” belül az új „dolog” miben tér el a „skatulya” többi elemétől). Ennek pontos leképezéséhez két külön neuronhálózatra van szükség. A generalizáló folyamat az agykérgi működéshez köthető, a környezet reprezentációja jelentősen átfedő sejtaktivitások révén valósul meg, így specifikus információ nem jöhet létre a hálózatban. A specifikáció a hippocampusz feladata, a környezet leképezése szinte át nem fedő mikrohálózatok kialakulásával jön létre (Káli S. és Acsády L., 2003). Vagyis a hippocampusz a deklaratív memóriában játszik szerepet, ez tartalmazza a „tiszta fogalmakat” (*clarus*³= világos). De mi az a szerkezeti különbség, ami az agykéreggel szemben képes hasonló bementekhez különböző hálózati aktivitást produkálni? A memória alapjául szolgáló Hebb-féle autoasszociatív hálózat ugyanis mind az

agykéregben, mind a hippokampuszban megtalálható. A válasz a „háromszinapszisos hurok” egyes principális sejtjeinek egyedi tulajdonságaiban, és kapcsolataiban található (Acsády és Káli, 2007). A generalizált információ az entorhinális kérgen keresztül érkezik agyunk egyik legkülönlegesebb serkentő sejtjére, a szemcsesejtre, ami a legfontosabb állomás a specifikus információ kialakításában. A szemcsesejtek nagyon erős szűrést végeznek a bejövő információn azáltal, hogy rendkívül hiperpolarizáltak, és nagyon alacsony az alapaktivitásuk. Mivel nincsenek bazális dendritjeik, és egymással sincsenek összekötve, nem jön létre autoasszociatív hálózat, a bekerülő információ nagyon pontosan képeződik le a szemcsesejtekben. A gyrus dentatus legfontosabb feladata tehát a jel szelekciója és kategorizációja. A következő lépés, hogy a szemcsesejtek a megszürt információt rendkívül pontosan adják át a CA3 piramissejteknek. Ehhez egyrészt annak a néhány célelemnek a nagyon pontos kiválasztása szükséges, ami a CA3 régióban az információt kódoló autoasszociatív mikrohálózatot létrehozza, másrészt a hálózat többi tagjának elcsendesítése. A szemcsesejt speciális, egyedi terminálisa, a mohaterminális képes ellátni mindkét feladatot egyszerre. A moharostok célelem specifikusan kétféle terminállal rendelkeznek: az óriás terminálisok kizárólag piramissejt-tüskéken, a kis terminálisok csak helyi GABAerg interneuronokon végződnek. Az egy szemcsesejt által adott óriás-mohaterminálisok száma igen kevés (százas nagyságrendű), de nagy hatékonyságú, emellett a kis mohaterminálisok száma arányait tekintve ötszörösére tehető a serkentőhöz képest (Acsády et al., 1998). Ezzel a kapcsolatrendszerrel egysejt szinten nagy hatékonyságú, pontos ingerület-átadás, populációs szinten erős gátlás érhető el a hálózatban. A két terminális fiziológiai tulajdonságaiban fellelhető különbségek további magyarázatot adnak az információkódolás szabályozására. Míg az óriásterminálisok a transzmisszió frekvenciájának növekedésével facilitáló szinaptikus választ (facilitáló EPSP) adnak, addig a kis terminálisok frekvencia-függésére a depresszív (depresszáló EPSP) vagy enyhén facilitáló válasz jellemző (Toth et al., 2000). Egy adott frekvencián a két mechanizmus eredője fogja meghatározni a CA3 piramissejt ingerületét: alacsony szemcsesejt aktivitás során (ami hálózati „zaj”-ként értékelhető) az erős gátlás dominál, míg néhány, de fokozott aktivitású szemcsesejt aktivitása (információ-kódolás) során a serkentés erősödése, és a gátlás gyengülése révén a kiválasztott piramissejtek ingerületbe jönnek (a hálózat többi piramissejtje pedig gátolt marad). A szemcsesejt-

CA3 piramissejt kapcsolat további jellemzője a nem-asszociatív preszinaptikus LTP (Lauri et al., 2001). A CA3 piramissejtek kiterjedt rekurrens kollaterálisai révén a CA3 régió autoasszociatív hálózati tulajdonsággal rendelkezik. A megszerzett specifikus információ erős szinaptikus kapcsolatokkal összekötött piramissejt-mikrohálózatokban tárolódik, ami kontextusfüggő módon, a hálózat egyes elemeinek aktivitása révén a mikrohálózat egészét aktiválhatja, így komplex emlényomok felidézése válik lehetővé. A CA1 piramissejtben ezt követően integrálódik a CA3 piramissejtek ingerülete (str. radiatum) az entorhinális kéregből érkező perforáns-pálya bemenettel (str. lacunosum-moleculare). A CA1 piramissejtek plaszticitásához (LTP kialakulása) elengedhetetlen még a helyi GABAerg interneuronok térben és időben precízen szabályozott hálózati működésre kifejtett hatása (részletesen lásd III.3.5. alfejezetben). Az így keletkező emlényomok lassú folyamat során tevődnek át a generalizáló agykérgi területekre.

Összegzésként elmondható, hogy a hippokampusz specifikus működésének hátterében egyedi strukturális felépítése áll (gyrus dentatus-CA3 kapcsolat), autoasszociatív hálózata előtt egy kategorizáló hálózat (gyrus dentatus) található. Ezek a tulajdonságok teszik képessé arra, hogy nagy számú, komplex emlényom gyors és átfedésmentes tárolását végezze.

III.3.4. A hippokampusz interneuronjai

Interneuron alatt klasszikusan azokat a nem principális (nem glutamáterg) idegsejteket értjük, melyek a helyi hálózat működésében, szabályozásában vesznek részt, és nem vetítenek más agyterületre. Jelen értekezésben hippokampális interneuron alatt kizárólag a GABAerg interneuronokat értem. E definíció nem szerencsés manapság, hiszen ma már jól ismert, hogy nemcsak a principális sejtek vetítenek más agyterületekre, hanem GABAerg „interneuronok” is, nem is elhanyagolható szerepet töltve be. Jobb nevezéktan hiányában azonban a vetítő GABAerg idegsejteket is az interneuronok közé soroljuk.

A GABAerg sejtek jelátvivő anyaga a gamma-amino-vajsav (GABA), mely néhány kivételtől (pl. az idegsejtek fejlődésének korai szakaszában, az ún. „GABA-switch” előtt a GABA serkentő tulajdonságú) eltekintve gátló neurotranszmitter. Fő feladatuk tehát a principális sejtek gátlása, tüzelési mintázatuk időbeli precíz

szabályozása (részletesen lásd III.3.5. alfejezetben). A hippokampális interneuronok – szemben a kvázi egyforma piramissejtekkel – nem alkotnak egységes populációt, a különböző alpopulációk száma ma már 20 fölé tehető (Klausberger és Somogyi, 2008; 2. ábra). Az interneuronok sokfélesége azonban nem céltalan, különböző hálózati működések szabályozásának szolgálatában állnak (Klausberger et al., 2005).

Számos anatómiai tulajdonság alkalmas lehet az interneuron alpopulációk elkülönítésére, így például a célelem specificitás, a dendritfa elágazódása a rétegekben, illetve, hogy egyes típusok jellemzően mely peptid neuromodulátorokat vagy kalcium-kötő fehérjéket fejezik ki.

A továbbiakban néhány azonos/hasonló funkció betöltésére specializálódott interneuronok csoportjainak tulajdonságait részletezem példákkal illusztrálva.

Mivel a legtöbb ismeret a CA1 régió interneuronjairól áll rendelkezésünkre, ezért a CA1 régió interneuronjait használva modellként mutatom be a fő csoportokat (2.ábra).

A továbbiakban a célelem specificitást alapul véve az alábbi csoportosítást alkalmazom:

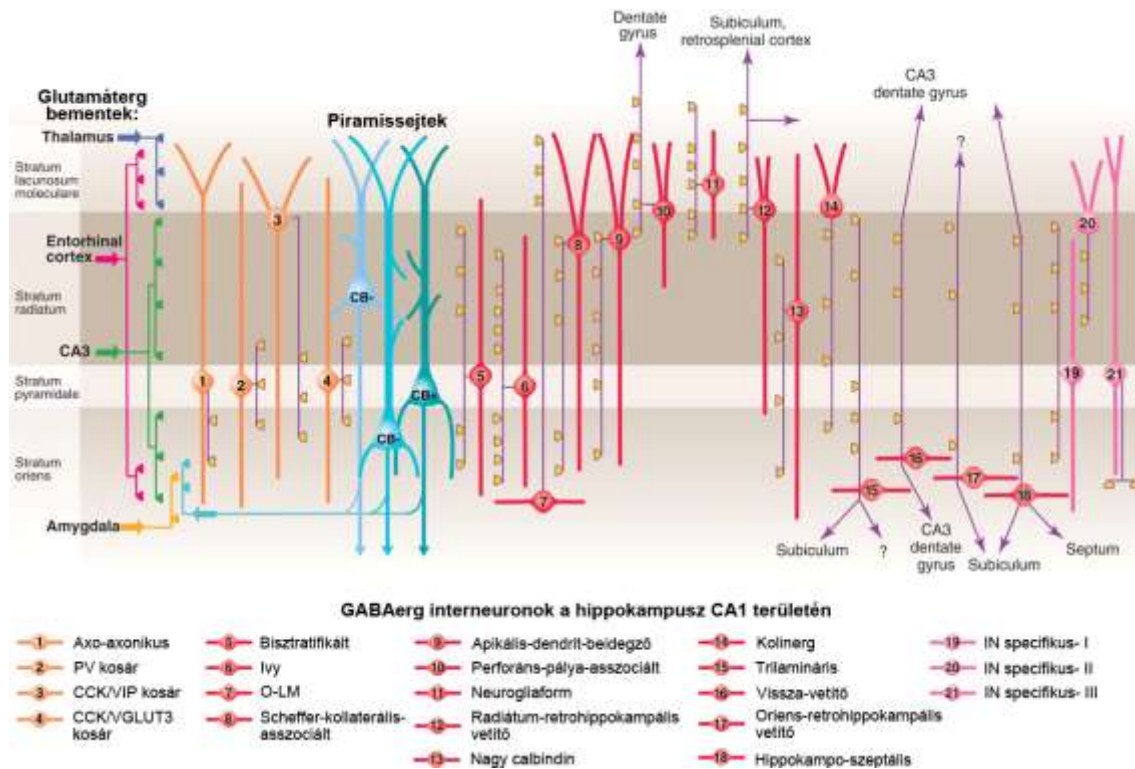
- dendritikus gátlósejtek
- periszomatikus gátlósejtek
- interneuron-specifikus interneuronok
- vetítő interneuronok

III.3.4.1. A dendritikus gátlósejtek

A dendritikus gátlósejtek közös tulajdonsága, hogy axonterminálisaik a piramissejt valamely dendritszakaszán végződnek a beérkező serkentő szinapszisok szoros szomszédságában. Ebből következtethető, hogy feladatuk elsősorban a piramissejt bemenetének szabályozása, az egyes serkentő szinapszisok plaszticitásának heteroszínaptikus befolyásolása, a feszültségfüggő kalcium-csatornák és NMDA-típusú glutamát receptorok gátlásával annak meghatározása, hogy melyik szinapszis erősödhet meg, és mely ingerület juthat el a sejttestig.

Ennek a feladatnak az ellátására egy dendritikus gátlósejt átlagosan 3-18 szinapszist ad egy piramissejt dendritfájának különböző szegmenseire, és a gátlás kisebb mértékű. Ebbe a csoportba tartoznak a 2. ábra 5-11 és 13 számmal jelölt

interneuronjai. A dendritikus gátlósejtek sokfélesége azzal magyarázható, hogy a piramisajt dendritfájának különböző szegmenseit bemenet-specifikusan innerválják, illetve saját bemenetüket eltérő forrásból kapják. E két tulajdonság alapján megkülönböztetünk ún. „feed-forward” (előreható) és „feed-back” (visszaható) gátlást. Az *előreható* gátlás esetében a gátlósejt azon rostok hatását módosítja a piramisajtben, amelyből saját bemenetét is kapja, tehát az adott afferens saját hatékonyságát saját aktivitásának függvényében szabályozza. A *visszaható* gátlás esetében a gátlósejt által kapott bemenet más forrásból származik, mint az általa módosított bemenet (Freund és Buzsáki, 1996).



2. Ábra. GABAerg interneuronok a hippocampusz CA1 régiójában

A sematikus ábrán a hippocampális CA1 régió eddig ismert interneuronjai és axonarborizációjuk rétegeloszlása látható. Az ábra bal szélén olvashatók a hippocampusz rétegei. A kék szín árnyalataival a CA1 piramisisejtek, narancssárga színnel a periszomatikus gátlósejtek, pirossal a dendritikus és vetítő interneuronok, rózsaszínnel az IN-specifikus gátlósejtek sejttestje és fő dendritjei láthatók. Lilával jelöltek az interneuron-axonok, melyek citromsárga terminálisokban végződnek. Az

ábra bal felén található a külső és belső forrásból származó glutamáterg bemenetek. Az interneuronok sokfélesége, térbeli és időbeli precíz szabályozása a piramissejt-hálózat normál működésének szolgálatában áll. (Módosítva: Klausberger és Somogyi, Science, 2008.)

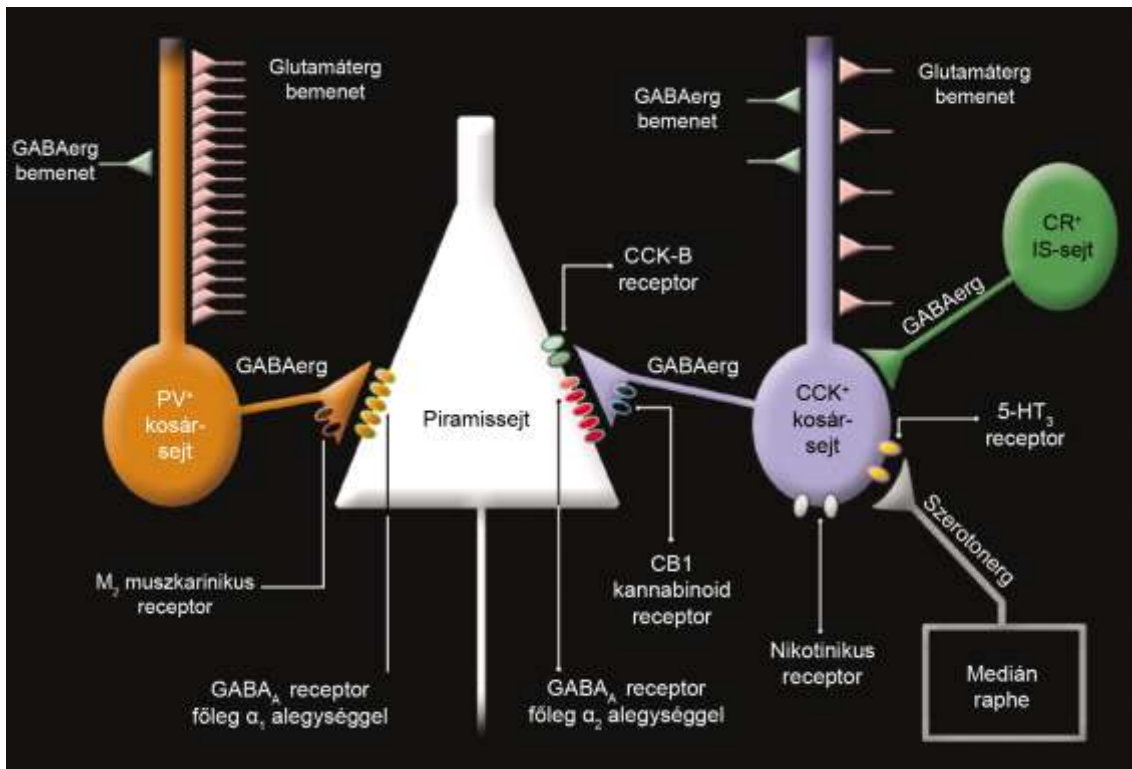
A Schaffer-kollaterális bemenettel (piramissejt bazális és proximális apikális dendritszakaszai-strata oriens és radiatum) asszociálódik – csak a legfontosabbakat kiemelve- a „bistratified” („két-réteget innerváló”, bisztratifikált sejt, 2. ábra 5 számú sejt), a Schaffer-kollaterális asszociált (SKA; emellett CCK-tartalmú) dendritikus gátlósejt (2. ábra, 8 számú sejt), valamint az „Ivy” („borostyán”)-sejt (2. ábra, 6 számú sejt). Dendriteloszlásuk alapján a bisztratifikált- és az Ivy-sejt bemenetét is a Schaffer-kollaterálisok biztosítják, így előreható gátlósejtek (Fuentealba et al., 2008; Klausberger és Somogyi, 2008).

Az entorhinális eredetű *perforáns-pálya bemenettel* (piramissejt distális apikális dendritszakasza-str. lacunosum-moleculare) asszociálódik az O-LM (Oriens-Lacunosum-Moleculare; (2. ábra, 7 számú sejt), a perforáns-pálya asszociált (2. ábra, 10 számú sejt) és a neurogliaform (2. ábra, 11 számú sejt) sejt. Míg az O-LM sejtek elsősorban a lokális piramissejtek rekurrens kollaterálisaiából kapják a bemenetet (tipikus visszaható gátlósejt), addig a másik kettő elsősorban a perforáns-pályától (előreható-gátlás). A neurogliaform sejtek nevükből következően is nagyon eltérnek a klasszikus neuronok felépítésétől, elsősorban a lassú, tónikus GABAerg transzmisszióban vesznek részt (Armstrong et al., 2012; Tamás et al., 2003), és tónikus nitrogén-monoxid felszabadítására képesek (lásd III.3.5.5.).

III.3.4.2. A periszomatikus gátlósejtek

Mivel a periszomatikus gátlás kiemelt fontossággal bír a hálózat működésében, és az értekezésben szereplő kísérletek is főként ezen sejtek szinapszisaira irányulnak, a periszomatikus gátlósejtek tulajdonságait részletesebben tárgyalom. Periszomatikus régió alatt a piramissejt sejttestét, (általában) a sejttestből kiinduló axon iniciális szegmentjét (AIS) illetve az ún. sejttest-ekvivalens dendrit szakaszokat (tüskementes proximális dendritek a sejttesttől számított ~100 mikronon belül) értjük (Megias et al.,

2001). A régió fő jellemzője, hogy serkentő bemenet nem érkezik rá, kizárólag a periszomatikus gátlósejtek innerválják szimmetrikus szinapszisokat képezve (Megias et al., 2001). Sokkal kevésbé heterogén populációt képeznek, mint a dendritikus gátlósejtek. Mivel a periszomatikus régió az akciós-potenciál generálásában játsza a fő szerepet, ezért ezek az interneuronok a piramis sejtek kimenetét, a nátrium-függő akciós potenciálok kialakulásának valószínűségét szabályozzák. Bemenetük nem asszociálódik specifikusan külön egyik afferenssel sem (a kosársejteknek kevésbé jelentős mennyiségű dendritje található a str. launosum-moleculare-ban, ami arra utal, hogy kevesebb entorhinális bemenetet kapnak.), viszont jelentős számú serkentő bemenetet kapnak a piramis sejtektől. A piramis sejt-interneuron kapcsolatra nagy amplitúdójú serkentő potenciál jellemző, ami általában egy szinapszison keresztül megy végbe (Gulyás et al., 1993).



3. Ábra. A hippocampális CA1 piramis sejtekre érkező periszomatikus gátlás felépítésének vázlata

Az ábrán a piramis sejt testjére érkező két különböző gátlósejt- a parvalbumin (PV) tartalmú és a kolecisztokinin (CCK) tartalmú kosársejt- szinapszisa, a jelátvitelben fontosabb szerepet játszó receptorai, illetve főbb bemenetei láthatók. Míg a PV+

kosársejt a piramissejt ritmikus gátlásáért tehető felelőssé, ezáltal „óramű” pontossággal segítve a neuronhálózati frekvencia kialakulását, addig a CCK+ kosársejt kéreg alatti bemeneteinek is köszönhetően a gátlás „finom hangolásában” vesz részt, belső világunknak, hangulati életünknek megfelelően. (Módosítva: Freund, TF, 2003, TINS)

Olyan nagy hatékonyságú ez a serkentő áram, hogy általában az interneuron kisüléséhez is vezet. Ebbe a csoportba tartozik az axo-axonikus – Szentágothai János nyomán kandeláber – sejt (2. ábra, 1 számú sejt) és a kosársejtek. A kandeláber-sejtek az egyetlen, specifikusan csak az axon iniciális szegmenet beidegző interneuronok, rostjaik vertikális terminális füzereket alkotnak egy-egy piramissejt axon iniciális szegmentje körül, ahol többszörösen szinaptizálnak.

A kosársejtek a sejttestet és a proximális dendritszakaszokat is beidegzik, nagy amplitúdójú gátló-potenciálokhoz hoznak létre, átlagosan 2-8 közel elhelyezkedő szinapszison keresztül. A kosársejtek ezáltal nagy hatékonysággal képesek gátolni a piramissejt akciós potenciálját. Egy kosársejt egyetlen akciós potenciálja már 3 szinapszison keresztül megakadályozza a piramissejt ismételt kisülését. Jellemző fehérjetartalmukat tekintve a kosársejtek két fő populációját, a parvalbumin (PV; 2. ábra, 2 számú sejt) és a kolecisztokinin (CCK) tartalmúakat különböztetjük meg, a kandeláber-sejtek mind PV tartalmúak. A CCK tartalmú kosársejtek tovább oszthatóak vezikuláris glutamát-transzporter 3 (vGluT3, 2. ábra, 4 számú sejt) és vazóaktív intesztinális polipeptid (VIP; 2. ábra, 3 számú sejt) tartalmuk alapján. Funkcionális különbség egyelőre nem volt kimutatható a két CCK tartalmú alpopuláció között, ezért jellemzésük együtt történik, mint CCK tartalmú kosársejtek.

A két kosársejt típus teljesen más feladatra specializálódott a neuronális hálózat szabályozását illetően, ami receptoraik és bemeneteik különbségében is tetten érhető, és eltérő fiziológiai tulajdonságokat kölcsönöz a két sejtípusnak (3. ábra) (Freund, 2003; Freund és Katona, 2007; Klausberger et al., 2005).

A PV kosársejtek transzmissziója nagyon hatékony gátlást eredményez, de egyben rigid is, kevés ponton szabályozható, nem plasztikus. A PV kosársejtek fő serkentő bemenetét a piramissejtektől kapja, még hozzá nagyrészt „előreható” serkentés formájában (a CA3 piramissejtektől, vagyis Schaffer-kollaterálisoktól), kisebb mértékben a helyi piramissejtek „visszaható” serkentése folytán. Kéregalatti

modulátoros (monoaminerg) és GABAerg bemenük jóval kevesebb. A serkentő szinapszisok fontos tulajdonsága, nem plasztikusak, a kapott ingerület pontosan közvetíti a hálózatra. A PV kosársejtek egymást is beidegzik, sőt elektromos szinapszisokkal (ún. „gap junction”-ökön keresztül) is össze vannak kapcsolva, szincíciumot alkotva. Egy PV sejt nagyjából 20-50 másik PV kosársejttel áll ilyen szoros kapcsolatban. Ennek jelentősége óriási a hálózati szinkronizáció szemponjából (részletesen lásd III.3.5. alfejezetben). A PV sejtek fiziológiai tulajdonságai részben ezeknek a tulajdonságoknak is köszönhető, ún. „gyors tüzelésű” interneuronok, a tüzelési mintázatuk nem mutat alkalmazkodást, megbízhatóan és „óramű” pontossággal tüzelnek, a hálózati frekvenciát még 100 Hz felett is képesek követni. Az időbeli precízitáshoz még hozzájárul, hogy a PV terminálisban nagyon szoros kapcsolat van a kalcium-szenzorok és a kalcium csatornák között: a kalcium csatornák a szinaptikus aktív zónában helyezkednek el, azonnali vezikula-ürülést eredményezve. A PV terminálisból történő GABA felszabadulás eddigi ismereteink alapján M_2 típusú muszkarinos acetil-kolin receptoron (mAChR) és μ -opioid receptoron keresztül szabályozható (mindkettő csökkenti a GABA felszabadulását). A PV szinapszis poszt-szinaptikus oldalán az α_1 alegység-összetételű $GABA_A$ receptorok vannak túlsúlyban, melyeken a szorongásoldó benzodiazepinek hatása kevésbé érvényesül. A PV kosársejt-szincícium feladata tehát „óramű” pontossággal szinkronizálni az általuk beidegzett 1000-2000 piramissejtet a különböző hálózati oszcillációk során. Ez alapvető fontosságú a kognitív folyamatok kialakításában (lásd még III.3.5. alfejezetben).

A *CCK kosársejtek* által létrehozott gátlás ezzel szemben sok ponton modulálható, plasztikus folyamat. Legszembetűnőbb bemeneti különbséget a kéreg alatti modulátoros innerváció adja: a belső világunkat és hangulati életünket reprezentáló szerotonerg bemenet a periszomatikus gátlósejtek közül szelektíven idegzi be a CCK tartalmúakat. A szerotonerg rostok a medián raphe magcsoportból származnak, és 5-HT₃ típusú, ionotrop szerotonin receptoron hatnak, míg a kolinerg rostok α_7 nikotinikus acetil-kolin receptoron keresztül serkentik a CCK kosársejteket. Glutamáterg bemenetük töredéke a PV kosársejtekének, annál több gátlóbementet kapnak viszont a calretitin tartalmú interneuron-specifikus sejtektől. A CCK sejtek glutamáterg bemenete nemcsak számában tér el a PV sejthez képest, de több forrásból

származó információ (CA3- Schaffer kollaterális, CA1 piramissejt-kollaterális, vagyis mind az „előreható”, mind a „visszaható” serkentés) integrációjára is képesek. Míg a PV sejt kisülését eredményezi a Schaffer-kollaterálisok ingerülete, addig a CCK sejtek számára ez az ingerület nem elegendő. A CCK kosársejtek csak akkor kerülnek ingerületbe, ha elég erős a Schaffer kollaterális bemenet ahhoz, hogy a helyi CA1 piramissejtek is aktiválódjanak, és ezek „visszaható” lokális kollaterálisai is ingerlik a CCK sejteket. A CCK sejtek nem alkotnak szincíciumot, nem jellemző rájuk az a szoros kapcsoltság, amit a PV sejteknél láttunk. Tüzelési mintázatukra a „szabályos tüzelés” jellemző, maximálisan 40-50 Hz-ig képesek követni az aktiválási frekvenciát, és akkomodálódnak, vagyis ismételt ingerlés esetén egyre ritkábban keletkeznek akciós potenciálok. A CCK kosársejtek terminálsaiban a kalcium csatornák nem a szinaptikus aktív zónában, hanem a terminális távolabbi részein helyezkednek el, ezáltal lázán kapcsolódnak a kalcium szenzorokhoz. A CCK kosársejtek szinapszisaira többszörös „felszabadulási hely” jellemző egyetlen aktív zónán belül (sokszor invagináció is megfigyelhető a szinaptikus felület növelésére), ez eredményezi, hogy a CCK sejtek GABA ürítése aszinkron módon és időben elnyújtva jelentkezik. A CCK terminálisok GABA ürítése számos receptor aktivációjával modulálható. Ezek közül kiemelendő a CB1 kannabinoid receptor, melynek aktivációja a terminális különböző mértékű elcsendesítéséhez vezet. A folyamat, melyet „depolarizáció kiváltotta gátlás-elnyomásnak” (DSI) nevezünk, retrográd úton, a piramissejt aktivációjától függően endokannabinoidok szintézisével jön létre, mely a preszinaptikus CB1 receptorok aktivációjával gátolja a kalcium csatornák működését, ezáltal a GABA felszabadulását (lásd még III.4.2.1. alfejezetben). A CCK szinapszis posztzinaptikus oldalán az α_2 alegység-összetételű $GABA_A$ receptorok vannak túlsúlyban, melyeken a benzodiazepinek szorongásoldó hatása érvényesül. Összességében elmondható, hogy a CCK kosársejtek érzelmi, motivációs és a szervezet általános állapotáról információkat hordozva a piramissejtek „finom hangolására” specializálódtak. A idegrendszer egyetlen olyan sejtje, amin konvergálnak a szorongás molekuláris kódásában résztvevő transzmitter-rendszerek és receptorok, így a hangulati élet zavaraiiban (szorongás és depresszív állapotok) kétséget kizáró szereppel bír.

A periszomatikus kosársejtek tehát a „ritmust” (PV) és a „kedélyt” (CCK) közvetítik a hálózatba (Freund, 2003; Freund és Katona, 2007).

III.3.4.3. Az interneuron-specifikus interneuronok

Az interneuron-specifikus gátlósejtek (a továbbiakban IS-sejtek) attól különlegesebbek, hogy célelemük nem a piramisesejt valamely szegmense, hanem más (jól meghatározott) interneuronok. Három típusát különböztetjük meg az IS-sejteknek (IS-1-3, 2.ábra 19-21 számú sejtjei). Az IS-1 sejtek kiterjedt szincíciumot alkotnak számos dendrodendritikus kapcsolatuk révén, ami ennek a sejtpopulációnak a gyors szinkronizálását teszi lehetővé. A dendritikus gátlás szinkronizációja révén elengedhetetlen fontossággal bírnak a dendritikus áramok és plaszticitás hatékony szabályozásában. Az IS-3 típusú sejtek szelektíven az O-LM sejtet idegzik be, diszinhibíciót téve lehetővé a piramisesejt disztális dendritszakaszain (Freund és Buzsáki, 1996). Az interneuron-szelektív interneuronoknak tehát jelentős szerepe van a hippocampális hálózat oszcillációjának és diszinhibíciójának kontrolljában (Freund és Gulyás, 1997).

III.3.4.4. A vetítő GABAerg interneuronok

Vetítő GABAerg gátlósejtek alatt a hippocampuson belül másik régióba vetítő, illetve a hippocampuson kívülre, távolra vetítő GABAerg sejteket értjük. Az előbbire példa a visszavetítő-sejt („back-projection” neuron, 2.ábra 16 számú sejt; (Sik et al., 1995; Sik et al., 1994), mely elsősorban a CA3 régióba, kisebb mértékben a gyrus dentatus hilusába vetít vissza, és a „visszaható”-gátlásban játszik szerepet. Számos boutonja található kapillárisok közvetlen környezetében, de direkt kapcsolatba nem lép az endothellel. Jellemző fehérjéje, mely immunohisztokémiai jelölésére is használható, a neuronális nitrogén-monoxid szintáz (nNOS). Utóbbi két tulajdonságából következően a hippocampális neuronhálózat homeosztatisz szabályozásában játszik szerepet (lásd még a III.3.5.5. alfejezetben).

A távolra vetítő sejtek fő célpontja a szeptális terület, a szubikulum és a retrohippokampális kéregterület. Ezek közül kiemelendő a hippocampuszeptális gátlósejt (2.ábra 18 számú sejt), melynek fő bemenete a CA1 piramisesejt kollaterálisából származik. Távoli axonjai elsősorban a mediális szeptum (PV tartalmú)

GABAerg interneuronjait innerválják (Tóth et al., 1993), míg lokális axonjai a CA1 valamennyi rétegében szétágaznak, és szelektíven interneuronokon végződnek.

Morfológiájukból következően jelentős szerepet játszanak a piramissejt-hálózat aktivitásának függvényében a helyi és a szeptális (ritmusgeneráló, ún. pacemaker) interneuronok együttes szinkronizációjában, ezáltal a hippokampális oszcillációk szabályozásában (lásd III.3.5. alfejezetben). A retrohippokampális (2. ábra 15 és 17 számú sejtjei) és szubikuláris (2. ábra 12 számú sejt) területre vetítő sejtek a CA1 piramissejtek rostjaival párhuzamosan haladnak a célterületre, és ritmikus kisüléssel követik a hippokampális oszcillációkat, melynek szerepe van a hippokampuszból az érintett területekre közvetített információ átadásában (Klausberger és Somogyi, 2008) (funkcióik az III.3.5. alfejezetben olvasható).

III.3.5. A hippokampális interneuronok szerepe a neuronhálózat működésében

A hippokampális interneuronok teljes egészében lefedik a piramissejt felszínét (lásd III.3.4. alfejezet). Az interneuronok sokféleségének, térbeli és legfőképpen időbeli rendezettségének kulcsszerepe van a kérgi hálózatok különböző agyi állapotokhoz rendelt oszcillációinak létrehozásában, és olyan komplex folyamatokban, mint az érzelmekkel színezett emléknymok tárolása és felidézése, a világ dolgainak megismerése és értékelése, valamint a kognitív viselkedés (Klausberger és Somogyi, 2008). Míg az információ hordozói jelen feltételezések szerint elsősorban a piramissejtek, az interneuronok „összefüggést adnak a tartalomnak” („context for the content”, (Freund és Buzsáki, 1996). Az interneuronok szerepet játszanak az oszcillációk kialakításában, az oszcillációk távoli agyterületekre közvetítésében, és a kapilláris hálózattal „együtműködésben” a neuronhálózat aktivitásának megfelelő anyagcsere igény kielégítésében. Mivel az oszcillációk kialakulása nem tárgya jelen dolgozatnak, csak az interneuronok szerepének megértése céljából nagyon röviden ismertetem ezeket.

A hippokampusz viselkedésfüggő elektromos aktivitásmintázatai, oszcillációi:

1. *Théta-oszcilláció*: 4-8 Hz frekvenciájú aktivitás, mely a hippokampusz „online” állapotát tükrözi, exploráció és paradox alvás alatt tapasztalható.

2. *Gamma-oszcilláció*: 30-80 Hz frekvenciájú aktivitás, két fajtáját különböztetjük meg, a „*thétába ágyazott gammát*” és az „*éles hullámot követő gammát*”.
3. *Éles-hullámú aktivitás*: 100-200 Hz frekvenciájú aktivitás, mely nyugalomban, étkezés során, és lassú hullámú alvás során figyelhető meg.

III.3.5.1. A théta oszcilláció

A théta oszcilláció szerepe egyfajta zajszűrés, a valós információ és a hálózati háttér-aktivitás szétválasztása. Kialakításában nélkülözhetetlen a mediális szeptum (továbbiakban: szeptum) mind GABAerg, mind kolinerg sejtcsoportja, melynek rostjai a hippokampuszba vetítenek. A GABAerg rostok szelektíven idegzik be a hippokampusz néhány interneuronját (Freund és Antal, 1988). Ezek közé tartoznak a calbindin tartalmú „bisztrifikált” és a szomatosztatin tartalmú O-LM dendritikus gátlósejtek, valamint a periszomatikus gátlósejtek közül a két PV tartalmú sejtcsoport, a kandeláber sejtek és PV kosársejtek. A szeptum feladata a hippokampális interneuronok ritmikus kisülésének elérése (a szeptális -PV tartalmú- GABAerg sejtek ritmusgenerátor -ún. „pacemaker”- sejtek), mely ezt követően szinkronizálja a piramis sejtek kisüléseit is (Freund és Gulyás, 1997).

A szeptohippokampális GABAerg sejtek precíz, az egyes interneuron populációkra kifejtett, időben jól meghatározott gátló hatása (a dendritikus sejteket az EC théta csúcsán, a periszomatikus sejteket az EC théta völgyében) és a fázis-előretolódás jelensége (mely valószínűleg az eCB által a CCK kosársejteken létrehozott DSI eredménye, lásd III.3.4.2. alfejezetben) révén a piramis sejt hálózatból kiemelkedik az a néhány, egymástól akár távol levő piramis sejt, ami információhordozása révén egy mikrohálózat része lesz. Ez a mikrohálózat lesz alkalmas arra, hogy a memória konszolidációja (éles-hullámok) során komplex emléknymokat tároljon.

III.3.5.2. A gamma oszcilláció

A gamma oszcilláció szerepe, hogy lehetővé tegye azt a 2-3 ms pontosságú oszcillációt, ami az LTP kialakulásához szükséges (lásd az III.6.4.1. alfejezetben). A kódoló piramis sejt a théta egy korábbi fázisában (a fázis-előretolódás révén) a CCK

tartalmú kosársejtek gátlása alól felszabadulnak, és képesek tüzelni. Ezt a néhány piramisettet, ami az információ kódolásában vesz részt tovább kell szinkronizálni, hogy megfelelő frekvencián tüzeljenek a potenciációhoz. Erre alkalmas interneuron az „óramű pontosságú” PV kosársejt, aminek gátlásától a piramisettek nem tudnak megszabadulni. Az oszcilláció a CA3 régióból indul, a CA3 piramisettek szinkron kisülését közvetlenül követi a PV interneuronok kisülése (Csicsvari et al., 2003; Hájos et al., 2004).

A gamma-oszcilláció több kéregterületen szinkron módon jelenik meg, így lehetőség nyílik a beérkező információ különböző modalitásainak együttes tárolására.

III.3.5.3. Az éles-hullámok

Pihenés és lassú hullámú alvás alatt a hippocampusban megjelenik az éles-hullám aktivitás, melynek feladata a memória konszolidációja. A CA3 piramisettek nagy frekvenciás tüzeléssorozatának („burst”) következtében jön létre, melynek kialakulásában nagy szerepe van a PV kosársejteknek. A populációs sorozatkisülésben eltérő számú piramisett vesz részt, a kialakuló mikrohálózat jelentős megerősödését hozva létre. Minél hosszabb ideig tartózkodik egy sejt az éles-hullám aktivitásban, annál jobban megerősíti a kapcsolatát a mikrohálózat többi elemével (Buzsáki, 1986). Ez teszi lehetővé komplex emléknymok különböző rész-aspektusainak együttes tárolását. A memórianyom felidézése során pedig az emlék egy kis részletéért „felelős” piramisett aktivitása hozza ingerületbe az egész mikrohálózatot. Minél erősebb a kapcsolat, annál könnyebben történik a felidézés is. A kétfázisú memória-modell alapján tehát egy hosszabb expolációs fázis (théta oszcilláció-specifikus információ begyűjtése) után a teljes információ akár egyetlen éles-hullámba tömörülve kerül eltárolásra (Buzsáki, 1989).

III.3.5.4. A távolra vetítő GABAerg neuronok szerepe az oszcillációkban

A távoli kortikális és szubkortikális területekre vetítő GABAerg interneuronok (lásd az III.3.4.4. alfejezetben) követve a hálózati mintázatot, ritmikusan tüzelnek az egyes oszcillációk alatt, ezzel hozzájárulnak a távoli területek időbeli

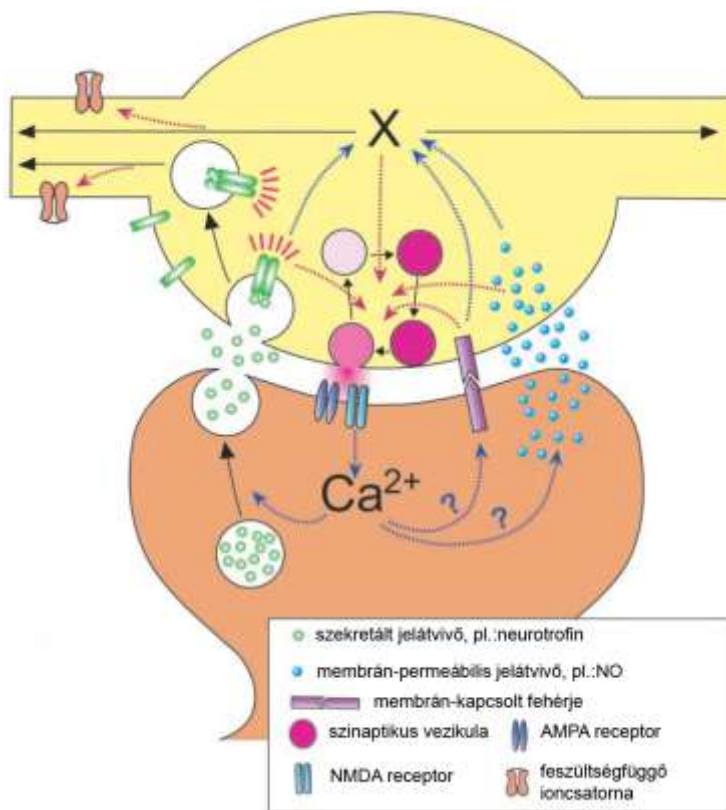
szinkronizációjához. Habár az agyterületek közötti információ-átadás a glutamáterg piramis sejtek axonjain keresztül történik, a piramis sejt-hálózat a szükséges időbeli precizitást nem képes kialakítani az agyterületek között. A vetítő GABAerg sejtek a célterület adott sejteinek aktivitását gátolva, előkészítik a hálózatot a glutamáterg rostokon keresztül érkező specifikus információ fogadására (Klausberger és Somogyi, 2008).

III.3.5.5. Homeosztatisz szabályozás

Az agyi véráramlás és a neurális aktivitás szoros kapcsolatban állnak egymással. A kommunikáció (mint a legtöbb esetben) kétirányú: a neurovaszkuláris irányban bizonyos hippokampális interneuronok közvetítik a megnövekedett hálózati aktivitást az erek felé, ami vazodilatációt, ezáltal jobb oxigén és glükóz ellátást biztosít; a vaszkuloneurális irány esetében az endothel hormonok és más molekulák felszabadításával képes befolyásolni a neuronok ingerületét (Garthwaite, 2008). A legfontosabb szabályozó molekula mindkét irányban a nitrogén-monoxid (NO). Az interneuronok közül az Ivy (borostyán), a neurogliaform és a visszavetítő sejt képes NO felszabadításra (lásd még III.3.4.1. és III.3.4.4. alfejezetben), a bennük lévő neuronális NO-szintáz (nNOS) enzimnek köszönhetően. A hálózati aktivitás függvényében- az Ivy sejt Schaffer, a neurogliaform entorhinális, a visszavetítő sejt pedig CA1 piramis sejt bemenetet kap- a felszabaduló NO egyrészt a kapillárisok vazodilatációját, másrészt a neuronok pre- és posztszinaptikus serkentetőségének lassú modulálását teszi lehetővé. A vaszkuláris oldalról az NO forrása az endotheliumban lévő endotheliális NO-szintáz (e-NOS). Az erekből felszabaduló tónikus, alacsony koncentrációjú NO (az interneuronális NO tónussal együtt) hozzájárul a serkentő sejtek LTP-jének kialakulásához. Ezt az a meglepő adat is alátámasztja, hogy annak ellenére, hogy e-NOS nincs neuronális elemekben, az e-NOS génkiütött állatban gyengült a szinaptikus plaszticitás (Garthwaite, 2008). A fent említett folyamatok során felszabaduló NO a pikomólos tartományba esik, ilyen koncentrációban az NO nem viselkedik szabadgyökként, így ezekkel a hatásaival sem kell számolni (Hall and Garthwaite, 2009; Wood et al., 2011).

III.4. A retrográd jelátvitel

Amikor kémiai szinapszisok transzmissziójáról beszélünk, általában az akciós potenciál vezérelte anterográd jelátvitelre gondolunk, vagyis a preszinaptikus sejt terminálisából felszabaduló jelátvivő molekula a szinaptikus résen keresztül a posztszinaptikus sejt receptoraihoz kötődve fejt ki a hatását. Mostanra nyilvánvalóvá vált azonban, hogy a szinaptikus információ-áramlás kétirányú: az anterográd mellett a posztszinaptikus sejt egész repertoárral rendelkezik retrográd jelátvivő molekulákból, amik a preszinaptikus sejtet befolyásolják. A retrográd jelátvitel olyan folyamatokban játszik szerepet, mint a szinapszisok kialakulása és érése a fejlődés korai szakaszában, vagy a szinapszisok plaszticitása a felnőtt állatban. Tekintettel arra, hogy jelen dolgozat a felnőtt agyban végbemenő folyamatokra koncentrál, a továbbiakban csak az utóbbi, felnőtt állatra vonatkozó általános ismervek ismertetése következik.



4. Ábra. A retrográd jelátviteli útvonalak típusainak összefoglaló vázlata

Az ábrán egy sematikus szinaptikus apparátus látható. A retrográd jelátvitel esetében a neurotranszmitter a posztszinaptikus oldalon képződik, hatását pedig a preszinaptikus oldalon fejt ki. Hatásmechanizmus alapján három formáját különíthetjük el (az ábrán

balról jobbra haladva): 1. szekréció: posztszinaptikus vezikulából történő felszabadulás (pl. neurotrofin); 2. a pre- és posztszinaptikus membrán közt létesülő membrán-kapcsolt fehérjék általi jelátvitel (pl. neuroligin-neurexin); 3. membránon szabadon átdiffundáló (membrán-permeábilis) jelátvivők (pl. nitrogén-monoxid, endokannabinoidok). A

preszinaptikus terminális folyamataiba történő beavatkozás sokrétű lehet (pl. anterográd transzmisszió befolyásolása, receptor internalizáció, stb.) Az ábrán „X” jelöli a retrográd transzmisszió távoli propagációját. (Módosítva: Tao HW és Poo M, 2001, PNAS)

III.4.1. Retrográd jelátvitel az aktivitásfüggő szinaptikus plaszticitásban

A szinaptikus plaszticitás legjobban tanulmányozott formája talán a glutamáterg szinapszisok hosszútávú potencirozódása (LTP) és depressziója (LTD). Egyes szinapszisok erősödhetnek (LTP), míg mások gyengülhetnek (LTD). Mindkét folyamatban általában mind preszinaptikus, mind posztzinaptikus változások létrejönnek. Retrográd jelátvitel szempontjából a preszinaptikus változások játszik a központi szerepet. Ilyen változás a neurotranszmitter felszabadulásának növelése/csökkentése a vezikula-felszabadulás mechanizmusába, újrahasznosításába és újratöltésébe való beavatkozással, de kialakulhat olyan jel is, ami a terminálisból a sejttest felé halad, és a szinaptikus potenciáció távoli hatásait hozza létre.

A retrográd jelátvitel három formáját különböztethetjük meg (Tao és Poo, 2001) 4. ábra):

1. retrográd jelátvitel membrán-permeábilis faktorokkal
2. retrográd jelátvitel membrán-kötött sejtkapcsoló fehérjékkel
3. retrográd jelátvitel szekretált fehérjéken keresztül

III.4.1.1. Membrán-permeábilis faktorok

Ezek közé tartozik a vérlemezke-aktiváló faktor, az arachidonsav, az endokannabinoidok, a nitrogén-monoxid és a szén-monoxid. Jelentősebb hatása (jelenlegi tudásunk szerint) az endokannabinoidoknak és a nitrogén-monoxidnak van. A nitrogén-monoxid jelátviteli rendszerének vizsgálata képezi a jelen dolgozat kísérletes eredményeinek nagy részét, ezért a nitrogén-monoxiddal kapcsolatos ismeretek tárgyalása külön fejezetben (III.5.) történik.

Az endokannabinoidok (eCB) lipid természetű jelátvivő anyagok, közös vázukat arachidonsav adja, melyre a legtöbb esetben amid-, észter- vagy éterkötéssel

kapcsolódik a molekulára specifikus csoport. Legtöbb ismeretünk a 2-arachidonil-glicerinről (2-AG) és az N-arachidonil-etanolamidról (anandamid) van. A központi idegrendszerben receptoruk a preszinaptikusan elhelyezkedő $G_{i/o}$ kapcsolt metabotróp CB1 kannabinoid receptor. A kannabinoidok a transzmitter felszabadulás gátlását hozzák létre, mely mind cAMP-függő, mind c-AMP független úton (A-típusú és „befelé egyenirányító” K^+ -csatornák aktiválásával és N- és P/Q-típusú feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornák gátlásával) megy végbe. Endokannabinoid jelátvitel rövid- és hosszútávon is képes gátolni a transzmissziót (ezen folyamatok részletes leírása az III.4.2. fejezetben történik). A hippocampusban ezekben a retrográd szabályozásokban a 2-AG szerepe bizonyított. A 2-AG teljes agonistája a CB1 receptornak, míg az anandamid csak részleges agonista, ezen kívül a hippocampusban az anandamid retrográd útvonala is megkérdőjelezhető (Nyilas et al., 2008). A 2-AG szintézise foszfolipáz C (PLC) β -függő és független úton megy végbe. A PLC β független útvonal indukciója magas posztzinaptikus kalcium felszabadulásával, diacil-glicerin (DAG) lipáz aktiválásával történik (Ca^{2+} -függő eCB szintézis). A kalcium beáramlás az extracelluláris térből, feszültségfüggő kalcium-csatornákon és/vagy NMDA-receptorokon keresztül történik. A PLC β függő útvonal alapvetően metabotropikus receptorok aktivációja révén indul. Endokannabinoid szintézist indukálnak önmagukban az I. csoportú metabotróp glutamát-receptorok (mGluR I.: mGluR1 és mGluR5), M_1/M_3 típusú muszkarinos acetil-kolin receptorok (mAChR), glukokortikoid receptorok, oxitocin és orexin-receptorok, ha elég „erőteljes” receptoraktiváció (magas koncentrációjú agonista mellett) jön létre. Minden felsorolt receptor $G_{q/11}$ -fehérje kapcsolt, és PLC β stimulációhoz vezet, így ehhez az útvonalhoz nem szükséges a sejten belüli kalcium-koncentráció emelkedése (receptor-vezérelt eCB szintézis). A PLC-függő eCB szintézis egy speciális esete, amikor a metabotróp-receptor aktivációja nem elegendő (kevés agonista) az eCB jelpálya beindításához, de egy egyidőben érkező depolarizáció (kismértékű Ca^{2+} -szint emelkedés is elegendő), ami önmagában szintén nem indukálna eCB-szintézist, együttesen képes aktiválni a szintézist (Ca^{2+} -asszisztált, receptor-vezérelt eCB szintézis). Ebben a paradigmában a PLC β koincidencia-detektornak tekinthető. A hatás szinergista, nagyobb, mint amit a két komponens „számtani összegéből” várnánk (Kano et al., 2009). Minden eCB mediálta rövid- és hosszútávú

potenciáció e három mechanizmus egyikét használja (részletesen az III.4.2. fejezetben olvasható).

III.4.1.2. Membrán-kötött sejtkapcsoló fehérjék

A sejtek átmeneti vagy tartós összeköttetéseiről a sejtadhéziós molekulák (az angol rövidítésből: CAM) tehetők felelőssé. Kalciumfüggő családjukat *kadherine*eknek, kalciumfüggetlen családjukat pedig *Immunglobulin típusú CAM-nak* nevezzük. Az idegrendszerben előbbire példa a -neuronális- N-kadherin, utóbbira a -neuronális- NCAM (Röhlich P, 2006).

Közülük számos fehérjéről bizonyították, hogy szerepe van a szinaptikus plaszticitásban így például az NCAM-ról, kadherinekről vagy a neuroligin-neurexin kapcsolatról. Az NCAM génkiütött állatban eltűnt az LTP, mind a CA1, mind a CA3 régióban. A kadherin esetében hasonló tapasztaltak, antitesttel vagy gátlópeptiddel gátolt kadherin szignifikánsan csökkentette az LTP-t, anélkül, hogy hatással lett volna az alap jelátvitelre, vagy a rövidtávú plaszticitásra. A kadherin gátlása azonban csak az LTP indukciós fázisában volt hatással, ami arra utal, hogy a kadherin a kezdeti, szignalizációs lépésben játszik szerepet. A kadherin-kadherin kapcsolat a preszinaptikus aktív zóna és a posztszinaptikus denzitás direkt strukturális újrendezését eredményezheti. LTP indukáló jelátviteli kaszkádok beindítására is képes, habár ennek sem preszinaptikus, sem posztszinaptikus mechanizmusa nem ismert (Tao és Poo, 2001).

A neuroligin-neurexin kapcsolat számos szinaptikus folyamat befolyásolására képes: differenciáció, érés, valamint mind a serkentő, mind a gátló szinapszisok plaszticitása. A neurexin a preszinaptikus, a neuroliginek a posztszinaptikus oldalon helyezkednek el (Bang és Owczarek, 2013; Bottos et al., 2011). Neuroliginek PDZ kötőhelyük segítségével kötődnek a szinaptikus horgonyzófehérjéhez (PSD-95 a glutamaterg, gefirin a GABAerg szinapszisokban). Jelenlegi ismereteink szerint a neuroligin-1 a glutamaterg, a neuroligin-2 a GABAerg, a neuroligin-3 mindkét típusú, míg a neuroligin-4 glicinerg szinapszisokban található. Számos irodalmi adat van arra, hogy a négy neuroligin fontos szerepet játszik a plaszticitásban. A neuroligin-1 az NMDA receptorok dokkolását szabályozza, hiányában a térbeli memória gyengülése

(LTP gyengülés), és sztereotip viselkedés alakult ki autisztikus tünet együttest idézve (Blundell et al., 2010; Budreck et al., 2013). A neuroligin-2 hiányában a gátló szinapszisok funkciójának gyengülése figyelhető meg, a gátló szinapszisok számának megtartásával (Blundell et al., 2009). A neuroligin-3 mutációja mindkét szinapszison hatva komplex változásokat hoz létre: a gátló szinapszisok fokozott működését okozta az agykéregben és a hippokampuszban, a serkentő szinapszisokban növelte az AMPA és NMDA receptorok számát, ezzel jelentősen erősítve az LTP-t, a szinapszisok strukturális átépüléséhez és a dendritelágazódások növekedéséhez vezetett (Etherton et al., 2011; Tabuchi et al., 2007). A neurexinek (α és β) preszinaptikusan helyezkednek el, és CASK fehérjekomplexen keresztül kötődnek a kalcium-függő vezikuláris apparátushoz, ezáltal képes befolyásolni a vezikulafelszabadulást. A neurexin-neuroligin kapcsolat képes a szinaptikus aktivitás függvényében befolyásolni a neurotranszmissziót, a szinapszis méretét és a plaszticitásban szerepet játszó receptorok dokkolását (Bang és Owczarek, 2013; Bottos et al., 2011).

III.4.1.3. Szekretált fehérjék

A szekretált molekulák közül a neurotrofinok tölthetik be a retrográd jelátvivő anyag szerepét. Legfontosabb képviselőjük, az agyi neurotrofikus faktor (BDNF) a posztzinaptikus membrán depolarizációjával, kalciumfüggő módon szekretálódik. A legtöbb neurotrofin preszinaptikusan lévő receptora útján a neurotranszmitter felszabadulás növelésén keresztül fejt ki hatását, pl. a mEPSP frekvenciájának növelésével. A BDNF hatása valószínűleg kinázok révén a szinaptikus vezikulán lévő szinapszin foszforilációjával jár, ami azonnal serkenti a glutamát felszabadulását. A BDNF genetikai eltávolításával az LTP indukciója nem ment végbe a CA1 régióban, azonban visszaállítható volt a normális működés BDNF tartalmú adenovírussal fertőzött agyszeleteken, és kívülről adagolt BDNF segítségével is (Tao és Poo, 2001).

III.4.1.4. A retrográd jelátvitel távoli hatásai

A retrográd jelátvitel lokális (monoszinaptikus) hatásain kívül, távolabbi hatásokkal is rendelkezhet. A diffúzibilis molekuláknál számításba kell venni, hogy

milyen koncentrációban, milyen távolságban tud hatni más szinapszisokon („laterális propagáció”; pl. heteroszínaptikus LTD/LTP az endokannabinoid rendszerben). Egy másik érdekes jelenség a retrográd jel preszínaptikus sejtben történő visszaterjedése („távoli propagációja”, a 4. ábrán „X” jelöléssel). A jel egészen a preszínaptikus sejt dendritjeinek szinapszisáig is terjedhet. Megfigyelték, hogy közvetlenül a korrelált tüzeléssel kiváltott LTP után a preszínaptikus sejt serkenthetősége átmenetileg jelentősen megnőtt. A távoli hatás pontos molekuláris mechanizmusa nem ismert, de mivel az időben gyorsan kialakul, feltételezhető, hogy olyan másodlagos jelátvivők játszhatnak benne szerepet, mint a kalcium, inozitol-trifoszfát (IP₃), vagy cAMP. Receptor-ligand komplexek (pl. neurotrofinok közül a NGF, BDNF) esetében retrográd axonális transzportot is leírtak (Tao és Poo, 2001).

III.4.2. Retrográd jelátvitel a hippocampusban

A hippocampális piramissejtek megfelelő működéséhez elengedhetetlen a glutamaterg és GABAerg szinapszisainak rövid- és hosszútávú plaszticitása egyaránt (lásd például III.3.5.1. alfejezetet). Ezek kialakításához a piramissejt retrográd jelátviteli útvonalakat vesz igénybe, melyek közül a membrán-permeábilis faktorok játszik a legfőbb szerepet. A glutamaterg szinapszisok hosszútávú megerősödéséhez (LTP) a nitrogén-monoxid jelpálya, míg elcsendesítéséhez az NO (LTD) és az endokannabinoid (eCB) (STD és LTD) rendszer egyaránt járul hozzá. A GABAerg szinapszisok gátlása – eddigi adatok alapján – az endokannabinoidok által szabályozódik, de csak a CCK tartalmú interneuronok szinapszisaiban. Más, a többi interneuronok szinapszisait befolyásoló retrográd transzmitter-rendszeről mindeztidáig nem volt tudomásunk. Az NO hatásainak tárgyalása külön fejezetet érdemel, tekintettel a dolgozatban betöltött központi szerepére (lásd III.5.7.2. alfejezetben).

Az eCB által létrehozott rövidtávú (másodpercekig, legfeljebb percekig tartó) gátlás (eCB-STD) közé tartozik a „depolarizáció kiváltotta gátlás/serkentés-elnyomása” (DSI/DSE), az NMDA-vezérelt eCB-STD, és a metabotróp receptorok (mGluR-I, mAChR, CCK-R) vezérelte eCB-STD. A hosszútávú (legalább egy órán át tartó) változásokhoz tartozik a serkentő és gátló szinapszisok LTD-je (eCB-LTD és eCB-LTDi) és a heteroszínaptikus moduláció.

III.4.2.1. DSI/DSE

A „depolarizáció kiváltotta gátlás/serkentés-elnyomása” (DSI/DSE) a piramis sejtek masszív depolarizációjának eredménye. Az eCB szintézise PLC-független módon, magas sejten belüli kalcium koncentráció kialakulásával indul meg (lásd III.4.1.1. alfejezetben) a piramis sejten. A kannabinoidok a preszinaptikus CB1 receptorokat aktiválva, a lehetséges másodlagos útvonalak közül (lásd III.4.1.1.) elsősorban a cAMP-független ($G_{\beta\gamma}$ -vezérelte), kation csatornákon történő direkt hatás révén hozzák létre a gyorsan kialakuló, de átmeneti gátlását a gátló/serkentő neurotranszmitternek. A DSI és a DSE nagysága eltérő, ami valószínűleg a két terminális populáció eltérő CB1 receptor mennyiségéből fakad (a GABAerg rostokon többszöröse a CB1R sűrűsége a glutamátergének, ezáltal nagyobb gátlás jön létre,) (Katona et al., 2006; Nyíri et al., 2005). Ezen kívül a DSE kialakulásához hosszabb, elnyújtott depolarizációra van szükség. A GABAerg terminálisok esetében a CB1 receptorok eloszlása kettősséget mutat, egy részük a szinapszis körüli gyűrűben sűrűsödik, másik részük a szinapszistól távol, a preterminális axon részen dúsul. Figyelembe véve a DSI során kialakuló gyors hatást, és a kálium és kalcium csatornák elhelyezkedését, valószínűsíthető, hogy a rövidtávú szabályozásban a szinapszis környéki receptorok tehetők felelőssé (Katona és Freund, 2008). A DSI mechanizmusának óriási jelentősége a piramis sejtek fázis-előretolódásában rejlik (lásd a III.3.4.2. és III.3.5.1. alfejezeteket), ami lehetővé teszi az információkódoló piramis sejtek szinapszisainak megerősödését.

III.4.2.2. NMDA-vezérelt eCB-STD

A feszültségfüggő kalcium-csatornákon kívül a feszültség- és ligand-függő NMDA-típusú glutamát receptorokon keresztül is kialakul az a magas sejten belüli kalcium koncentráció, ami eCB szintézishez vezet (PLC-független, Ca^{2+} -függő eCB szintézis). A GABAerg szinapszisokra (IPSP-re) kifejtett hatását azonban hippokampális sejt kultúrán a fiziológiás tartományon túli, extrém magas NMDA koncentrációval (200 μ M, helyileg adagolva) tudták csak megfigyelni. Élettani mennyiségű NMDA (20 μ M) adása nem okozott eCB-STD-t a GABAerg

szinapszisokban (Ohno-Shosaku et al., 2007) (Ennek jelentősége a VII.8. fejezetben olvasható).

III.4.2.3. metabotróp receptorok vezérelte eCB-STD

A metabotróp receptorok által kiváltott eCB felszabadulás a „receptor-vezérelt eCB szintézis”, esetleg a „Ca²⁺-asszisztált, receptor-vezérelt eCB szintézis” (lásd III.4.1.1.) mechanizmusával jön létre. A hippocampusz piramisneuronok eddig az mGluR5, M₁/M₃ és CCK receptorokról bizonyították, hogy képesek endokannabinoidok szintézisét indukálni. mGluR5 kiváltotta eCB-STD mind glutamaterg, mind GABAerg szinapszisokban mértek. Az mGluR5 receptorok túlnyomó többsége a glutamaterg szinapszisok periszinaptikus gyűrűjében helyezkedik el, a tüskéken kívüli szomatodendritikus régióban jelentősen csökkent a számuk, és nincsenek GABAerg szinapszisokban (Luján et al., 1997). Így valószínűsíthető, hogy az mGluR5 hatása a tüskékben homoszinaptikus, a dendritikus régióban pedig a távolabb elhelyezkedő extraszinaptikus mGluR5 receptorok fejthetik ki hatásukat a CCK-tartalmú dendritikus interneuronok terminálisain. Muszkarinos receptorok (M₁/M₃) főként a piramisneuronok dendritjein extraszinaptikusan helyezkednek el (Levey, 1996; Levey et al., 1995; Yamasaki et al., 2010), aktivációjuk eCB-függő GABAerg áramok gátlását idézték elő. Glutamaterg áramok gátlása csak sejt-kultúrában idézhető elő. CCK receptorokon keresztüli eCB szintézis csak a CCK-tartalmú interneuronok szinapszisaiban megy végbe, és hasonlóan a többi folyamathoz, a GABAerg áramok eCB-STD hatását hozza létre.

III.4.2.4. eCB-LTD/LTDi, heteroszínaptikus moduláció

A hosszútávú gátláshoz a CB1 receptorok perceken át tartó aktivációja szükséges. Mechanizmusát tekintve „receptor-vezérelt eCB szintézis”-sel jön létre. Kísérletes adatok alapján a hippocampuszban mGluR5 aktivációja indítja be, poszt-szinaptikus kalcium nem szükséges a kialakulásához. Ennek ellenére valószínűsíthető, hogy fiziológiai körülmények között az mGluR5 aktivációja mellett a glutamát transzmisszió helyi kalcium emelkedéssel is jár, ami „Ca²⁺-asszisztált,

receptor-vezérelt eCB szintézis"-hez vezet. Kimutatták azt is, hogy az LTDi esetében a Schaffer-kollaterálisok ingerlése következtében aktiválódó mGluR5 receptorok heteroszínaptikusan gátolták a CB1 receptorral rendelkező GABAerg terminálisokat (Chevalyere és Castillo, 2003). Heteroszínaptikusan valószínűleg nem a szinapszis körüli, hanem a preterminális axon közeli CB1 receptorok aktiválódnak, könnyebb hozzáférhetőségük miatt (Nyíri et al., 2005). A heteroszínaptikus szabályozás egy másik formája, amikor is a gátló szinapszisban kialakult LTD közvetett módon közeli glutamáterg szinapszisok megerősödéséhez (LTP) vezet, mivel a gátlás megszűnésével már küszöb-alatti ingerekkel is potenciáció érhető el. A CB1 receptorok hosszú aktivációja beindítja a $G_{\alpha i}$ útvonalat is, ami az „adenilát-cikláz-cAMP-protein-kináz A” jelátvitel gátlását eredményezi, ezen keresztül pedig egy preszinaptikus aktív zóna fehérje (RIM-1 α) hosszútávú gátlását hozza magával a GABAerg szinapszisokban, és a P/Q típusú feszültség-függő kalcium-csatornák permanens gátlását a serkentő szinapszisokban (Katona és Freund, 2008).

A heteroszínaptikus moduláció kapcsán látható, hogy az eCB jel térben terjed, ritkán szorítkozik egyetlen szinapszis szabályozására (még a receptor-mediált esetben is). Kimérték, hogy két egymáshoz közeli piramisneuron esetében akkor terjedt át a DSI a nem depolarizált sejtire, ha a sejttestek távolsága kevesebb, mint 20 mikron (Ohno-Shosaku et al., 2000; Wilson és Nicoll, 2001).

Összegzésként elmondható, hogy az endokannabinoid jelátvitel általánosan elérhető a glutamáterg szinapszisok számára, míg a GABAerg szinapszisok esetében kizárólag a CCK tartalmú interneuronokra korlátozódik. Az endokannabinoid jelátvitel sok esetben nem igényeli a preszinaptikus sejt aktivitását, a posztzinaptikus sejt ingerülete önmagában is elegendő a folyamat beindításához, míg más esetekben (főként a glutamátergeknél) a pre- és posztzinaptikus aktivitás koincidenciája szükséges. Az endokannabinoid jel általában nem szinapszis-specifikus, hatótávolsága ~20 mikronra tehető. Ezek alapján felmerül tehát a kérdés, hogy létezik-e egy másik, általánosan több interneuron számára is elérhető retrográd szabályozás, létezik-e szinapszis-specifikus retrográd szabályozórendszer, és létrejöhet-e a GABAerg szinapszisok potenciációja a gátlással szemben?

III.5. Nitrogén-monoxid, mint neurotranszmitter

A nitrogén-monoxid (NO) megfelel a neurotranszmitterektől elvárt kritériumoknak, azaz:

1. rendelkezik szintetizáló apparátussal
2. szintézise szabályozható
3. felszabadulását követően képes eljutni a szinapszist alkotó másik sejthez (anterográd esetben a posztzinaptikus-, retrográd esetben a preszinaptikus-sejthez)
4. rendelkezik receptorral
5. rendelkezik a jelátvitel időbeli leállításához vezető folyamattal
6. másodlagos jelátviteli útvonal(ak)at indít be a fogadó sejtben, valamely hatást eredményezve.

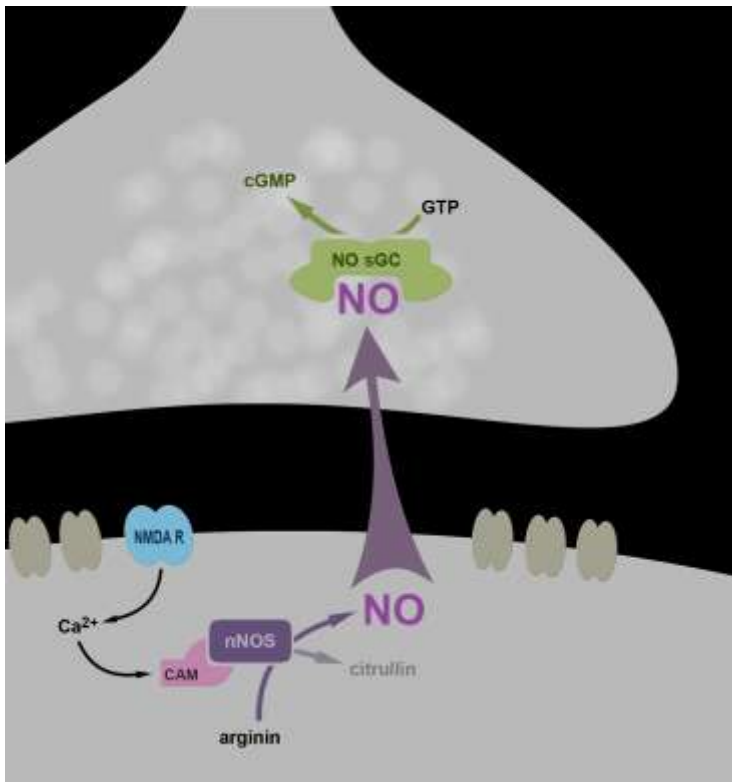
Ezen pontok mentén haladva mutatom be a NO jelátvitelt a központi idegrendszerben, majd részletezem eddig ismert fiziológiai hatásait.

III.5.1. A nitrogén-monoxid szintézise, nitrogén-monoxid szintázok

A nitrogén-monoxid (NO) szintézisét kizárólag a nitrogén-monoxid-szintázok (NOS) végzik. Két konstitutív izoformája az enzimnek a neuronális NOS (nNOS) és az endotheliális NOS (eNOS), míg indukálható formája (iNOS) immunsejtekben (makrofágok, mikroglia) található, és csak patológias esetekben aktiválódik, így ez utóbbit a továbbiakban nem részletezem (Förstermann et al., 1991).

Az nNOS és eNOS celluláris és subcelluláris eloszlását illetően a '90-es években támadt némi zavar a szakirodalomban. Több csoport eredményei azt mutatták, hogy eNOS neuronális elemekben is, a hippokampuszt nézve a piramissejtekben található, míg az interneuronok egyes típusai pedig nNOS-t fejeznének ki. Ezek a kísérletek még különböző specificitású gátlószereken és nem megfelelően tesztelt antitestekkel végzett immunreakciókon alapultak, de a génkiütött állatok megjelenésével (nNOS és eNOS KO) a 2000-es évek elejére megoldódott a probléma. nNOS kizárólag neuronális sejtekben található (mind piramissejtekben, mind interneuronokban), az eNOS pedig az

erek endothél-sejtjeire korlátozódik (Blackshaw et al., 2003; Jinno és Kosaka, 2002, 2004). Az endotheliális NO szerepét a neuronhálózat működésében már korábban ismertettem (lásd III.3.5.5. alfejezet), a továbbiakban kizárólag a neuronális eredetű NO-val és NO-szintázsal kapcsolatos adatokat tárgyalom. Az nNOS három átíródás utáni hasítási (splice) változattal rendelkezik, az nNOS α a legszélesebb körben elterjedt és legnagyobb mennyiségben megtalálható izoforma, a β és γ izoformák esetében hiányzik a fehérje N-terminális horgonyzó doménje.



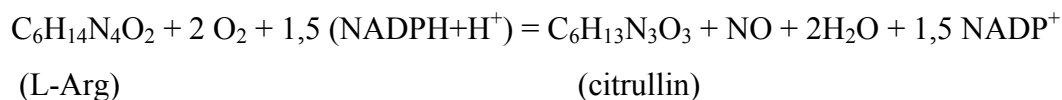
5. Ábra. A nitrogén-monoxid retrográd jelátviteli útvo-nalában szerepet játszó főbb alkotóelemek sematikus ábrája

Az ábrán egy szinapszis sematikus vázlata látható. A posztszinaptikus aktív zónában helyezkednek el az NMDA receptorok, melyeket PDZ doménnel rendelkező horgonyzó fehérjék (pl. PSD-95) kapcsolják össze a membrán alatt található nNOS molekulákkal. Az

nNOS Ca^{2+} -kalmodulinnal történő aktivációjával jön létre a nitrogén-monoxid (NO) termelés. Az NO membrán-permeábilis tulajdonsága folytán szabadon átdiffundál a preszinaptikus terminálisba, ahol receptorán, az NO-szenzitív guanilát-ciklázon (NOsGC-én) hatva cGMP termeléshez vezet.

Az nNOS γ -nak nincs enzimatis aktivitása, az nNOS β enzim rendelkezik némi aktivitással, de ennek csak az nNOS α hiányában van jelentősége, mert ekkor jelentősen megnő az agykéregben a szintje (Garthwaite, 2008). Az nNOS α (továbbiakban: nNOS) dimer formában van jelen, mivel azonban minden nNOS molekulához egy Ca^{2+} -kalmodulin is kötődik aktív állapotában, tulajdonképpen tetramer szerkezet jön létre

(Alderton et al., 2001; Stuehr et al., 2004). Az nNOS N-terminális doménje az ún. horgonyzó (PDZ-kötőhelyekkel rendelkező) domén, mely horgonyzó fehérjéken keresztül az nNOS kötődését teszi lehetővé a serkentő szinapszisok posztzinaptikus aktív zónához (5. ábra, Tochio et al., 2000). Ilyen horgonyzó fehérje a PSD-95 (posztzinaptikus denzitás fehérje-95), GRIP1 (glutamát receptorral kölcsönható fehérje 1) vagy az SSCAM (szinaptikus állványozó molekula) (Brenman et al., 1996; Daff, 2010). Ezek a horgonyzó fehérjék kötik a glutamát-receptorokat is az aktív zónába, így egy nagy makromolekuláris komplex („transzduciszóma”) alakul ki a gyors jelátvitel szolgálatában. Az nNOS középső doménje az ún. „oxigenáz” domén, mely köti a protoporfirin IX (hem) és tetrahidrobiopterin (THB vagy BH₄) kofaktorokat és a szubsztát L-arginint. A C-terminális domén az ún. „reduktáz” domén, mely tartalmazza az allostérikus aktivátor, Ca²⁺-kaldmodulin kötőhelyét, valamint az elektrontranszportlánc elemeit: egy NADPH-t, egy FAD-ot és két FMN-ot. Az NO szintézise két lépésben zajlik: az elektron donor a NADPH+H⁺, mely Ca²⁺-kaldmodulin jelenlétében átadja az elekelektronokat a FAD-FMN redox-láncnak a reduktáz doménon belül, majd az FMN-ről átkerül az elektron az oxigenáz domén hem vas-ionjára (ferro→ferri átalakulás), majd a végső elektrontranszport során egy oxigén molekula segítségével az L-arginin pozitív töltésű guanidil-csoportjának egyik nitrogénje hidroxilálódik, és N-hidroxi-L-arginin (NHA) átmeneti termék és egy vízmolekula keletkezik. A második lépésben még egy oxigén molekula és elektron segítségével kialakul a citrullin karboxi-csoportja, felszabadul a NO, és még egy vízmolekula keletkezik (Alderton et al., 2001; Daff, 2010; Stuehr et al., 2004). Egy egyenletben írva (1 mol nitrogén-monoxidra számolva):



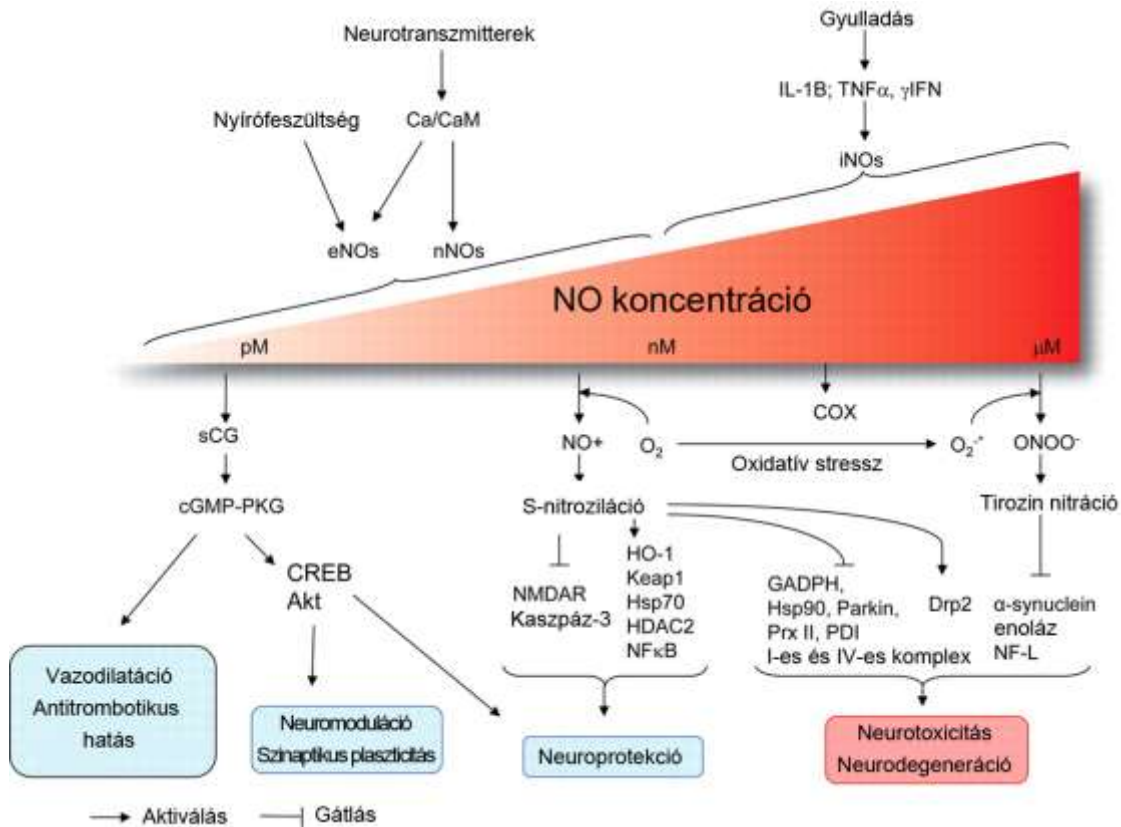
III.5.2. A nitrogén-monoxid szintézisének szabályozása

Az NO szintézishez szükséges oxigén miatt az nNOS O₂-érzékenysége még a fiziológiás O₂ koncentráció mellett is jelentősen kihat a keletkező nitrogén-monoxid mennyiségére (az agyi [O₂]_~20 μM, az nNOS O₂-függése: K_m= 350μM). Ennek

kísérletes körülmények között hatalmas a jelentősége, amikor fiziológias NO hatásokat szeretnénk mérni, ugyanis a fiziológias (in vitro) túlélő szeletek karbogén gázzal történő O_2 ellátása során $210\mu M-1mM [O_2]$ jön létre, ráadásul oxigén grádienssel kell számolni a szelet mélyebb rétegei felé haladva. Ezekben a kísérletekben akár tízszeres mennyiségű NO is keletkezhet a fiziológiához képest, amit általában nem vesznek figyelembe az eredmények értékelésénél (Hall és Garthwaite, 2009). A szintézishez szintén elengedhetetlen a Ca^{2+} -kalmodulin jelenléte (Bredt and Snyder, 1990; Lee and Stull, 1998). Az nNOS kalcium-függése: $K_m \approx 0,5 \mu M$. Ehhez helyileg („kompartimentben”) felszabaduló nagyobb kalcium is elegendő, nem szükséges sejtszintű depolarizáció, azonban kimutatták, hogy az nNOS aktivációjához szükséges kalcium extracelluláris forrásból származik (Alagarsamy et al., 1994). Így a kalciumforrásként csak a feszültség-függő kalcium-csatornák és az NMDA-típusú glutamát receptorok jönnek szóba. A glutamáterg szinapszisok posztzinaptikus aktív zónájában az NMDA receptorok, az nNOS és egyéb strukturális fehérjék makromolekuláris komplexet alkotva, lehetővé teszik, hogy az NMDA receptorokon keresztül beáramló kalcium azonnal nNOS aktivációt indukáljon (5. ábra). Minden egyes NMDA-receptor egy nNOS molekulával van összekötve. Az nNOS számos foszforilációs helyel is rendelkezik, aminek köszönhetően kinázok szabályozhatják aktivitását. A teljesség igénye nélkül ilyen kináz pl. a Ca^{2+} -kalmodulin-dependens kináz II (CAMKII), ami mint egy visszacsatoló mechanizmus mintegy felére képes csökkenteni az nNOS aktivitását.

III.5.3. A nitrogén-monoxid kémiai tulajdonságai, koncentrációja

Az NO gáz halmazállapotú molekula, speciális tulajdonsága a többi neurotranszmitterhez képest, hogy szabadon diffundál vizes és lipid fázisban is, kiváló a membránpermeabilitása, tehát szintézisét követően mind pre-, mind posztzinaptikus hatásait figyelembe kell venni. Diffúziója meglepően gyors, becslések szerint a szöveti diffúziós koefficiense $848\mu m^2/s$, vagyis egy átlagos NO molekula $\sim 0,8 \mu m$ -t tudna megtenni $100 \mu s$ alatt (Hall és Garthwaite, 2009). Szerkezete alapján nagyon reakcióképes, mégis kémiai tulajdonságai nagyban függenek koncentrációjától.



6. Ábra. A nitrogén-monoxid hatásai a koncentráció függvényében

A konstitutív módon működő NO szintázok – endoteliális (eNOS) és neuronális (nNOS) – esetében a felszabaduló nitrogén-monoxid (NO) a pikomólos tartományba esik, mely tartományban az NO nem viselkedik szabad gyökként, csak pozitív hatásai figyelhetők meg. A patológiás körülmények közt aktiválódó indukálható NO szintáz (iNOS) esetében az NO koncentrációja a mikromólos tartományig nyúlik, így reaktív oxigén-gyökként (ROS) viselkedve sejtkárosító hatásai kerülnek előtérbe. (Módosítva: Eduardo és mtsai., 2011)

Az NO viselkedésének koncentrációfüggését a 6. ábra mutatja be. Míg patológiás körülmények között az indukálható NOS nitrogén-monoxid termelése eléri mikomólos tartományt, és reaktív oxigéngyökként (ROS) viselkedve a toxikus hatásai kerülnek előtérbe, addig az utóbbi évek legfontosabb felfedezése e téren, hogy a fiziológiás körülmények között neurotranszmisszió révén felszabaduló NO pikomólos (legfeljebb 1nM) tartományba esik (Hall és Garthwaite, 2009; Wood et al., 2011). A nagy nehézségét az adja a szöveti NO-koncentráció mérésének, hogy a mérőelektródák

nem voltak elég specifikusak, ezért jóval nagyobb koncentrációk merültek fel a szakirodalomban. Egy új fejlesztésnek köszönhetően most már pontosabban mérhető az NO mennyisége. Ezen kívül egy számítógépes modell is napvilágot látott, amiben egy glutamáterg szinapszist modellezve határozták meg a maximálisan felszabaduló NO mennyiségét. Egy 50 NMDA-R/nNOS komplexet tartalmazó szinapszist vettek alapul (ami szám kicsit túlbecsült, Kennedy, 2000), és azt az extrém helyzetet feltételezték, hogy az összes receptor és enzim egyszerre, teljes hatékonysággal aktiválódik. Ennek eredményeképpen a szinaptikus NO koncentrációja 1 nM lett, ami a szöveti és enzimátikus elnyelődést figyelembe véve 1 μ m távolságban 250 pM alá csökken. Ebben a tartományban az NO reaktív szabadgyök tulajdonsága elhanyagolható mértékű, semleges molekulaként viselkedik (Hall és Garthwaite, 2009). A szakirodalomban fellelhető többszáz nanomólóstól mikromólósig terjedő NO koncentráció mellett (pl. NO donorokkal) mért „fiziológiai” hatásokat körültekintéssel kell kezelni. Egy másik fontos következtetés a fent leírtakból, hogy a központi idegrendszerben nem állja meg a helyét a NO „térfogati-transzmisszió”-jának az elmélete, mivel az NO hatótávolsága jóval kisebb (max. 1-2 μ m), mint korábban gondolták és valójában szinapszis specifikus szabályozást tesz lehetővé.

III.5.4. A nitrogén-monoxid receptorai, NO-szenzitív guanilát-ciklázok

Az NO receptora a korábban szolubilis guanilát-cikláznak (sGC) nevezett enzim. Az elnevezés azért nem volt szerencsés, mert az enzim nem minden formája „szolubilis”, ezért az új nevezéktan szerint NO-szenzitív-guanilát-cikláznak (NOsGC) nevezzük, megkülönböztetve a partikuláris GC-től, ami az NO-inszenzitív GC nevet kapta, tekintettel arra, hogy az NO nem, csak a pitvari natriuretikus peptid (ANP) ligand aktiválja (Kobialka and Gorczyca, 2000). Az NOsGC az NO fő receptora (5. ábra). Heterodimer formában alkot funkcionális egységet, melyben egy α - és egy β - alegység vesz részt (Koesling et al., 2004; Krumenacker et al., 2004; Russwurm és Koesling, 2002; Russwurm et al., 2001). Az α -alegység két fajtája az α_1 és az α_2 . Kinetikájukban semmilyen különbség nem igazolható, egyetlen ismert fontos tulajdonsága az α_2 alegységnek az α_1 -hez képest, hogy PDZ-kötő doménnel rendelkezik, ezáltal képes szinaptikus horgonyzó fehérjékhez kötődni (membrán-asszociált NOsGC), míg az α_1

tartalmú receptorok ennek hiányában, valóban „szolubilisek” maradnak. A β -alegység is két formában, β_1 és β_2 alegységként létezik. A β_2 -alegység azonban csak patológias állapotokban jelenik meg (pl. bélrendszeri daganatokban a bélhámsejtekben), ezért az NOsGC állandó alegysége a β_1 alegység. A β_1 alegység génjének kiütése letális fenotípust eredményez (Friebe et al., 2007), míg csak az α_1 vagy α_2 alegységek kiütése nem okoz letalitást (Mergia et al., 2006).

Kétféle heterodimer létezik tehát az agyban, az $\alpha_1\beta_1$ és az $\alpha_2\beta_1$ alegység összetételű receptor. A receptor-dimernek három doménjét különböztetjük meg: a hemkötő domént, a dimerizációs domént és a katalitikus domént. A hemkötő domén egy ugyanolyan hemcsoportot tartalmaz, ami a hemoglobin molekulában az oxigénkötésért felelős, mégis ahogy a hem-csoport beépül a receptorba rendkívüli specificitása lesz a nitrogén-monoxidra (10000-szer nagyobb az affinitása). A katalitikus domén felelős a $GTP \rightarrow cGMP$ átalakításért. Inaktív állapotban a hem-csoport egy hisztidinnel kapcsolódik a fehérjéhez, a katalitikus egység pedig nyitott állapotban van. Az NO kötődésének hatására a hisztidin-csoport elmozdul, ami konformációs változásokat idéz elő a fehérjeszerkezetben, ami végül a katalitikus egység záródásához és a cGMP szintézis beindulásához vezet. Az NO kötődését követően késés nélkül, azonnal elindul a guanilát-cikláz aktivitás, az NO eltávolításával pedig 200 ms-on belül lecseng a cGMP termelés (Bellamy et al., 2000). Az NOsGC 50%-os aktivitása ~ 1 nM NO koncentráció mellett érhető el. Eszerint fiziológias körülmények közt az NOsGC szubmaximális határfokon működik, mégis jelentős hatások mérhetők. Ez arra vezethető vissza, hogy az NOsGC sokszorosára erősíti a jelet. Mérések alapján az enzimet átlagosan elérő 0,3 nM NO mintegy $0,4\mu M$ cGMP szintézishez vezet, vagyis 1000-szeresére erősödik a jelátvivő molekulák száma. Az NOsGC olyan érzékenységgű, hogy már pár molekula NO (kis pikomólos mennyiségben) is képes kiváltani az aktivitását, és az amplifikáció miatt a másodlagos jelátviteli útvonalakat is be tudja indítani (Garthwaite, 2008). A receptor alegységek sejtszintű elhelyezkedését a hippocampusban mRNS és fehérje szinten vizsgálták, a β_1 alegységet mind interneuronokban, mind piramisisejtekben, az α alegységeket pedig az α_1 és α_2 különválasztása nélkül, hasonló sejtes eloszlásban mutatták ki (Burgunder és Cheung, 1994; Ding et al., 2004; Gibb and Garthwaite, 2001; Pifarré et al., 2007). Szubcelluláris szinten az NOsGC elsősorban a glutamáterg szinapszisok preszinaptikus aktív zónájában helyezkedik el (Burette et al., 2002). Az

NOsGC számos kináz foszforilációs célpontjai, de fiziológiás szabályozásuk nagy része még felderítésre vár. Ismert a cAMP-függő protien kináz (PKA) guanilát-cikláz aktivitásra kifejtett növelő hatása, és az M₂ muszkarinos AchR Src-kinázon keresztüli gátló hatása.

III.5.5. A nitrogén-monoxid terjedésének leállítása, szöveti elnyelődése

Korábban sokan azzal érveltek, hogy az NO-nak nincs szüksége lebontó folyamatokra, hiszen reaktivitásából következően úgyszólván rövid időn belül véges a hatása. A nanomólos és kisebb tartományokban, amit most fiziológiásnak tekintenek, mint már említettem, az NO határozottan nem reaktív, így ezzel a kérdéssel foglalkozni kell. Egyetlen ismert reakciója van az alacsony koncentrációjú NO-nak is ROS termékkel (kémiai NO-elnyelődés), de az is jótékony hatású: a lipid-peroxyl gyökök megkötésével megállítja a lipid-peroxidációt. Az NO enzimatis elnyelődésének egyik ismert eleme az oxi-hemoglobin, mely NO hatására nitrát képződése mellett methemoglobinná alakul. A folyamat nagyon gyors, de az erek távolsága miatt az NO fél-életideje ~1 s alakulna, míg a valóságban ennél sokkal hamarabb lecseng az NO-jel (agyszövetben 6-60 ms alatt, (Garthwaite, 2008)). Mostanság látott napvilágot, hogy a piramissejtek is tartalmaznak hemoglobint, de ennek szerepe és jelentősége az NO megkötésében még nem tisztázott (Schelshorn et al., 2009). Ezen kívül az agyszövet olyan fehérjéit hozták még összefüggésbe az NO megkötésével, mint a lipooxygenáz (LOX), prosztaglandin-H szintáz, vagy a citokróm-c oxidáz, illetve egyéb metalloproteinek. A pontos mechanizmus, amelyen keresztül ezekkel az enzimekkel az NO reagálna, nem egyértelmű (Hall és Garthwaite, 2009).

III.5.6. NO indukálta másodlagos jelátviteli útvonalak

Az NOsGC a hippokampális neuronokban az egyetlen enzim, ami cGMP termelésre képes, így a keletkező neuronális cGMP az NO hatásának a következménye (5. ábra). A cGMP ezt követően több másodlagos jelátviteli útvonalat aktiválhat. A cGMP direkt hatást fejt ki a ciklikus nukleotid-függő ioncsatornákra (CNG), vagy a hiperpolarizáció-aktiválta ciklikus nukleotid-modulálta csatornákra (HCN). A

legszélesebb körű hatás a cGMP-függő protein kinázon (PKG) keresztül történik. A PKG enzimek közül a PKG1 β és a PKG II található meg a hippocampusban (de Vente et al., 2001; Feil et al., 2005; Kleppisch et al., 1999). A PKG szubsztrátjai közé tartoznak preszinaptikusan a vezikula felszabadulásban szerepet játszó fehérjék közül a VASP, RhoA és septin3, posztzinaptikusan az LTP és a sejt „túlélését hordozó jel” kialakításában részt vevő IP₃R, protein-foszfataz 1, 2 (PP1,2), CREB, Akt stb. (Hardingham és Bading, 2003; Schlossmann és Hofmann, 2005). A cGMP visszahat saját lebontóenzimjeire is, a foszfodiészteráz (PDE) 2 és 5 aktivitásának fokozásával saját lebontását gyorsítja, míg a PDE3 gátlásával a cAMP hidrolízisét lassítja, növelve a cAMP szintjét. A cAMP-cGMP arányok eltolása újabb szabályozási útvonalakat nyit meg. A cGMP lebontásában a PDE 1,2,3,5,6,9,10 és 11 vehet részt (Domek-Lopacińska és Strosznajder, 2005; Van Staveren et al., 2003). A másodlagos útvonalak hatása minden esetben attól függ, hogy az adott terminálist populációban a repertoár mely elemei vannak jelen. Terminálistól függően ezen adatok jó része azonban még nem áll rendelkezésre a szakirodalomban.

III.5.7. A NO fiziológiai hatásai

Mivel az NO rendkívül gyorsan, szabadon diffundál kis távolságra, pre-és posztzinaptikus hatásait egyaránt figyelembe kell venni, így a jelátvitel fő meghatározója a felszabadulás pontos helye, illetve a receptor szubcelluláris elhelyezkedése. A NO központi idegrendszerben, azon belül is elsősorban a retrográd jelátvitelben betöltött szerepéről esik majd szó, de nem kevésbé fontos a NO környéki (autonóm) idegrendszerben betöltött anterográd jelátvitelének szerepe sem (Blottner, 1999).

III.5.7.1. nNOS tartalmú interneuronok a hippocampusban és szerepük a neuronhálózat működésében

nNOS tartalmú interneuronok közé tartozik a dendritikus gátlósejtek közül az Ivy és a neurogliaform sejt, valamint a vetítő gátlósejtek közül a visszavetítő-sejt.

Morfológiájuk a III.3.4.1. és III.3.4.4. alfejezetben, a neuronhálózat működésében betöltött homeosztatisz szerepük pedig a III.3.5.5. alfejezetben került tárgyalásra.

III.5.7.2. Az NO jelátvitel szerepe a glutamáterg szinapszisok plaszticitásában

A nitrogén-monoxid a szinaptikus plaszticitás számos molekuláris mechanizmusában részt vesz, beleértve a hosszútávú megerősödést (long-term potentiation, LTP) és a hosszútávú szinaptikus gyengülést (long-term depression, LTD), ezáltal képes lehet befolyásolni a tanulási és memóriafolyamatokat (Bon és Garthwaite, 2003; Doyle et al., 1996; Edwards és Rickard, 2007; Hawkins et al., 1998; Prast és Philippu, 2001). Ezen folyamatok neuronális céleleme a hippocampális piramissejtek hálózata. A központi idegrendszerben a nitrogén-monoxid hatása általánosan a glutamáterg szinapszisok retrogád jelátviteléhez köthető, amikor is az NO a posztszinaptikus oldalon képződik, és a preszinaptikus neurotranszmitter felszabadulást szabályozza. A szinaptikus plaszticitás kialakulása során a legtöbb esetben pre- és posztszinaptikus változások is végbemennek, és az NO adott agyterülettől és sejtípustól függően mindkét folyamatban részt vehet. Tovább bonyolítja a helyzetet, hogy a központi idegrendszerben az eltérő szinapszisokban rendelkezésre álló különböző effektor-rendszerek és szabályozások miatt ugyanaz az NO-jel ellentétes hatást válthat ki. Például a kiagyban az NO cGMP-PKG1 α útvonalon az AMPA-receptorok hosszútávú foszforilációját idézi elő, ami endocitózisukhoz, ezáltal posztszinaptikus LTD-hez vezet. Ezzel szemben a hippocampusban az NO-cGMP-PKGII útvonalon keresztül az AMPA receptorok és horgonyzó fehérjék foszforilációja a szinapszis strukturális átalakulásához és az AMPA receptorok szinapszisba építéséhez vezet, ami nagyobb amplitúdójú glutamáterg áramokhoz, következésképp posztszinaptikus (NMDAR-függő) LTP kialakulásához vezet. A hippocampális piramissejtekben a posztszinaptikus LTP hosszútávú fenntartásához génexpressziós változások is szükségesek, mely a CREB (“cAMP response element binding protein”) transzkripció faktor PKG-n keresztüli foszforiláció révén valósul meg. Az NO preszinaptikus hatásait szintén kettősség uralja. A hippocampális NMDAR-függő LTP során a preszinaptikus NO-PKG útvonalon a preszinaptikus aktív zóna strukturális felépítésében részt vevő fehérjék (VASP, RhoA) és a kalcium-csatornák modulációja a glutamát felszabadulás

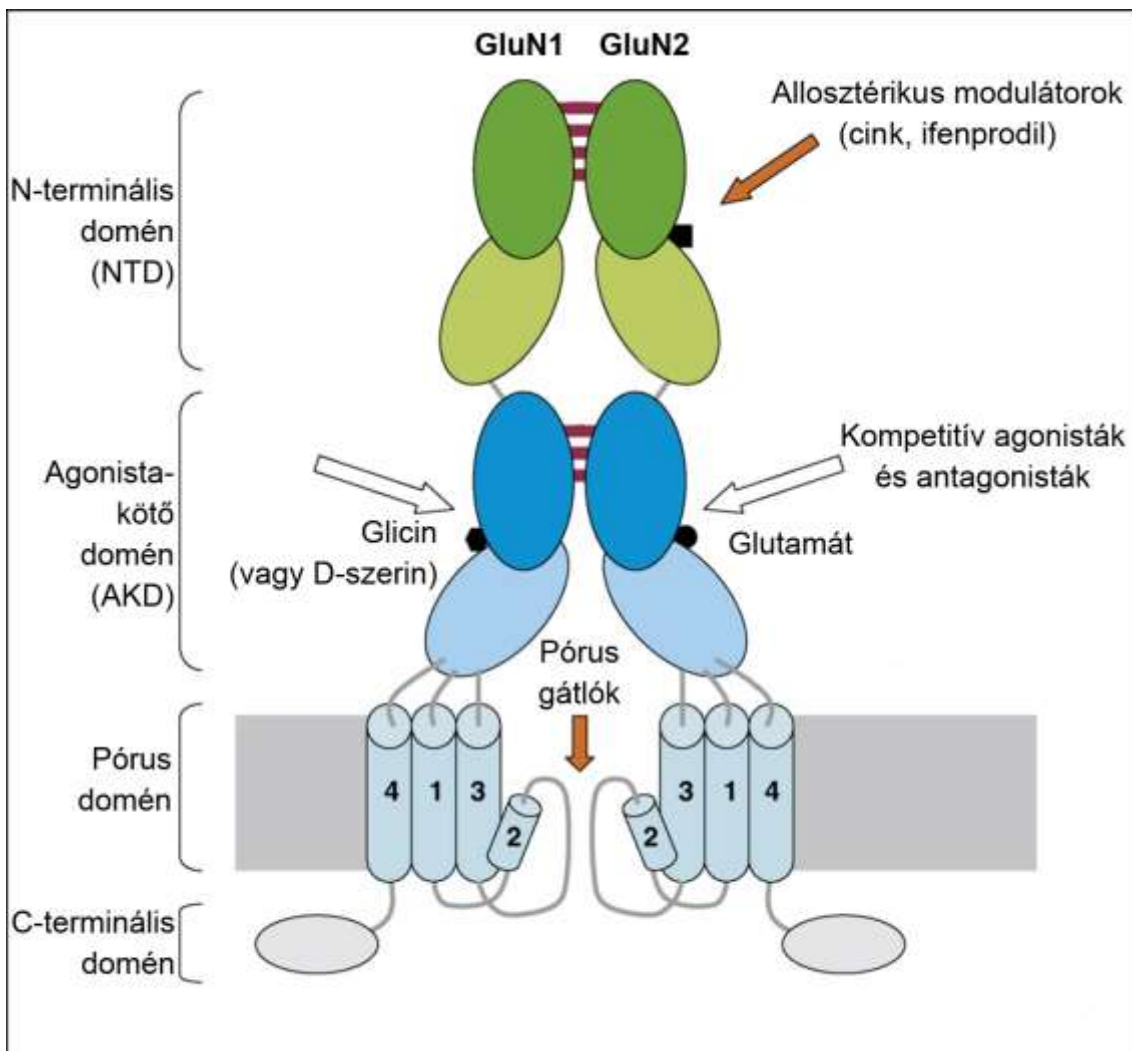
növekedéséhez vezet. Ugyanezen szinapszisban az NO a glutamát-ürítés csökkenését, preszinaptikus LTD-t is ki tudott váltani (Zhang et al., 2006). Az NMDA-NO indukálta LTP kiváltásában valószínűleg mindkét NOsGC heterodimer részt vesz, mert bármelyik receptor genetikai kiütése az LTP eltűnését okozta (Garthwaite, 2008).

III.6. N-metil-D-aszpartát (NMDA) típusú glutamát receptorok

Az NMDA receptorok az ionotróp glutamát-receptorok családjába tartoznak, vagyis aktivációjukat (agonista kötődését) követően ioncsatornaként viselkednek. A receptornak több különlegessége van. Az egyik, hogy nagy a kalcium-permeabilitása, így nátrium és kálium mellett elsősorban kalcium-ionokat enged át a pórusán. A másik, hogy pórusát egy magnézium-ion zárja el, ami csak megfelelő depolarizáció hatására távozik, és csak ezután indulhat meg az ionáramlás. A harmadik, hogy két különböző agonista kötődése szükséges az aktivációjához, glicin (vagy D-szerin) és glutamát (vagy aszpartát). E speciális tulajdonságok révén az NMDA receptorok feszültség- és ligandfüggő kalcium-csatornák, amik koincidencia-detektorként viselkednek, hiszen a pre- és posztzinaptikus sejt együttes aktivitása erősen növeli kinyílásuk valószínűségét.

III.6.1. NMDA receptorok felépítése, alegységek szerkezete

Az NMDA receptoroknak három alegység-családja van: a GluN1 (korábbi nevezéktan alapján NR1 vagy ζ 1), GluN2 (korábban NR2 vagy α) és GluN3 (korábban NR3). A funkcionális NMDA receptorok heterotetramert alkotnak, mely kötelezően 2 GluN1 és klasszikusan 2 GluN2 alegységből állnak (Laube et al., 1998; Monyer et al., 1992). A GluN2 helyett GluN3 alegységet tartalmazó receptorok egészen más receptort hoznak létre (lásd alább). A GluN1 alegységeket egyetlen gén kódolja, ami viszont 8 lehetséges átíródás utáni hasítási (splice) változattal rendelkezik (GluN1-1a-4a és GluN1-1b-4b; (Dingledine et al., 1999). A négy GluN2 alegységet (GluN2A-D) négy külön gén kódolja, és az alegységek térben és időben eltérő módon expresszálódnak. A két GluN3 alegységet szintén két külön gén kódolja.



7. Ábra. Az NMDA receptor szerkezeti modellábrája

Az NMDA receptorok funkcionális hetero-tetramert alkotnak. Működésükhöz nélkülözhetetlen két GluN1 alegység, a másik két helyen bármilyen GluN2 (vagy GluN3) alegység részt vehet a receptor alkotásában. Az alegységek alapszerkezete (doménjei) rendkívül konzervatív (N-terminális „kagyló”-struktúra, Agonista-kötő „kagyló”-struktúra, Pórus-domén és C-terminális domén) módon épülnek fel. Az NMDA receptorokat jellemző funkcionális heterogenitás az alegységek fehérjeszerkezetében kiemelt helyeken történő változásokra vezethető vissza, a receptorok affinitásának és kinetikájának változásait eredményezve. A két „kagyló”-struktúra záródásának nyitódásának következtében létrejövő molekuláris feszültség, húzóerő határozza meg a pórus állapotát. (Módosítva: Paoletti és Neyton, 2007.)

A heterodimerek összeállításában különböző GluN1 izoformák (de „a” és „b” típus egyszerre nem; (Blahos és Wenthold, 1996; Chazot és Stephenson, 1997) és különböző GluN2 alegységek is részt vehetnek, melyek ezt követően heterotetramert alkotnak. A molekuláris komplex kapcsolódása kétféle képpen is létrejöhet: a „nem alternáló” esetben a két GluN1 és GluN2 egymás mellett helyezkedik el (GluN1/ GluN1/ GluN2/ GluN2), az „alternáló” modellben pedig felváltva (GluN1/ GluN2/ GluN1/ GluN2), azonban a funkcionális receptorban az alegységek alternálva helyezkednek el (Riou et al., 2012; Sobolevsky et al., 2009).

Az alegységek moduláris felépítése megegyezik, négy domén vesz részt az alkotásukban (7. ábra): az extracelluláris N-terminális domén (NTD), az agonista-kötő domén (AKD), a pórus-domén és az intracelluláris C-terminális domén. Az NTD nagy változatosságot mutat, és az egyes alegységek tulajdonságainak meghatározásában komoly szerepet játszik. Az allosztérikus modulátorok kötőhelye található a domén „mélyén”, mely kötődés hatására kagylószerű felépítése nyílt-zárt állapotok közt változik. Az AKD hasonlóan kagylószerű szerkezettel rendelkezik, aminek a mélyén az egyes agonista-kötő helyek találhatóak (A GluN1 esetében glicin/D-szerin, a GluN2 esetében glutamát/aszpartát, a GluN3 esetében szintén glicin). A pórus domént három transzmembrán szegmens (M1-M3-M4) és egy intracelluláris hurok (M2) alkotja, ami a csatorna kialakításában vesz részt. Az intracelluláris domén a legváltozékonyabb hosszát tekintve, és elsősorban a membránba szállításban, a lehorgonyzásban és a jelátvivő-komplexekhez való csatlakozásban játszik szerepet (Lau és Zukin, 2007; Ryan et al., 2008).

A csatorna nyitása a következőképpen megy végbe: mindkét agonista bekötődik az AKD kötőhelyekre, melynek hatására a „kagylók” bezáródnak. Ez olyan molekuláris feszültséget okoz a receptorszerkezetben, hogy gyakorlatilag „széthúzza” a pórus domént és megnyitja a csatornát. Amikor allosztérikus gátlószerek kapcsolódnak az NTD-hez annak záródását okozva, akkor az NTD-AKD közötti áthidaló szekvencia megfeszül, és nem engedi becsukódni az AKD struktúráját, megakadályozva ezzel a csatorna megnyílását (Ryan et al., 2008).

III.6.2. NMDA receptorok funkcionális heterogenitása

Az NMDA receptorok funkcionális heterogenitását elsősorban a GluN2 alegységek változatossága adja. Habár elméletileg 8-féle GluN1 alegység létezhet, az izoformák előfordulási gyakorisága nem egyforma, az „a” dominál a „b”-formával (ami egy hozzáadott N1 kazettával rendelkezik) szemben, a GluN1-1 a rostrális (agykéreg, hippokampusz), a GluN1-4 a kaudális (agytörzs, kisagy) agyterületeken van túlsúlyban (a GluN1-2 és 1-3 nagyon ritkák). Mivel a GluN1 alegység elengedhetetlen az NMDA receptor működéséhez (a teljes GluN1 génkiütött állat életképtelen), már embrionális kortól megfigyelhető kifejeződése. A GluN2 alegység négy izoformája (GluN2A-2D) egyrészt eltérő térbeli és időbeli expressziójával, másrészt eltérő kinetikai paramétereivel járul hozzá az NMDA receptorok változatosságához. Az embrionális fejlődés során a GluN2B és 2D vesz részt a receptoralkotásban, majd a posztnatális első-második héten (éppen mikor a serkentő GABA-gátló GABA átalakulás is zajlik) a GluN2D nagymértékben, a GluN2B kismértékben csökken, és ezzel párhuzamosan megnő a GluN2A szintje. A GluN2C szintén a posztnatális fejlődés 2. hetében válik jelentőssé, expressziója a felnőtt állatban a kisagyra és a szaglógumóra koncentrálódik. A GluN2D felnőttben már csak szubkortikális területeken illetve interneuronokban fejeződik ki (Paoletti, 2011; Watanabe et al., 1993). A GluN2 alegységek kinetikája és allosztérikus modulációja is igen eltérő. A GluN2A alegység gyors kinetikával rendelkezik, glutamát aktivációját követően nagy amplitúdójú áram és gyors lecsengés figyelhető meg, ezt követi a GluN2B, majd GluN2C, míg a GluN2D-t már kis amplitúdójú áram és hosszú lecsengési idő jellemzi. Eltérő a alegységek glutamát-érzékenysége, konduktanciája, és magnézium-szenzitivitása is. Míg a GluN2A és 2B pórúsát jelentősen gátolja a magnézium-ion, addig a másik két alegység esetében ez elenyésző (Dingledine et al., 1999; Paoletti, 2011). A GluN2A természetes specifikus allosztérikus modulátora a cink-ion, mely szinaptikusan, vezikulárisan ürül a glutamát mellett számos esetben, és képes az NTD-hez kötődve annak záródását előidézni (Paoletti, 2011). A GluN2B cink-érzékenysége elenyésző, mesterséges gátlószere az ifenprodil, mely hasonló mechanizmussal hat az NTD-n. A két allosztérikus gátlószert annyira specifikus erre a két alegységre, hogy fiziológiai kísérletekben egyértelműen meghatározható az alegységek aránya. A GluN2C és 2D egyik modulátorral szemben

sem mutat megfelelő affinitást, és nem rendelkezik saját, specifikus szabályozómolekulával sem (Paoletti, 2011).

A GluN3 alegységek pedig valószínűleg nem is glutamát receptort formálnak, hiszen nincs glutamát kötőhelyük- inkább glicin receptoroknak lennének tekinthetők (lásd még III.6.1. alfejezetben), ezen kívül *in vivo* kifejeződése és működése még kérdéses, így a továbbiakban ezen alegységek alkotta receptorokról nem esik szó.

III.6.3. NMDA receptorok szubcelluláris elhelyezkedése

Az NMDA receptorok az endoplazmatikus retikulumban (ER) történő szintézist követően a sejtek plazmamembránjába épülnek be. A membránba szállításért, lehorgonyzásért a receptor C-terminális doménje felelős (Pérez-Otaño és Ehlers, 2004; Ryan et al., 2008). A megfelelő membrántranszportozáshoz mind a GluN1, mind a GluN2 alegységre szükség van. GluN1 hiányában látszólag nem változik a GluN2 alegységek mennyisége, lokalizációja annál inkább: nem tudnak kilépni az ER-ből, így abban elektron-denz granulumokat képeznek, a membránjelölés megszűnik (Fukaya et al., 2003). A GluN2 alegység hiányában a receptorok szinaptikus beépülése sérült, valamint a GluN1 alegységek gyors proteolízise figyelhető meg (Abe et al., 2004). Tehát a GluN1 C-terminálisa elsősorban az ER→membrán irányú szállításért, a GluN2 alegységek C-terminálisa pedig – PDZ kötőhelyük révén – a szinapszisba épülésért és a GluN1 alegység (és ezáltal a heterodimer, majd a heterotrimer) stabilitásáért felelős. NMDA receptorok nemcsak szinaptikusan, de extraszinaptikusan is megfigyelhetők, ahol eltérő feladatokat látnak el.

III.6.3.1. Szinaptikus NMDA receptorok

Az NMDA receptorok nagy része szinaptikusan, a glutamáterg szinapszisok posztszinaptikus aktív zónájában helyezkednek el. Ahogy azt már korábban is említettem, a GluN1 és GluN2 alegységek C-terminális doménje „irányítja” az NMDA receptorokat a posztszinaptikus denzitásba, ahol a szinapszis strukturális és jelátviteli fehérjéiből létrejövő molekuláris komplexhez kötődnek. A GluN2 alegység PDZ kötőhelyén keresztül kötődik az NMDA receptor a szinaptikus horgonyzó fehérjékhez

(PSD-95, PSD-93, SAP-102, GRIP1, SSCAM). Ezek a fehérjék számos PDZ doménnel rendelkeznek, amivel több fehérjét szoros kapcsolatba hoznak. A PSD-95 olyan citoskeletális fehérjéket köt a komplexbe (CRIP, GKAP, dinein könnyű-lánc-DLC, neuroliginek stb.), melyek a szinapszis strukturális épülését teszik lehetővé. A másik fontos molekulacsoport, amit a komplexhez kötnek, az NMDA-receptorok jelátviteléért felelős apparátus: az nNOS, kalmodulin, CaMKII stb. (Valtschanoff és Weinberg, 2001). A jelátvitel célelemeinek kompartmentalizációjával gyors és hatékony jelátvitel és szabályozás jön létre. A legelterjedtebb szinaptikus NMDA receptorok a GluN1/GluN2A és/vagy GluN2B alegység összetételű receptorok. A felnőtt hippokampusz piramiseltjeiben is csak ezek az alegységek fordulnak elő (Ito et al., 1997; Watanabe et al., 1993). A kisagyban emellett még a GluN1/GluN2C alegységkompozíció is jelentős. A hippokampuszban a GluN1/GluN2D kizárólag interneuronokban, az azokra érkező serkentő szinapszisokban található (Standaert et al., 1996).

III.6.3.2. Extraszinaptikus NMDA receptorok

Extraszinaptikus NMDA receptoroknak nevezzük a glutamáterg szinapszistól távolabb, a dendrituskéken kívül eső dendritikus és szomatikus NMDA receptorokat. A dendrituskéken periszinaptikusan elhelyezkedő NMDA receptorok (~5%) ugyanis a glutamát „túlsordulás” révén még könnyen aktiválódhatnak szemben a valódi extraszinaptikus receptorokkal (Köhr, 2006). Hippokampális piramiseltjekben mérve az extraszinaptikus NMDA receptorok aránya az összes NMDA receptor mintegy 36%-a (Harris and Pettit, 2007). Korábban azt gondolták, hogy a szinaptikus-extraszinaptikus receptorok alegységösszetételükben különböznek egymástól: a GluN2A tartalmúak a szinapszisban, a GluN2B tartalmúak azon kívül helyezkednének el. Még funkcionális különbséggel is ellátták ezt a szeparációt: a szinaptikus GluN2A felelne a plasztikus folyamatokért, a GluN2B pedig a sejt halálához vezető túlserkentésért (“excitotoxicitás”). Mindkét paradigmát sokszorosan cáfolták azóta. GluN2B tartalmú receptorok jelen vannak a szinapszisban, és fontos szerepet játszanak az LTP kialakulásában, és a GluN2A tartalmú receptorok is jelentős mennyiségben vannak extraszinaptikusan (Köhr, 2006). Arányaikat tekintve nagyjából 50-50% az eloszlása

mindkét alegységnek mindkét kompartmentben, sőt még heterotrimer (GluN1/GluN2A/GluN2B) receptorokat is kimutattak (Harris és Pettit, 2007). Ezenkívül a szinaptikus receptorok is képesek részt venni a kóros túlserkentésben (Köhr, 2006). Magyarozatként látott napvilágot az NMDA receptorok mobilis természete, miszerint vándorolnak a két kompartment között (Tovar és Westbrook, 2002), amit szintén cáfoltak. Az NMDA receptorok viszonylag stabil részei a membránnak, szinaptikus/extraszinaptikus elhelyezkedésükért sokkal inkább a C-terminálisukat szabályozó mechanizmusok, mintsem alegységösszetételük felelős (Harris és Pettit, 2007; Pérez-Otaño és Ehlers, 2004). A GluN2 alegység különböző tirozinjainak (Tyr1472/Tyr1336) foszforilációjával specifikusan tudták az NMDA receptorok szinaptikus/extraszinaptikus szállítását előidézni (Goebel-Goody et al., 2009). Az extraszinaptikus NMDA receptorokat jelenleg a gliális eredetű glutamát érzékelésében tartják fontosnak. Az asztroglia sejtek a szinapszisokat (serkentőt és gátlót egyaránt) körbefogva pontosan érzékelik a hálózati aktivitásokat, és szincíciumuk révén ezt közvetítik is a piramissejt hálózatra. A piramissejtekben kialakuló kismértékű kalcium-áram extraszinaptikus eredetű és NMDA receptor függő mechanizmus, és részt vesz a piramissejtek szinkronizációjában és segíti a plasztikus folyamatokat is (Auld és Robitaille, 2003; Fellin et al., 2004).

III.6.4. Az NMDA receptorok fiziológiai hatásai

Az NMDA receptorok számos fiziológiás és patológiás folyamatban részt vesznek, így hatásaik ismerete nélkülözhetetlen terápiás célpontként való alkalmazásukban. Klinikai kutatások központjában áll a kognitív folyamatok helyreállítását célzó NMDA receptor-aktiváció Alzheimer-demenciában és szkizofréniában (a szkizofréria kognitív tüneteiért az NMDA receptor alulműködést tesz felelőssé), illetve az NMDA-receptorok gátlása az iszkémiás/hipoxiás károsodás okozta kóros túlserkentésben.

III.6.4.1. NMDA receptorok szerepe a hosszútávú plasztikus változásokban

Az NMDA receptorok aktivációja feszültség- és ligandfüggésük miatt a glutamát (és glicin) kötésétől önmagában nem következik be. Először az AMPA receptorok aktivációja megy végbe, ez biztosítja a kellő depolarizációt az NMDA receptorok Mg^{2+} -blokkjának kilökődéséhez. A depolarizáció más tüskeszinapszis ingerületéből és visszaterjedő akciós potenciálból is származhat (“csendes” szinapszisok esetében AMPA receptorok szinaptikus hiányában kizárólag ez a mechanizmus érvényesül). Az időbeliség rendkívül fontos annak meghatározásában, hogy hosszútávú megerősödés (LTP) vagy gátlás (LTD) alakul ki: nagy frekvenciás stimuláció megerősödést, alacsony frekvenciás ingerlés gátlást vált ki. Több ezer molekulát azonosítottak már, aminek köze lehet ezen folyamatok kialakításához, éppen ezért nagyon nehéz meghatározni, mi az ami tényleg nélkülözhetetlen, és mi tekinthető “csak” szabályozó folyamatnak (Nicoll és Roche, 2013). Megpróbálok kiemelni egy-két általánosan elfogadott mechanizmust, amit szorosan kapcsolnak az LTP/LTD-hez. Az NMDA receptorokon keresztüli lokális kalcium beáramlás NO termelődést vált ki, ami ezt követően cGMP termelődéséhez vezet a hippokampuszban (East és Garthwaite, 1991). Az NO hatására bekövetkező hosszútávú változásokat már a III.5.7.2. alfejezetben is ismertettem. Az NO hatásain kívül, posztzinaptikusan a kalcium-kalmodulin kötődés következtében aktiválódik a kalcium-kalmodulin kináz II (CaMKII), mely autofoszforilációval jár, és ezt követően kalcium-független, konstitutív aktivitásra tesz szert. Szubsztrátjainak foszforilációja (valószínűleg a RhoA játsza a főszerepet) az AMPA receptorok exocitózisát okozza, máig feltáratlan mechanizmus alapján (Nicoll és Roche, 2013).

Ezen kívül megfigyelhető a szinapszis átépülése is a szorosan kötött citoskeletális fehérjéknek köszönhetően. Ennek eredményeképpen nemcsak a posztzinaptikus receptorok dokkolása (AMPA, NMDA) könnyebb, de a szinapszis tényleges megnagyobbodása, megerősödése is létrejön pl. az SSCAM által a komplexbe kötött neuroligin révén, ami önmagában a szinapszis méretét képes szabályozni, a preszinaptikus neurexin- β -val pedig struktúrálisan “tartja össze” a szinapszist (Bang és Owczarek, 2013). A neuroligin-neurexin kapcsolat sérülése az LTP gyengüléséhez vezet (lásd III.4.1.2. alfejezetben). Az LTD kialakulásában a magas intracelluláris kalcium aktin depolimerizációra kifejtett hatását veszik alapul, ami a szinapszis

strukturális gyengüléséhez és az NMDA receptorok eltávolításához vezet. Ez a kalcium általában nemcsak NMDA receptoroktól származik, hanem belső raktárakból is, metabotróp receptorok párhuzamos aktivációja révén (mAChR, mGluRI-csoport; Hunt és Castillo, 2012).

III.6.4.2. NMDA receptorok szerepe a kóros túlserkentésben (excitotoxicitás)

Az NMDA receptorok túlzott aktivációja fiziológias körülmények között nem jön létre a glutamát visszavétel és a jelátvitelt posztzinaptikusan szabályozó negatív visszacsatolással működő enzimrendszerek miatt. Pathológias körülmények között – oxigénhiány (hipoxia) vagy oxigén- és vérellátás hiánya (iszkémia) miatt- azonban a jól szabályozott rendszerek felborulnak. A glutamát felhalmozódása részben a transzporter mechanizmusok gátlásának, részben ellentétes működésüknek (kifelé pumpálják a glutamátot) köszönhető, mely az NMDA receptorok (szinaptikus és extraszinaptikus receptorok egyaránt) permanens aktivációjához és következményes kalcium beáramláshoz vezet. Míg a fiziológias kalcium mindig Ca^{2+} -kalmodulin kapcsolódáson keresztül fejt ki hatását, ilyenkor a túlzott mennyiségű kalcium direkt hatásai dominálnak. Az nNOS-NO rendszer folyamatos aktiválása túlzott NO termeléshez vezet. Az NMDA receptorok és nNOS negatív visszacsatoló szabályozása a magas kalcium-szint miatt nem működnek. A magas intracelluláris kalcium koncentráció következtében a mitokondrium kalcium felvétele fokozódik, csökken a membránpotenciál-különbsége, ezzel leáll az ATP-szintézis, sőt meg is fordulhat a folyamat, a már meglévő ATP molekulák bontásával. Az elektrontranszport-lánc kisiklásával megnő a reaktív oxigéngyökök (ROS) termelése, ami a már jelentős mennyiségű NO-dal kölcsönhatva peroxi-nitritté alakul, további sejtkárosodást idézve elő. Együttesen ezek a folyamatok irreverzibilis változást és az apoptózis beindítását (kaspáz-kaszád) eredményezik a sejt halálához vezetve (Hardingham és Bading, 2003; Papadia és Hardingham, 2007).

IV. CÉLKITŰZÉSEK

A piramis sejtekre érkező gátlás alapvető fontosságú a hálózati szinkron működésekhez (pl. theta-oszcilláció). Ha egy piramis sejt valós információt kódol (pl. tér-információ), az erős periszomatikus gátlás ellenére is képes a tüzelésre, a populációs szinkron kisüléshez képest a theta korábbi fázisában (fázis-előretolódás), ezáltal a kódolt információ „beég a hálózatba”, hosszútávú szinaptikus változások jöhetnek létre. A fázis-előretolódás molekuláris hátterében olyan folyamatok valószínűsíthetők, melyek a piramis sejt aktivitásától függően retrográd jelátviteli útvonalak beindításával jár, mely felszabadítja a piramis sejtet az erős periszomatikus gátlás alól. Ilyen, a GABAerg szinapszisokban is jól feltérképezett retrográd rendszer az endokannabinoid rendszer, ami a periszomatikus gátlósejtek közül csak a kolecisztoxinin (CCK) tartalmúak szinapszisaiban található meg. Egy másik, a serkentő szinapszisok plaszticitásában jelentős szereppel bíró retrográd jelátviteli útvonal a nitrogén-monoxid jelpálya. Míg a serkentő (glutamaterg) szinapszisokban betöltött szerepéről hatalmas szakirodalom található, mindeközéig nem vizsgálták gátló (GABAerg) szinapszisokban való előfordulását. Fő kérdésünk tehát az volt, megtalálható-e a nitrogén-monoxid rendszer az oly fontos periszomatikus gátlósejtek szinapszisaiban, mutat-e sejtspecifikus eloszlást, mint az endokannabinoid rendszer, vagy éppen ellenkezőleg egy általános retrográd útvonalat képvisel.

Az alábbi kérdéseket tettük fel:

- megtalálható-e a neuronális nitrogén-monoxid szintáz (nNOS) a GABAerg szinapszisok posztzinaptikus oldalán,
- mely periszomatikus szinapszispopuláció (CCK/PV) fejez ki nNOS-t,
- megtalálható-e a nitrogén-monoxid receptora a GABAerg terminálisokban,
- mely GABAerg alpopulációk fejezik ki a receptort és
- milyen alegység-összetétellel rendelkeznek 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 serkentő szinapszisokban az nNOS aktiválása NMDA receptorokon keresztül, az extracelluláris térből lokálisan beáramló kalcium kalmodulinhoz való kötődésével történik.

A második kísérletsorozatban arra voltunk kíváncsiak, a GABAerg szinapszisokban is képes-e betölteni az NMDA receptor ezt a szerepet.

Kérdéseink az alábbiak voltak:

- fiziológiás túlélő szeletben NMDA adagolás képes-e beindítani az NO-rendszert a GABAerg szinapszisokban,
- anatómiai módszerekkel kimutatható-e az NMDA receptor a piramissejtek periszomatikus GABAerg szinapszisaiban, posztszinaptikusan,
- milyen alegységek vesznek részt ezen receptorok alkotásában,
- kvantitatív módon a periszomatikus 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.

V. KÍSÉRLETI MÓDSZEREK

V.1. Kísérleti állatok

A kísérleti állatok felhasználása minden esetben az Intézet Etikai Kódexének, a magyarországi 1998. évi XXVIII. törvénynek (az “állatok védelméről és kíméletéről”), illetve annak 2002. évi módosításának (LXVIII. átv.) és a 243/1998. (XII.31.) Kormányrendeletnek megfelelően történt, ami elveiben megegyezik az Európai Közösségek Tanácsának EEC 609. számú Utasításával (86/609/EEC, “Utasítás a kísérleti és más tudományos célra használt gerinces állatok oltalmára”, 1986. November 24.). A kísérletek során fiatal felnőtt hím Wistar patkányokat (Charles River, Budapest) és 30-60 nap közötti fiatal felnőtt hím C57BL/6 egereket (MTA-KOKI Orvosi Géntechnológiai Részleg) használtunk. A neuronális nitrogén-monoxid szintáz (nNOS) génkiütött egerek a Jackson Laboratóriumból származtak (Jax mice; The Jackson Laboratory, Maine, USA). A sejttípus specifikus NMDA receptor 1 alegység (GluN1) génkiütött egeret, melynek kizárólag az agykérgi serkentő sejteiből hiányzott a GluN1 alegység (cxGluN1KO), már korábban jellemezték (Iwasato et al., 2000).

V.2. Transzkardiális perfúziók

Az általános anesztéziát a replika kísérleteket kivéve altató koktéllal értük el, mely 2,5% ketamint, 0,5% xilazin-hidrokloridot, 0,25% promethazinium-kloridot, 0,0025% benzetonium-kloridot és 0,002% hydrochinonumot tartalmazott. A koktélt intraperitoneálisan alkalmaztuk 0,2 ml/100 g testtömeg arányban. A replika kísérletek esetében az állatok altatása nátrium-pentobarbitál (50 mg/kg) intraperitoneális injektálásával történt. Az állatok transzkardiális fixálását fiziológiás sóoldattal történő gyors átmosás előzte meg (1-2 percig), majd ezt követte a fixáló oldattal való perfúzió. A fixáló oldat összetétele az alábbiak szerint változott a különböző immunreakciók esetében: a beágyazás előtti nNOS-immunarány reakcióhoz az egereket 1% paraformaldehidet tartalmazó 0,1 M foszfát-puffer (PB) oldattal (pH 7.4) perfundáltuk 60 percig; a beágyazás előtti “tükörkép” kísérletekhez, az immunfluoreszcens, a beágyazás előtti és utáni NMDA-R immunarány reakciókhoz és az *in situ*

hibridizációhoz 4% paraformaldehidet tartalmazó 0,1 M PB oldattal (pH 7.4) perfundáltunk 30 percig. Az *in situ* hibridizációhoz használt összes oldat 0,1% diethylpyrocarbonate (DEPC)-tal lett kezelve 1 órán át, majd autoklávozva lett. A beágyazás előtti NOsGC α 1 alegység immunperoxidáz jelölés elektronmikroszkópos vizsgálatához először 4% paraformaldehidet tartalmazó nátrium-acetát pufferrel (pH=6,0) perfundáltunk 2 percig, majd ezt követte a 4% paraformaldehidet tartalmazó Borax-puffer (pH=8,5) 40 percig. A replika kísérletek esetében az érrendszer átmosása 0,9% nátrium-kloridot tartalmazó 25mM foszfát-pufferrel (PBS) történt 1 percen keresztül, majd 2% paraformaldehidet és 15% telített pikrinsavat tartalmazó 0,1 M PB oldattal fixáltuk az egereket 12 percen át. A replika kísérletek kivételével a fixáló oldat után 0,1 M PB oldattal perfundáltuk át az érrendszert 10 percig. Ezt követően az agy eltávolításra került a koponyából, és ezt utólagos immerziós fixálás nélkül követte a vibratómos metszetkészítés.

V.3. 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, azok specifikusnak bizonyultak, 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 (9. ábra). A nitrogén-monoxid szenzitív guanilát-cikláz (NOsGC) ellen készült antitestek specificitását szintén teszteltük (Részletes leírás a VI.3. fejezetben található). A cGMP és a glutaminsav-dekarboxiláz 65 (GAD65) antitestek specificitását korábban már alaposan megvizsgálták (Chang and Gottlieb, 1988; de Vente et al., 1987; Tanaka et al., 1997). A vezikuláris glutamát transzporter 3 (vGluT3) antitest specificitását vGluT3 génkiütött állat felhasználásával bizonyítottuk. A GABA_A receptor (GABA_AR) β 3 alegység ellen készült antitest szintén specifikusan jelölte meg a piramissejtek sejttestére érkező GABAerg szinapszisokat (Kasugai et al., 2010)). 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 régió-specifikus génkiütött egerek segítségével mind beágyazás előtti, mind beágyazás utáni (Lowicryl) immunarany kísérletekben (Abe et

al., 2004; Akashi et al., 2009; Fukaya et al., 2003; Watanabe et al., 1998). A beágyazás előtti NMDA receptor immunarany kísérletekben ugyanazt az emésztési protokolt használtuk, amit az antitestek tesztelésénél is használtak (Watanabe et al., 1998). 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 cxGluN1KO egerek hippocampuszaiból, hogy a replika immunarany kísérletekben is bizonyítsuk a GluN1 antitest specificitását. Nem találtunk szinaptikus aranyszemcséket a piramissejteken, és elhanyagolható mennyiségű háttér aranyszemcsét találtunk a piramissejtek sejttestén (15. ábra). Ezen kívül, 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 „tükörkép” 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. Habár meglehetősen valószínűtlen, hogy ezzel a módszerrel ugyanazon receptor molekula két különböző alegységét megjelöljük, arra mégis alkalmas, hogy a különböző alegységeket egyazon szinapszisban kimutassuk. Eredményeink azt mutatták, hogy a GluN2 jelölt szinapszisok nagy részében megtalálható volt a GluN1 alegység is a szomszédos metszetek egyikén (16. ábra E, 23 szinapsziszból 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 jelöléses kísérletekben. Egyik esetben sem találtunk keresztreakcióit. Az antitestekkel kapott specifikus jelölés nem volt megfigyelhető az elsődleges antitestek hiányában, illetve a fluoreszcens kísérletek esetében még az autofluoreszcencia jelensége is kizárható volt.

V.4. 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-N^G-Nitroarginine methyl-ester-hydrochloride) és az MK801 a Sigma-Aldrich terméke. Az NMDA, D-AP5 (D-(-)-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid), ODQ (1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one), nifedipin és az SNX482 a Tocris Bioscience-től származott. A tetrodotoxin (TTX) az Alomone Labs-tól, a nitroprusszid-nátrium (SNP) a Flukatól lett rendelve.

V.5. *In situ* hibridizációs kísérletek

V.5.1. NOsGC alegységek kimutatásához szükséges ribopróbák szintézise (társ-munkacsoport munkája)

Ribopróbák készítéséhez patkány NOsGC $\alpha 1$ és $\alpha 2$ alegységek alapvetően nem átfedő (kevesebb mint 50%-os egyezés) kódoló szekvenciáit (GenBank hozzáférési szám gi:1655846 az $\alpha 1$ és gi:13027399 az $\alpha 2$ alegység esetében) sokszorosították Wistar patkány teljes hippokampális mRNS mintából kinyert cDNS-ből, reverz-transzkriptáz polimeráz-lánreakció (PCR) segítségével. A primerek hossza és szekvenciája a következő volt (a nukleotidok számozása a nyílt olvasási keret kezdetétől indul) $\alpha 1$ alegység: 800 bázispár 481-től 1280-ig, előre tartó primer: 5'-CTC AAG ATC ACG GGG GAG T, reverz primer: 5'-ACT AGC GAG GAC TGG GGT TT; $\alpha 2$ alegység: 903 bázispár 444-től 1346-ig, előre tartó primer: 5'-CTC AAG ATC ACG GGG GAG T, reverz primer: 5'-TGG GAA GTA CCT TGT GGA ATG. A primereket Primer3 szoftver (Rozen és Skaletsky, 2000) segítségével készítették el. A PCR termékeket pBluescript II SK- (Fermentas, Vilnius, Litvánia) *Sma*I helyére klónozták. A klónok megőrzöttségét és irányultságát szekvenálás során igazolták. Az $\alpha 1$ alegység elleni egyszálú sense próbát *Pst*I, az antisense próbát *Xba*I emésztéssel, míg az $\alpha 2$ alegység elleni sense próbát *Hind*III, az antisense próbát *Not*I emésztéssel készítették el. Az egyszálú minta DNS-eket gélikivonás után 1 μ g/ μ l koncentrációban, DEPC-kezelt

desztillált vízben hígítva tárolták $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on. Az *in vitro* átírást 2 órás, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on történő inkubálás során végezték $20\mu\text{l}$ teljes térfogatban, mely $1\ \mu\text{g}$ minta-DNS-t, 1 egység átíró-puffert, 1 egység Digoxigenin RNS-jelölő keveréket, 40U Rnáz gátlót és 20U T3 vagy T7 RNS-polimerázt tartalmazott, DEPC-kezelt, kétszer desztillált vízben. Minden hozzávalót a Roche Molecular Diagnostics-tól (Mannheim, Németország) szereztek be. A digoxigeninnel jelölt ribopróbákat Dnázsal kezelték, majd az RNeasy MinElute Cleanup kit (Qiagen, Hilden, Németország) segítségével tisztították. Ezután gélelektroforézis használatával határozták meg a ribopróbák megőrzöttségét és mennyiségét.

V.5.2. *In situ* hibridizáció (társ-munkacsoport munkája)

A hibridizáció során használt összes oldatot 0.1% DEPC-cel kezelték, majd autoklávoztak. A vegyszereket a Sigmától (Budapest, Magyarország) szereztek be. Az $50\ \mu\text{m}$ vastag patkány vagy egér agyszeletek inkubálását Rnáz-mentes, steril sejt kultúra-tál kamráiban végezték. A metszeteket először 3×20 percig sós foszfát-pufferben (PBST, mM-ban: 137 NaCl, 2.7 KCl, 10 Na_2HPO_4 , 2 KH_2PO_4 , és 0.1% Tween 20, pH 7.4) mosták, majd egy éjszakán át inkubálták hibridizációs pufferben, mely $1.2\ \mu\text{g/ml}$ digoxigeninnel-jelölt ribopróbát, 50% formamidot, 5 egység SSC-t, 1% SDS-t, $50\mu\text{g/ml}$ élesztő tRNS-t és $50\mu\text{g/ml}$ heparint tartalmazott DEPC-el kezelt desztillált vízben. A mosások és az inkubációk alatt a metszeteket tartalmazó sejt kultúra-tálat egy nedvesített kamrában, rázógépen tartották. Az inkubáció után a metszeteket 30 percig mosták első mosóoldattal (50% formamid, 5 egység SSC, és 1% SDS DEPC-kezelt desztillált vízben) $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, majd 45 percig második mosóoldattal (50% formamid és 2 egység SSC DEPC-kezelt desztillált vízben) ugyancsak $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on. A metszeteket ezt követően 5 percig mosták 7.6 pH-jú, sós Tris-pufferben, melyhez 0.1% Tween 20-at adtak (TBST). Ezután 10% normál kecske szérumot tartalmazó TBST-ben (TBSTN) blokkolták a metszeteket egy órán át, szobahőmérsékleten, majd egy éjszakán át $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on inkubálták őket TBSTN-ben, mely 1:1000-re kihígított, alkalikus-foszfáttal jelölt juh-anti-digoxigenin F_{ab} IgG-fragmentumot tartalmazott (Roche Molecular Diagnostics, Németország). Ezután a metszeteket 3×20 percen keresztül mosták TBST-vel, majd előhívták a reakciót $3.5\mu\text{l}$ 5-bromo-4-kloro-3-indolilfoszfát-ot

és 3.5 µl nitro blue tetrazolium kloridot tartalmazó, friss kromogén oldatban (mM-ban: 100 NaCl, 100 Tris-Cl, pH 9.5; 20 MgCl₂, 2 (-) tetramizol hidroklorid, és 0.1% Tween 20). A metszeteket az előhívó oldat 1 ml-jében inkubálták 6-8 órán át, sötétben, majd a reakciót PBST-vel állították le. Végül 3x10 percig mosták a metszeteket 0.1 M foszfát-pufferben, majd üveg tárgylemezekre kiszedték, és Vectashield-del (Vector Laboratories) fedték le.

V.6. Kettős immunfluoreszcens kísérletek

Miután 40 µm-es metszeteket készítettünk a dorzális hippokampuszokból Leica VT1000S típusú vibratómon, és alaposan kimostuk a maradék fixálót a szövetből, a metszeteket 1% humán szérum albumin (HSA) oldatban, majd az alábbi molekulák ellen készült elsődleges antitest keverékek oldatában inkubáltuk 2 napig, TBS-ben hígítva: NOsGCα1 (nyúl poliklonális anti-NOsGCα1, 1:1000; Sigma) és kolecisztokinin (egér monoklonális anti-CCK; 1:3000; CURE), vagy NOsGCα1 és parvalbumin (egér monoklonális anti-PV, 1:1000; Swant), vagy NOsGCα1 és nNOS (egér monoklonális anti-nNOS, N2280, 1:500; Sigma), vagy NOsGCα1 és szomatosztatin (patkány monoklonális anti-SOM MAB354, 1:70; Chemicon), vagy nNOS és kannabinoid receptor 1 (nyúl poliklonális anti-CB1, 1:500; Hájos et al., 2000), vagy nNOS és P-anyag receptor (nyúl poliklonális anti-SPR, AB5060, 1:5000; Chemicon). Alapos TBS mosás után a metszeteket fluoreszcens festékkel jelölt másodlagos antitestek keverékében inkubáltuk 5 órán keresztül. A CCK, PV és nNOS megjelölésére vörös fluoreszcens Alexa594 egér ellen készült IgG-t (1:200; Invitrogen), a CB1 és SPR festéséhez zöld fluoreszcens Alexa488 nyúl ellen készült IgG-t (1:200; Invitrogen), a SOM jelöléséhez pedig FITC patkány ellen készült IgG-t (1:50; Jackson ImmunoResearch) használtunk. Az NOsGCα1 jelölés esetében vagy zöld fluoreszcens Alexa488 nyúl ellenes IgG-t vagy vörös fluoreszcens Alexa594 nyúl ellenes IgG-t (mindkettő: 1:200; Invitrogen) használtunk. Az immunfestés során nem használtunk detergenset. A metszeteket 0.025%-os réz-szulfát oldattal kezeltük 30 percig, hogy csökkentsük a metszek autofluoreszcenciáját (Schnell et al., 1999), majd TBS mosást követően mikroszkópos tárgylemezre szedték ki a metszeteket, és Vectashield (Vector

Laboratories) felhasználásával fedtük le fedőlemezzel. Az immunreakciókat Zeiss Axioplan2 fluoreszcens mikroszkóppal értékeltük ki.

V.7. Beágyazás előtti immunperoxidáz kísérletek

A dorzális hippokampuszokból Leica VT1000S típusú vibratómon 60 µm-es metszeteket készítettünk, és alapos PB mosást követően a metszeteket 1% humán szérum albumint (HSA) tartalmazó TBS oldatban blokkoltuk, majd 2 napon át inkubáltuk a NOsGC α 1 és β 1 alegység ellen termeltetett elsődleges antitesttel (nyúl poliklonális anti-NOsGC α 1, Sigma, katalógusszám: G4280, sorozatszám: 011K4888; 1:10000 a tükrökép-kísérletek esetében és 1:1000 az elektronmikroszkópos vizsgálatoknál; nyúl poliklonális anti-NOsGC β 1, Cayman Chemical, katalógusszám:160897, sorozatszám: 134521,1:4000) TBS pufferben oldva. Alapos TBS mosást követően a metszeteket TBS-ben hígított biotin-kötött másodlagos antitestekkel (kecskében termelt poliklonális nyúl ellenes IgG , Vector Laboratories, 1:200), majd avidin-biotin komplexhez kötött torna-peroxidáz oldattal (Elite ABC, 1:300; Vector Laboratories) kezeltük. Az immunperoxidáz reakció megjelenítéséhez 3,3-diaminobenzidin (DAB, Sigma) kromogént használtunk. A „tükrökép” kísérletek esetében a DAB csapadékot nikkel-ammónium-szulfát hozzáadásával erősítettük (DAB-Ni). A metszeteket ezt követően ozmium-tetroxiddal kezeltük, kivéve a „tükrökép” kísérletek esetén, majd mindet víztelenítettük felszálló alkoholsorban és propilén-oxidban, végül epoxi-alapú gyantába ágyasztuk (Durcupan; ACM; Fluka). A víztelenítési eljárás során a metszeteket 70%-os etil-alkoholban hígított 1% uranil-acetát oldattal kezeltük 30 percig.

V.8. Beágyazás előtti immunarany és kombinált immunarany-immunperoxidáz kísérletek

Az nNOS lokalizációjához az egereket 1% paraformaldehidet tartalmazó 0.1 M PB oldattal perfundáltuk, majd 60 µm-es metszeteket készítettünk a dorzális hippokampuszokból. Alapos PB és TBS mosást követően a metszeteket TBS-ben oldott 1% HSA oldatban, majd az elsődleges antitestek oldatában inkubáltuk 2 napig: nNOS

(nyúl poliklonális anti-nNOS, 1:500; Zymed Laboratories) illetve a kettős festések esetében nNOS és CCK (1:5000) vagy nNOS és PV (1:7000) TBS-ben hígítva (GelBS). Számos TBS mosás után a metszeteket 0.5% halbőr-zselatint (GE Healthcare) és 0.5% HSA-t tartalmazó TBS oldatban blokkoltuk 1 órán át. Ezt követte az arany-kötött másodlagos antitestek oldata: 1nm-es arany-kötött nyúl ellen készült (kecske poliklonális antitest, 1:80; GE Healthcare) vagy 0.8 nm arany-kötött nyúl ellen készült (kecske poliklonális antitest, 1:80; Aurion) antitesteket hígítottuk GelBS-ben és inkubáltuk 1 napig. Alapos TBS mosás után a metszeteket 2% glutáraldehidet tartalmazó PB oldattal kezeltük 15 percig, hogy az arany szemcséket hozzákössük a szövethez. PB mosásokat követően intenzifikálást elősegítő pufferben (ECS; Aurion), majd ezüst-intenzifikáló (SE-EM; Aurion) oldatban inkubáltuk a metszeteket 60 percig. Ezt ECS, majd PB mosás követte. A kizárólag immunarany reakcióban résztvevő metszetek ezután ozmium-tetroxid kezelésben részesültek, majd víztelenítettük őket. Az immunarany-immunperoxidáz kettős festések esetében a metszeteket a továbbiakban biotin-kötött másodlagos antitest-oldatban inkubáltuk (egér elleni ló poliklonális antitest, 1:200; Vector Laboratories) 24 órára, majd avidin-biotin komplexhez kötött torna-peroxidázt (Elite ABC, 1:300; Vector Laboratories) tartalmazó TBS oldatban inkubáltuk a metszeteket 3 óráig. Az immunperoxidáz reakciót 3,3-diamino-benzidin (DAB, Sigma) segítségével tettük láthatóvá. A metszeteket ozmium-tetroxiddal kezeltük, majd felszálló alkoholsorban és propilén-oxidban víztelenítettük, és epoxi-alapú (Durcupan) gyantába ágyaztuk. A víztelenítési eljárás során 70%-os etil-alkoholban hígított 1% uranil-acetát oldattal 30 percig kontrasztoltuk a metszeteket. Az elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz kis gyantába ágyazott szövetmintákat vágunk ki és ragasztottuk Durcupan blokkokra, majd 70 nm vastagságú sorozatmetszeteket készítettünk Leica EM UC6 típusú ultramikrotómon. A metszeteket pioloformmal fedett egynyílású réz gridekre szedtük fel. A kiértékelést Hitachi H-7100 típusú elektronmikroszkópon végeztük. Az nNOS immunarany kísérleteknél az arany szemcséket az anatómiailag meghatározott GABAerg szinapszis és a nem-szinaptikus plazmamembrán mentén mértük. A plazmamembrán síkjától számított 40 nm-es távolságon belül elhelyezkedő arany szemcséket tekintettük membrán-asszociáltnak.

Az NMDA receptorok szinaptikus detektálásához elengedhetetlen az immunreakció előtti pepszines emésztés (Watanabe et al., 1998), ezért 1mg/ml pepszin

(DAKO) tartalmú 0.2 M sósav-oldattal kezeltük a metszeteket 10 percig 37 C°-on. Ezt követően a paraformaldehid fixálás következtében a szövetben létrejövő szabad oxo-csoportokat TBS-ben oldott 50 mM glicin (Sigma-Aldrich) segítségével kötöttük meg, majd 1% HSA oldatban blokkoltunk. Ezt követően vagy csak az NMDA-R alegységek (nyúl poliklonális antitestek, GluN1 1.8 µg/ml; GluN2A 1.8 µg/ml; GluN2B 1.3 µg/ml) ellen termelt elsődleges antitesteket, vagy az NMDA-R alegységek /vGluT3 (tengerimalac poliklonális anti-vGluT3, 1:3000; Chemicon, AB5421) és NMDA-R alegységek / PV (egér monoklonális anti-PV, 1:7000; Swant) ellenes elsődleges antitestek keverékét hígítottuk 0.1% BSA-cTM (Aurion, TBS-BSA-c) tartalmú TBS oldatban, és 3 napig inkubáltuk benne a metszeteket. Számos TBS-BSA-c mosás után, 1,4 nm méretű aranszemcsével kötött másodlagos nyúl ellenes antitesttel inkubáltuk 1 napig a metszeteket (Nanogold Fab' konjugált antitest, NanoProbes; 1:100, TBS-BSA-c oldatban hígítva). Alapos TBS-BSA-c mosás után a metszeteket 2% glutáraldehidet tartalmazó PB oldattal kezeltük 15 percig, hogy az arany szemcséket hozzákössük a szövethez. Ezt követte az ezüst-intenzifikálás (SE-EM; Aurion, 40 perc) szobahőmérsékleten. A kombinált immunarany-immunperoxidáz kísérletek esetében, a metszetek a továbbiakban 1 napig inkubálódtak biotin-kötött másodlagos antitestek (tengerimalac elleni kecske IgG, 1:200, Vector Laboratories ; egér elleni szamár IgG, 1:1000; Jackson Laboratories) oldatában. Ezt követte a TBS-ben hígított avidin-biotin komplexhez kötött torma-peroxidáz oldat 3 órára, majd DAB kromogén segítségével tettük láthatóvá a jelölést. A metszeteket ozmium-tetroxiddal kezeltük, majd felszálló alkoholsorban és propilén-oxidban víztelenítettük, és epoxi-alapú (Durcupan) gyantába ágyztuk. A víztelenítési eljárás során 70%-os etil-alkoholban hígított 1% uranil-acetát oldattal 20 percig kontrasztoltuk a metszeteket. Az elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz a hippocampális szövetmintákat kis Durcupan® tartalmú öntőformába ágyztuk, majd 60 nm vastagságú sorozatmetszeteket készítettünk Leica EM UC6 típusú ultramikrotómon. A kiértékelést Hitachi H-7100 típusú elektronmikroszkópon végeztük. A szemikvantitatív immunarany NMDA-R mérések esetében az aranszemcsék sűrűségét az anatómiailag meghatározott GABAerg szinapszis és a nem-szinaptikus plazmamembrán mentén mértük. A membrán síkjától számított 50 nm-es távolságon belül elhelyezkedő aranszemcséket tekintettük membrán-asszociáltnak.

V.9. Lowicryl beágyazás és beágyazás utáni kvantitatív immunarany kísérletek

Fixálást követően 300 μm vastagságú metszeteket készítettünk Leica VT1200S típusú vibratómmal, majd alapos PB mosást követően a metszeteket növekvő koncentrációjú szaharóz-oldatban (0.5, 1 és 2M szaharóz 0.1 M PB-ben oldva) inkubáltuk. A metszeteket Leica CPC segítségével folyékony nitrogén hőmérsékletűre hűtött arannyal bevont réz korongokra csaptuk, hogy gyors és egyenletes fagyást érjünk el, majd a fagyott metszeteket átszállítottuk Leica AFS-be, amiben az alacsony hőmérsékletű víztelenítést és a Lowicryl HM20 (Chemische Werke Lowi) gyantába történő fagyasztva beágyazást végeztük. A hippokampuszokból 50 és 70 nm vastagságú sorozatmetszeteket készítettünk. A sorozatmetszeteket vagy pioloformmal fedett egynyílású nikkellal gridekre szedtük fel, ami csak egyoldali immunreakciót tesz lehetővé (egyoldali kísérletek), vagy hálós nikkellal gridekre szedtük fel, mely esetben a metszeteknek mindkét oldala egyszerre részt vesz az immunreakcióban (kétoldali kísérletek). Egyoldali kísérleteket végeztünk az ún. "tükörkép" kísérletekhez, melyek során tovább bizonyítottuk antitestjeink specificitását azzal, hogy az NMDA-R különböző alegységeit egyazon szinapszisban azonosítottuk. A kétoldali kísérletek esetében az immunarany jel sokkal erősebb, de a szinaptizáló terminálisok rekonstrukciója nem lehetséges. Ezen reakciókban a hálós grideket először 2-3 másodpercig marattuk telített nátrium-etanolát oldatban, majd alaposan lemostuk őket desztillált vízben. Ezt követően minden gridet blokkoló oldat cseppjeiben inkubáltuk 1 órán át, majd éjszakára elsődleges antitesteket tartalmazó cseppekben inkubáltunk. A blokkoló oldat, amit az elsődleges és másodlagos antitestek hígításához is használtunk, TBS-ben oldott 2% human szérum albumint tartalmazott. Az NMDA-R alegységek elleni elsődleges antitestek (nyúl poliklonális antitestek Prof. Watanabe M. laborjából, GluN1 24 $\mu\text{g/ml}$, GluN2A 20 $\mu\text{g/ml}$, GluN2B 18 $\mu\text{g/ml}$) 18 órás inkubálása után TBS-ben mostuk a grideket, majd 5 órán át inkubáltuk 5nm arany-kötött másodlagos antitestek oldatából készült cseppekben (nyúl elleni kecske IgG 1:100, British Biocell International). A "tükörkép" kísérletek esetében 0,8 nm nagyságú arany-kötött másodlagos antitesteket használtunk (1:100, nyúl elleni számár IgG, Aurion), majd az arany szemcsék méretét ezüst intenzifikálóval (SE-EM 40 percig, szobahőmérsékleten; Aurion) növeltük meg. Számos mosást követően végül desztillált vízben öblítettük le a

metszeteket, és telített uranyl-acetát vizes oldatával, majd ólom-citráttal kontrasztoltuk meg őket. A kiértékelést Hitachi H-7100 típusú elektronmikroszkópon végeztük. A kétoldali kvantitatív immunarany NMDA-R mérések esetén az aranszemcsék sűrűségét az anatómiailag meghatározott GABAerg és glutamaterg szinapszis és a nem-szinaptikus plazmamembrán mentén mértük. A membrán síkjától számított kétszer 45 nm-es távolságon (a membrán egyik ill. másik oldala felé) belül elhelyezkedő aranszemcséket tekintettük membrán-asszociálnak.

V.10. SDS-kezelt fagyasztva tört replika immunarany kísérletek

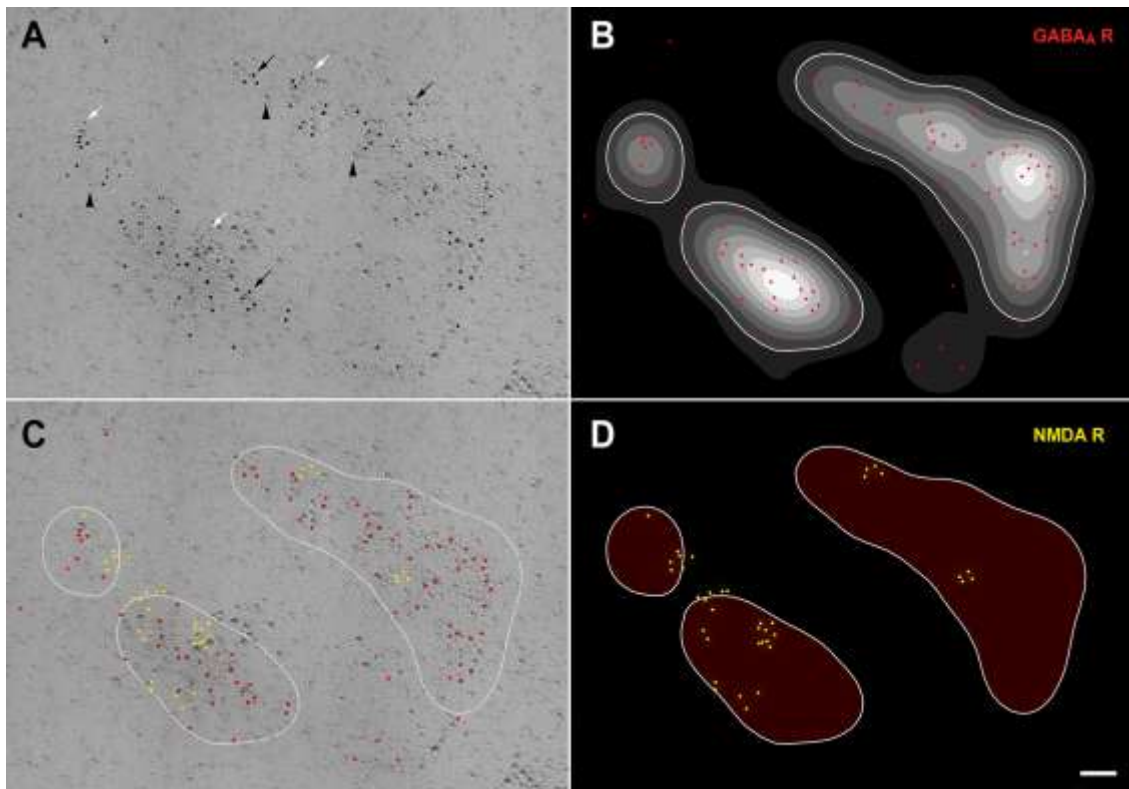
A perfúziót követően 130 μ m vastag koronális hippokampusz szeleteket metszettünk Dosaka típusú vibratómon, majd egy éjszakán át inkubáltuk a szeleteket 30%-os glicerolt tartalmazó PB oldatban 4 C°-on. A metszetekből kivágtuk a hippokampuszt, majd ezt követően jó hővezető réz-korongok közé szorítva nagynyomású fagyasztógéppel (high-pressure freezing machine, HPM 100; BAL-TEC, Balzers, Lichtenstein) folyékony nitrogén hőmérsékletűre hűtöttük, majd a fagyott metszeteket kettős replika asztalba helyeztük, és -140 C°-on kettőtörtük. A fagyasztva tört felszíneket 8 nm vastag szén, 2 nm vastag platina, végül 15 nm vastag szén depozíciójával replikáltuk a fagyasztva-törő replika gépben (freeze–fracture replica machine, BAF 060; BAL-TEC). 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% szarvasmarha szérum albumint (BSA; Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) 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 μ g/ml, GluN2A 10 μ g/ml, GluN2B 8 μ g/ml blokkoló oldatban hígítva) oldatában inkubáltuk egy éjszakán át szobahőmérsékleten. TBS mosásokat követően a GABA_AR β 3 alegység elleni (1:25, tengerimalac szérum, Prof. Shigemoto R. laborjából; (Kasugai et al., 2010) elsődleges 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 GABA_AR 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 parallel sávos réz gridekre szedtük fel. A kiértékelést Philips Tecnai 10 és Hitachi H-7100 típusú elektronmikroszkópon végeztük. A replika minták esetében a membrán kettétöréséből kifolyólag megkülönböztetjük a citoplazmatikus (P) oldal felé tekintő és az extracelluláris tér (E) felé tekintő törési felszínt. Ebből kifolyólag C-terminális antitesttel készült immunarany jelölést a P-oldalon, N-terminális antitesttel készült reakciót az E-oldalon lehet detektálni. A membránba ágyazott fehérjék (IMP) jellegzetes képet adnak a replikának (lásd 8.ábra).

V.10.1. GABAerg szinapszisok meghatározása a replikált piramis sejtek felszínén

A replika jelölés egyik nagy előnye, hogy a szinapszisokat nem kell számos metszetről rekonstruálni, mert egyből látható az egész szinapszis a replikált piramis sejt felszínén (8. ábra). A fagyasztott metszetek gyakran törnek a szomatikus membrán mentén, feltárva ezzel a membránban elhelyezkedő fehérjéket. A GABA_AR jelölés bedúsulása alapvető jellegzetessége a GABAerg szinapszisoknak (8. ábra).

A klasszikus immunhisztokémiai módszerek esetében a szövetminta gyantába van ágyazva, és a szinapszisok azonosítása legtöbbször a szinaptikus résre merőleges metszési síkból történik. A pre- és posztzinaptikus struktúrák jól láthatóak, a szinapszis széleinek megállapítása jól meghatározott. A replikált szinapszisok viszont mások. A fagyasztva tört replikák felszínén a transzmembrán fehérjék (intramembrane particles, IMP-k) sűrűsége valamivel nagyobb a feltételezhetően GABAerg szinapszisokban, mint az extraszinaptikus membránfelszíneken. Mivel azonban nem minden IMP csoportosulás jelent GABAerg szinapszist, mi kizárólag a GABA_AR jelölés lokális sűrűségét használtuk a GABAerg szinapszisok határainak meghúzásához (8. ábra). Röviden, a kettős immunarany reakció után hatalmas piramis sejt felszíneket (körülbelül 60 μm^2 területet minden neuronból) rekonstruáltunk nagy nagyításon 100-200 elektronmikroszkópos képet készítve sejt felszínenként. A Adobe Photoshop CS4 Extended program felhasználásával egy sugárirányú szűrkeségi gradienst fektettünk minden egyes GABA_AR immunarany részecskére (ez a gradiens olyan, mint egy korong). A GABA_AR immunarany részecske pontosan a középpontjában helyezkedett el ennek a gradienskorongnak.



8. ábra *A piramis sejtek sejttestének felszínén lévő GABAerg szinapszisok meghatározása fagyasztva-tört replika mintákon.*

A, Az elektronmikroszkópos ábrán immunarany kísérletből származó piramis sejtek sejttest-membránjának sejtplazma felőli oldala (P-oldal) látható. A GABA_A receptor β 3 alegységének immunarany jelöléséből származó arany szemcsé-csoportok (10 nanométeres fekete szemcsék, fekete nyíllal jelölve) jól illeszkednek a membránba ágyazott részecskék (IMP: intramembrán partikulum) csoportosulásaiával (nyílhegyek). Az NMDA receptor jelölés (ez esetben GluN2A, 5 nanométeres fekete szemcsék, fehér nyíllal jelölve) szintén asszociálódott a GABA_A receptor jelöléssel.

B, Mivel IMP csoportosulások GABA_AR jelölés nélkül is vannak a sejttestek felszínén, ezért a szinaptikus terület meghatározásának alapját a nagy sűrűségű GABA_AR jelölés képezte. A B ábrán piros jelöléssel látható a GABA_AR immunarannyal jelölt helyzete. Fekete-fehér gradienssel tettük láthatóvá a GABA_AR helyi sűrűség-eloszlását. Egy adott sűrűség-értéket meghatározva húztuk meg az általunk szinapszisként vett terület határát (fehér vonallal jelölve az ábrán). Mivel replika mintákon nem használhatók a szinapszis meghatározás klasszikus morfológiai kritériumai, ez az elfogultság nélküli sűrűség-

kritérium került alkalmazásra a kísérletsorozatban. Mivel azonban ez feltehetőleg nem egyezik meg a klasszikus szinaptikus területtel, ezért megkülönböztettképpen szinapszis-asszociált területnek neveztük. Ezzel a módszerrel az NMDA-receptor jelölés elhelyezkedése semmilyen módon nem tudta befolyásolni a szinaptikus terület meghatározását.

C, A szinapszis-asszociált terület meghatározása (fehér vonallal jelölve) után az ábrán sárga színnel jelöltük meg az NMDA receptort jelölő aranszemcsék helyzetét.

D, Ezt követően végeztük el az NMDA-receptorok (sárga jel) mennyiségi vizsgálatát a szinapszis-asszociált területen belül és kívül. Lépték: 100 nm

A gradiens kiterjedése a 10 nm-es aranszemcse szélétől számítva 200 nm hosszúságig terjedt. A szürkeségi skála maximális értéket vett fel az arany szemcse felett és nulla értéket 200nm távolságra (a korong szélén). A szürkeségi skála értékei lineárisan csökkentek a korong széle felé haladva. Tekintve, hogy ezek a szürkeségi gradiensek minden egyes arany szemcse fölé lettek helyezve, nagy részük átlapolódott egymással, főleg a szinapszisokban. Az átlapolódott szürkeségi értékek a sejtfelszínről készült fotó minden adott pixelének esetében összegezve lett, ami egy új szürkeségi térképet hozott létre a GABA_AR jelölés sűrűségének függvényében (8. ábra, a könnyebb bemutatathóság kedvéért a folyamatos szürkeségi skála értékei szürkeségi lépésekbe lettek átváltva). A összegzet szürkeségi intenzitások kirajzoltak sejtfelszíni területeket, melyeknek magas a GABA_AR jelölés sűrűsége. Miután meghatároztunk egy megfelelő szürkeségi értékhatárt, a feltételezett szinaptikus területeket körül lehetett határolni pusztán a sejtfelszíni lokális GABA_AR jelölés sűrűsége alapján. Végül a körülhatárolt szinaptikus területeket lemértük, és az immunarany-jelölt NMDA receptorokat megszámloltuk a szinapszis határain belül. A körülhatárolási eljárás fő célja nem az volt, hogy újraalkossuk pontosan ugyanazt a szinapszis definíciót, amit klasszikusan a pre- és posztzinaptikus struktúrák megfigyelésével könnyűszerrel meg lehet tenni, ha a szinaptikus rés síkjára merőleges a metszési síkunk. A célunk az volt, hogy találjunk olyan GABA_AR asszociált területeket (ebben a munkában egyszerűen: GABAerg szinapszisok), melyeket elfogatlanul tudunk körbehatárolni. Ha egyszer a határvonal meg lett húzva, azt minden egyes kísérleti mintán alkalmaztuk, függetlenül attól, hogy az NMDA-R immunarany szemcséknek milyen az elhelyezkedése. Összegezve, ez a

módszer lehetővé tett egy olyan elfogulatlan megközelítést, mellyel tesztelhető az NMDA receptorok GABAerg szinapszisokhoz való asszociációja a replika mintákon.

V.11. Farmakológiai kísérletek túlélő szeleten, cGMP immunfluoreszcens kísérletek

A túlélő szeletek elkészítéséhez az egereket ($n=10$ C57Bl/6 és $n=4$ nNOS $^{-/-}$) mély izoflurán anesztéziában dekapitáltuk, az agyakat eltávolítottuk a koponyából, majd „vágó-oldatban” (szaharóz: 204,5mM; glükóz: 10mM; KCl: 2,5mM; NaH₂PO₄: 1,25mM; CaCl₂·2H₂O: 0,5 mM; MgCl₂·6H₂O: 5mM; NaHCO₃: 26mM) 300 μ m vasagságú koronális hippokampusz szeleteket metszettünk Leica VT1000S típusú vibratómon. A kísérletek előtt a szeleteket 1 órán át inkubáltuk karbogén gázzal (95%O₂/5%CO₂) telített mesterséges agy-gerivelői folyadékkal (artificial cerebrospinal fluid, ACSF: NaCl: 126mM; glükóz: 10mM; KCl: 2,5mM; NaH₂PO₄: 1,25mM; CaCl₂·2H₂O: 2mM; MgCl₂·6H₂O: 2mM; NaHCO₃: 26mM) töltött ún. felszíni kamrában szobahőmérsékleten. Ezt követően a szeleteket 12 kamrás steril sejtkultúrás tálba (12-well cell-culture plate, TPP, Switzerland) raktuk, ahol minden egyes kamrát egyénileg, egyenlő mértékben buborékolattunk karbogén gázzal. Minden kamrát 1 ml módosított ACSF (mACSF) oldattal töltöttünk meg, ami 1 mM IBMX és 100 μ M BAY-736691 típusú foszfodiészteráz-gátlót (PDE-gátlókat, hogy elkerüljük a cGMP hidrolízisét) és 0,2 mM L-arginint (az nNOS szubsztrátját) tartalmazott. Az L-argininnek ebben a koncentrációban (0,2 mM) önmagában semmilyen hatása sincsen az nNOS aktivitásra és a cGMP szintézisre (Garthwaite et al., 1989). 20 perces mACSF oldatban történő előkezelés után a kontroll kamrához nem adtunk semmit, míg 200 μ M SNP-t (NO donort) adtunk 10 percre az “SNP-kamrákhoz” és 5 μ M NMDA-t adtunk 3 percre az “NMDA-kamrákhoz”. Pontosan ugyanolyan régió-specifikus cGMP jelölést figyeltünk meg, ha 5, 30, 150 vagy 300 μ M NMDA-t adtunk a szeletekhez. Azokban a kísérletekben, ahol az nNOS-t, NOsGC-t, a feszültségfüggő kalcium csatornákat (VDCC) vagy az NMDA-receptorokat gátoltuk, az előinkubáláshoz használt mACSFoldatot 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 4%-os paraformaldehid fixálóra cseréltük, majd a szeleteket 48 órán át tovább fixáltuk ugyanebben az oldatban 4°C-on. A cGMP immunfluoreszcens megjelenítéséhez a szeleteket 2%-os agarba ágyasztuk, és Leica VT1200S típusú vibratómon a 300µm vastag szeleteket újrametszettük 50µm vastagságúra. Miután 0,9% NaCl-ot és 0,3% Triton X-100-at (Sigma) tartalmazó foszfát pufferben (PBST) 1 órán át mostuk a metszeteket, PBST-ben oldott 5% normál szamár szérummal (Vector Laboratories) 1 órán keresztül blokkoltuk a metszeteket. Ezt követte az elsődleges antitestek oldata: bárányban készült cGMP ellenes (Prof. J. de Vente laboratóriumából, 1:4000) és kettős immunfluoreszcens jelölés esetén egérben készült glutamát-dekarboxiláz 65 (GAD65; Millipore, MAB351, 1:250) ellenes antitesteket hígítottuk PBS-ben. Számos PBS mosást követően a kettős jelölés esetében szamárban termeltetett biotin-kötött egér ellenes antitestet (1:200, Jackson Laboratories) használtunk PBS-ben. PBS mosások után az összes metszetet fluorokrómmal jelölt másodlagos antitestek keverékében inkubáltuk a metszeteket: : Alexa Flour 488 (bárány elleni szamár IgG, 1:200, Invitrogen) és Alexa Fluor 594 (streptavidin, 1:200, Invitrogen) PBS-ben oldva. Alapos PBS és PB mosás után a metszeteket mikroszkópos tárgylemezre szedtük ki és Aqua-Poly/Mount (Polysciences, Europe) hozzáadásával fedtük le fedőlemezzel. Az egész kísérletsorozatot megismételtük olyan mACSF oldattal, melyhez hozzátettünk 1 µM tetrodotoxint (TTX), de nem tartalmazott magnézium-ionokat. A kísérleteket Olympus Optical FluoView300 pásztázó konfokális lézer mikroszkóppal vagy Zeiss Axioplan 2 epifluoreszcens mikroszkóppal értékeltük ki.

V.12. Statisztikai analízisek

Az nNOS és az NOsGC sejttest szintű elhelyezkedésének meghatározására irányuló fluoreszcens kísérletek során minden patkány dorzális hippokampuszából szisztematikus véletlenszerű módon hat 40 µm vastag koronális metszet került tesztelésre kolokalizációnként a hippokampusz teljes rosztro-kaudális kiterjedésében. A kolokalizációt csak abban az esetben vizsgáltuk, ha a sejt sejtmagja detektálható volt, hogy biztos legyen, hogy a sejt nagy része vizsgálható. Minden vizsgált sejt esetében

mérésre került a sejt keresztmetszeti területe. A mérendő sejtek kiválasztása egy, a képekre szisztematikus véletlenszerű módon elhelyezett háló segítségével történt. Azok a sejtek, melyek kiválasztásra kerültek, a továbbiakban egyénileg alapos vizsgálat tárgyát képezték. 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, az arányszámok kvantitatív mérését végeztünk el Abercrombie korrekció (Abercrombie, 1946) használatával kiegészítve.

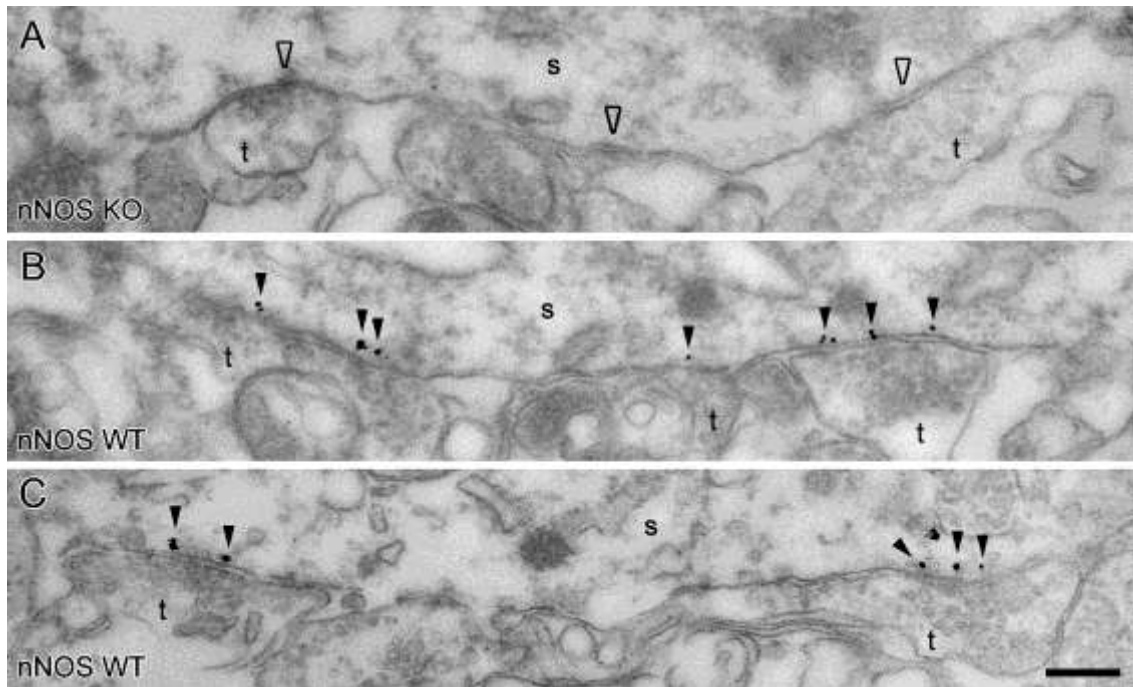
Abban az esetben, amikor az adatok Gauss-eloszlást mutattak a Shapiro-Wilks's W-teszt alapján, parametrikus statisztikai jellemzőket alkalmaztunk (átlag \pm standard deviáció). Az adatok nagy része azonban nem mutatott Gauss-eloszlást, így nem-parametrikus statisztikákat használtunk, ez esetben pedig a nemparametrikus jellemzőket adtuk meg (medián, interkvartilis távolság). A kétszoportos összehasonlítást a nem-parametrikus Mann–Whitney U-teszttel, a sokcsoportos összehasonlítást a szintén nem-parametrikus Kruskal–Wallis teszttel végeztük el. Azokban a mérésekben, amikor az arany szemcsék 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.

VI. EREDMÉNYEK

Az Eredmények fejezetben először a nitrogén-monoxid jelátvitel egyes elemeinek vizsgálatát célzó kísérletsorozat eredményeinek bemutatására kerül sor (VI.1.-VI.5.). Ezt követően a NO jelpálya GABAerg szinapszisokban bekövetkező aktiválásának lehetséges mechanizmusai kerültek középpontba, így a második kísérletsorozat az NMDA receptorok aktiválásának hatására jelentkező NO jelátvitelre (VI.6.) és az NMDA receptorok GABAerg szinapszisokhoz való elhelyezkedésére (VI.7.-VI.9.) irányult.

VI.1. A neuronális nitrogén-monoxid szintáz (nNOS) asszociálódik a GABAerg szinapszisok posztzinaptikus denzitásával a CA1 piramis sejtek sejttestén, dendritjén és axon iniciális szegmentjén

Korábban már kimutatták, hogy a nitrogén-monoxidot előállító enzim, az nNOS a piramis sejtek serkentő szinapszisainak posztzinaptikus oldalán található meg (Blackshaw et al., 2003; Burette et al., 2002; Wendland et al., 1994). 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 egérben és patkányban is. Egyazon kísérletben készített nNOS immunarany jelölés teljesen hiányzott az nNOS génkiütött egerek metszeteiből (9. ábra, A), míg a vad típusú egerekben erősen jelölt szomatikus szinapszisok voltak láthatók (9. ábra, B, C). Az immunarany jelölés ráadásul nem véletlenszerű módon asszociálódott a piramis sejtek membránjához, hanem specifikusan halmozódott fel a szimmetrikus szinapszisokban (9. ábra B, C, 10. ábra A, D-H) éppúgy, mint az aszimmetrikus tüske szinapszisokban (10. ábra, B, C, N, O). Az immunarany jel relatív lineáris sűrűségméréséből kiderült, hogy míg a jelsűrűség a szimmetrikus szinapszisok aktív zónájában $\sim 1,35 \pm 0,31$ aranszemcse/ μm membrán (átlag \pm S.D.) volt, addig mindössze $0,03 \pm 0,02$ aranszemcse/ μm sűrűség volt a szinapszis közeli extraszinaptikus membránterületeken.

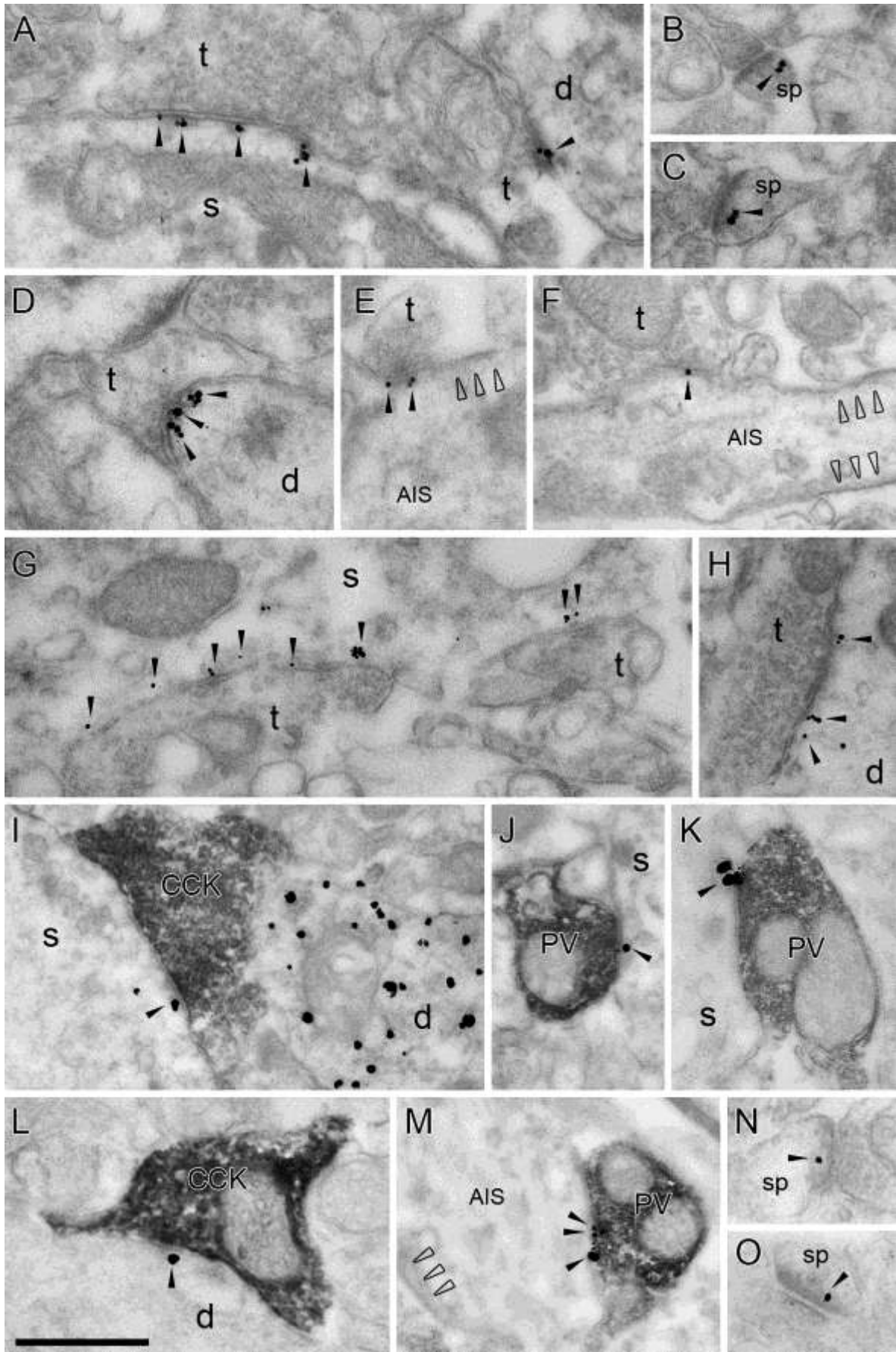


9. Ábra. Az elektronmikroszkópos felvételeken nNOS-ellenes immunarany jelölés látható szimmetrikus szinapszisok posztszinaptikus oldalán, illetve a jelölés teljes hiánya az nNOS-génkiütött (KO) állatban.

(A) A beágyazás előtti immunhisztokémiai reakció után készített felvételek az nNOS immunarany-jelölés teljes hiányát mutatják nNOS KO egér szinapszisaiban (üres nyílhegyek), melyeket axonterminálisok (t) létesítenek posztszinaptikus sejttesteken (s). (B, C) Ugyanebben a kísérletben a vad-típusú (WT) egerekből származó mintákban erőteljes jelölés figyelhető meg a GABAerg szinapszisokban. Az ezüsttel intenzifikált immunarany szemcsék (fekete nyílhegyekkel jelölve) a szimmetrikus GABAerg szinapszisok posztszinaptikus denzitásában vannak jelen. Lépték: 0,5 μm .

Némi jel megfigyelhető volt még a piramissejt citoplazájában az endoplazmás retikulum ciszternái felett, és erős jelölődést figyeltünk meg az nNOS pozitív interneuronok sejttestében és dendritjeiben (10. ábra, I). A piramissejtek sejttestét 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 szomatikus terminálisoknak (lásd III.3.4.2. alfejezetben, (Nyíri et al., 2001a). Az egér hippocampusban teljesen

rekonstruált szimmetrikus szinapszisokat vizsgáltunk, és azt találtuk, hogy a teljesen rekonstruált szomatikus 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) (9. ábra *B*, *C*, és 10. ábra *A*), míg az axon iníciaális szegmenten (AIS) rekonstruált szinapszisoknak legalább 32%-a (medián, az alábbi arányokból: 7/22, 10/26 és 6/20 a 3 egérben) (10. ábra, *E*, *F*) bizonyult pozitívnak az arany szemcsék posztszinaptikus denzitáshoz való asszociációja alapján. Feltehetően ez az adat alulbecsli az nNOS-t tartalmazó szinapszisok valós számát, mivel igen nagy mennyiségben található meg horgonyzó és egyéb fehérjék a posztszinaptikus denzitásban, nehezítve a szinapszist felépítő fehérjék immunhisztokémiai detektációját. Mivel a periszomatikus GABAerg gátlást összesen háromféle interneuron látja el (a CCK- és PV-pozitív kosársejtek és a PV-pozitív axo-axonikus vagy más néven kandeláber-sejtek, lásd a III.3.4.2. alfejezetben), így ezek az adatok jól interpretálhatók. Más a helyzet azonban a dendriteken lévő szinapszisokkal, amit számos interneuron innervál (lásd a III.3.4.1. alfejezetben), ezért a dendritikus szinapszisok elektronmikroszkópos mérését nem végeztük el. Mindazonáltal számos dendritikus szimmetrikus szinapszist intenzíven pozitívnak találtunk mindhárom egérben. Az egér hippocampuszhoz hasonlóan a patkány hippocampusz szomatikus (10. ábra, *G*, *I-K*), dendritikus (10. ábra, *H*, *L*) és AIS (10. ábra, *M*) szinapszisa is számos esetben nNOS immunarany jelöltek voltak. A patkányban végzett kísérletek során immunarany-immunperoxidáz kettős festést is végeztünk, hogy direkt kolokalizáljuk az nNOS immunarany jelölést a CCK és PV immunreaktív terminálisok teljesen rekonstruált szinapszisaiban. Azt találtuk (mindhárom vizsgált patkányban), hogy az nNOS jelen volt a posztszinaptikus aktív zónában mind a CCK, mind a PV által képzett szomatikus szinapszisokban (10. ábra, *I-K*), a PV-pozitív terminálisok szinapszisaiban, melyek az AIS-en végződnek (10. ábra, *M*) és a dendritre érkező CCK-pozitív és negatív terminálisok szinapszisaiban is (10. ábra, *L*). Tekintve, hogy a különböző interneuronok a piramissejtek különböző sejt felszíni doménjeit célozzák, ez azt jelenti, hogy legalább öt különböző interneuron típus piramissejtre érkező szinapszisaiban megtalálható az nNOS posztszinaptikusan. Az NO receptorának eloszlása a hippocampuszban tovább erősítette ezt a megállapítást (lásd alább).

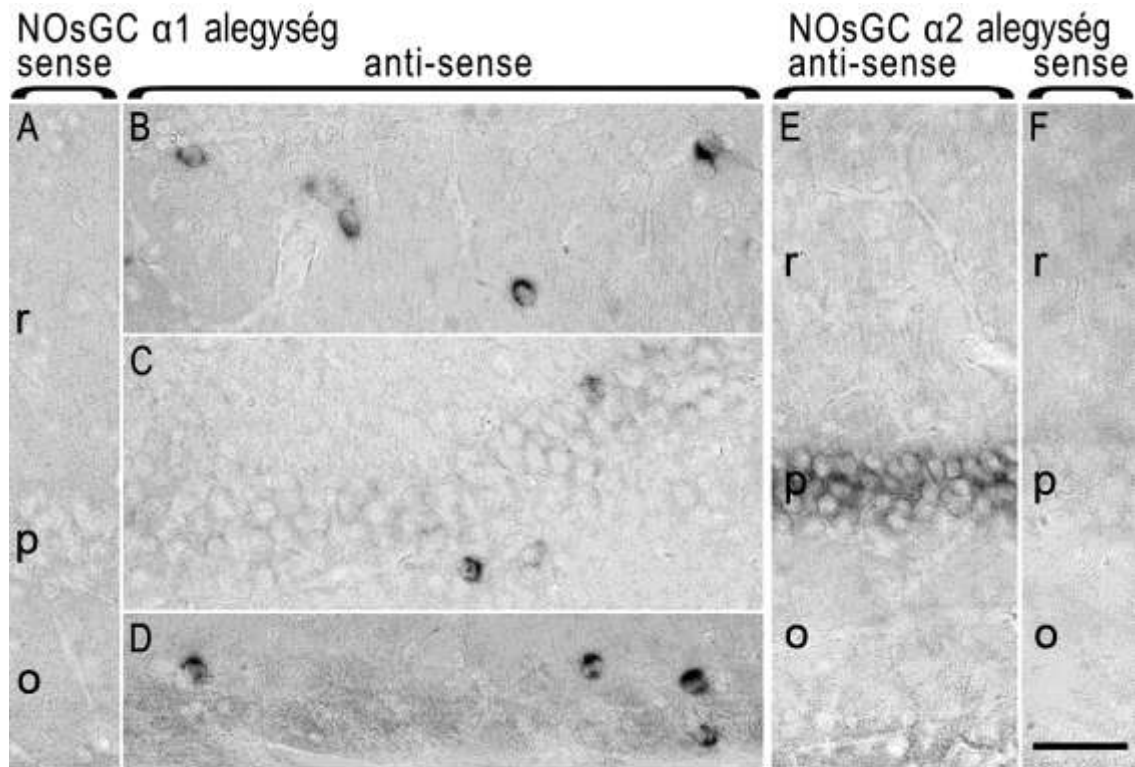


10. Ábra. Az elektronmikroszkópos felvételeken nNOS-ellenes immunarany jelölés látható egerek és patkányok szimmetrikus és aszimmetrikus szinapszisok posztzinaptikus oldalán.

Az nNOS-ellenes immunarany jelölés az egér (A–F) és a patkány (G–O) hippocampusának CA1 régiójában nem csak az aszimmetrikus (sp) (B, C, N, O), hanem a szimmetrikus szinapszisok posztzinaptikus denzitásában is jelen van. A jelölés megfigyelhető sejttestre (A, G, I–K), dendritekre (A, D, H, L), és axon-iniciális szakaszokra (AIS, a jellegzetes membrán-alatti sötét sávot üres nyílhegyek jelölik, E, F, M) érkező szinapszisok sorozatmetszeteiben. Az nNOS posztzinaptikusan van jelen mind a kolecisztokinint (CCK, I, L), mind pedig a parvalbumint (PV, J, K, M) tartalmazó terminálisok szinapszisaiban. I, Az nNOS-pozitív interneuronok dendritjei (d) is erős jelölést mutatnak. t, terminális; s, sejttest; d, dendrit; sp, túske. Lépték: 0,5 μ m.

VI.2. Az NO receptor α_1 és α_2 alegységének sejt típus specifikus mRNS megoszlása a hippocampusban (társ-munkacsoport munkája)

Ahogy a bevezetésben részleteztem (III.5.4. alfejezet), kétféle alegység összetételű funkcionálisan fontos 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, társ-munkacsoport segítségével készített *in situ* hibridizációs kísérletekből (amit kromogén pufferben oldott 5-bromo-4-kloro-3-indolyl-foszfát és nitro-kék tetrazolium-klorid segítségével jelenítettek meg) kiderült, hogy az α_1 alegység mRNS csak interneuronokban volt jelen (11.ábra, A–D), és ezeket az idegsejteket a patkány hippocampus CA1 régiójának minden rétegében megfigyeltük. Az NO receptor α_2 alegység mRNS viszont hiányzott az interneuronokból, és kizárólag piramissejteken volt jelen a CA1 hippocampális régióban (11.ábra, E, F). A kísérleteket egerekben is elvégeztük, és azonos eredményre jutottunk.

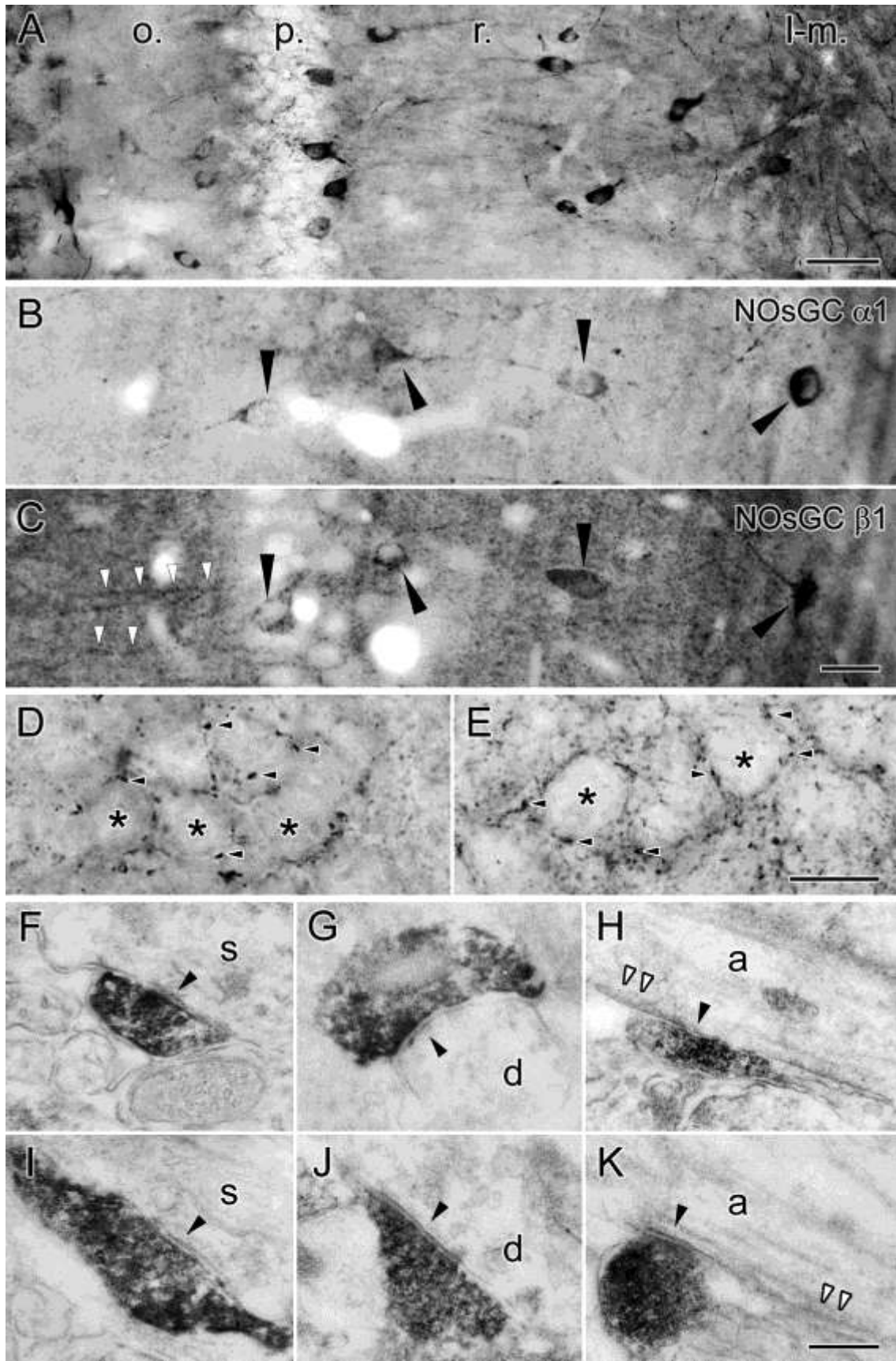


11. Ábra. Az NOsGC α_1 és α_2 alegységek mRNS eloszlása a hippocampusz CA1 területén

A fénymikroszkópos felvételeken a két alegység elkülönülő mRNS jelölése látható patkány hippocampuszban. A sense próbák nem adtak jelet sem az NOsGC α_1 (A), sem pedig az α_2 (F) alegység esetében. Az α_1 alegység kizárólag interneuronokban volt kimutatható a stratum radiatum (B), stratum pyramidale (C) és stratum oriens/alveus (D) rétegekben. Ezzel szemben az α_2 alegység csak a piramis sejtekben volt jelen (E). A leírttal egyező jelölés figyelhető meg egérben is (nincs bemutatva). r, str. radiatum; p, str. pyramidale; o, str. oriens. Lépték: 50 μm .

VI.3. Az NOsGC α_1 alegység megtalálható az interneuronokban és azok terminálisaiban, de hiányzik a piramis sejtekből

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



12. Ábra. Fény- és elektronmikroszkópos felvételeken beágyazás előtti immunperoxidáz reakció jeleníti meg az NOsGC eloszlását egérben és patkányban.

A, Fénymikroszkópos felvételeken az NOsGC $\alpha 1$ alegység általános eloszlása figyelhető meg a hippokampusz rétegeiben (o., str. oriens; p., str. pyramidale; r., str. radiatum; l-m., str. lacunosum-moleculare). B, C, Tükörkép kísérletekből származó felvételek mutatják, hogy a metszetek felszínén kettévágott interneuronok (nyílhegyek) mind az $\alpha 1$ (B), mind pedig a $\beta 1$ (C) alegységét kifejezik az NO-receptornak. A fehér nyílhegyek $\beta 1$ alegységet kifejező, a metszet felszínéhez közel elhelyezkedő piramissejt-dendritekre mutatnak. D, E, Nagyobb nagyítású felvételen jól látható, hogy az $\alpha 1$ alegység jelen van a piramissejtek (csillagokkal jelölve) kosarakat képző terminálisokban (nyílhegyek) mind egérben (D), mind pedig patkányban (E). F-K, Az elektronmikroszkópos felvételeken $\alpha 1$ alegységet kifejező terminálisok figyelhetők meg, melyek szinapszisokat létesítenek a piramissejtek sejttestén (s; F, I), dendritjein (d; G, J), és axon-iniciális szakaszain (a; H, K; a jellegzetes membrán-alatti sötét sávot fehér nyílhegyek jelölik) egérben (F-H) és patkányban (I-K). Lépték: A, 50 μ m; B, C, 25 μ m; D, E, 10 μ m; F-K, 250 nm.

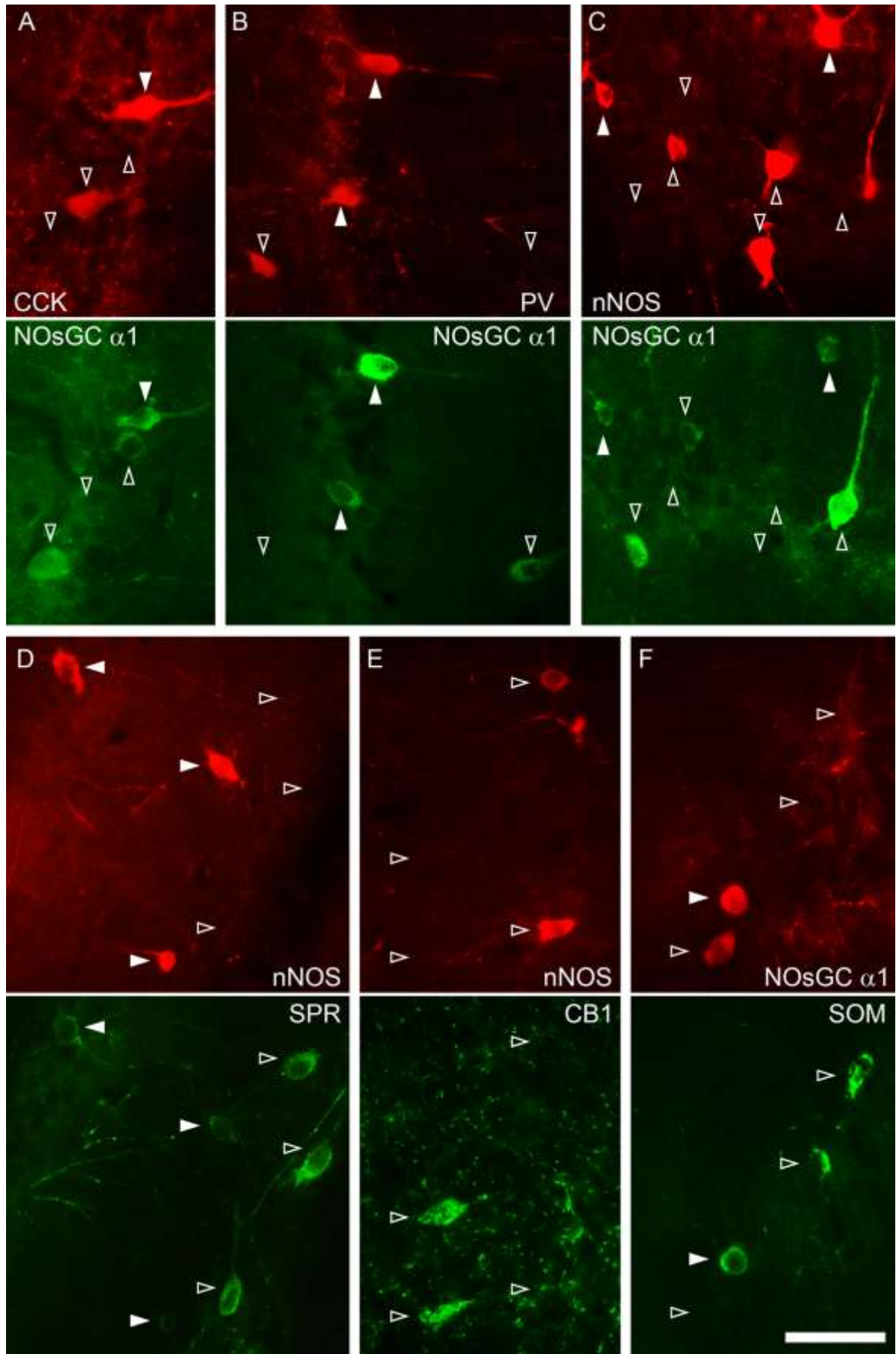
Azt is megvizsgáltuk, vajon a heterodimer másik alegysége, a $\beta 1$ alegység is megtalálható ezekben a sejtekben. A festődési mintázat egérben és patkányban azonos volt. Eredményeink azt mutatták, hogy az mRNS eloszlásához hasonlóan, az $\alpha 1$ alegység fehérje a hippokampusz alveus - stratum lacunosum-moleculare tengelyen számos interneuronban erősen jelen volt (12. ábra, A). Alkalmanként gyengébben festődő interneuronokat is észleltünk. Az interneuronok legerősebben festődő területei a sejttest, a proximális dendrit és az axonok voltak. Fénymikroszkóposan a stratum pyramidale-ban a piramissejtek körül kosársejt-terminális festésre emlékeztető jelölést kaptunk mindkét fajban (12. ábra, D, E). Ezt megerősítendő, elektronmikroszkóppal vizsáltuk meg az immunperoxidáz festett metszeteket. Ennek során véletlenszerűen gyűjtött terminálisokat rekontruáltunk az egér hippokampuszban, és azt találtuk, hogy a szomatikus terminálisoknak legalább ~79%-a (medián százalék az alábbi arányokból: 20/23, 18/24 és 23/29 a 3 egérben) (12. ábra, F), az AIS terminálisoknak pedig legalább 42%-a (medián százalék az alábbi arányokból: 10/21, 4/21 és 8/19 a 3 egérben) (12. ábra, H) volt pozitív az NOsGC $\alpha 1$ alegységre. Ezenkívül mindhárom egérben számos

dendritikus szimmetrikus szinapszist létesítő terminálist is találtunk, ami erős pozitivitást mutatott az α_1 alegységre (12. ábra, *G*). Hasonlóan az egér hippocampuszhoz, a rekonstrukció során patkányban is számos α_1 alegység pozitív szomatikus (12. ábra, *I*), dendritikus (*J*) és AIS (*K*) terminálist találtunk. Ezentúl patkányban a β_1 alegység eloszlását is megvizsgáltuk elektronmikroszkópos szinten, és ahogy várható is volt számos GABAerg terminális pozitivitást mutatott β_1 alegységre (nincs bemutatva). Ezek az eredmények megerősítették, hogy ezek a GABAerg terminálisok kifejeznek $\alpha_1\beta_1$ alegységösszetételű NO receptort, és elhelyezkedésükből kifolyólag alkalmasak a piramissejtekből érkező retrográd NO jelátvitel detektálására. Az α_1 alegység mindig heterodimert képez a β_1 alegységgel. Megvizsgáltuk, léteznek-e olyan interneuronok, melyek esetleg nagy mennyiségben kifejezik a β_1 alegységet α_1 alegység nélkül, ezért kolokalizációs kísérleteket végeztünk a patkány hippocampusz interneuronjain az α_1 és β_1 alegység között (12. ábra, *B, C*).

Mivel mindkét antitest nyúlban készült, így a direkt kolokalizáció nem megvalósítható, éppen ezért az úgy nevezett “tükörkép-módszer” (Kosaka et al., 1985) használtuk, mely során az egyik metszet felszínén félbevágott sejtek vizsgálhatók a szomszédos metszeten. Ennek megfelelően az egyik metszetet α_1 alegység ellenes, a szomszédos metszetet pedig β_1 alegység ellenes antitesttel inkubáltuk. A vártak megfelelően a β_1 alegység mind a piramissejteket (főként dendritek) (Burette et al., 2002a; Ding et al., 2004), mind interneuronokat (főleg sejttestek, proximális dendritek és terminálisok), míg az α_1 alegység ellenes antitest csak interneuronokat jelölt. Azt találtuk, hogy gyakorlatilag az α_1 alegység pozitív interneuronok mind β_1 alegység pozitívak is voltak (négy patkányból: 27/27, 41/42, 34/37 és 18/19), és fordítva, a β_1 alegység pozitív interneuronok α_1 alegység pozitívak is voltak (négy patkányból: 28/29, 41/43, 39/40 és 16/17; néhány ál-negatív sejt előfordulhat a metszetekben az α_1 alegység „szolubilis” azaz nem lehorgonyzott természetéből kifolyólag, vagy abból eredően, hogy a metszetkészítés közben a sejttestek egy kisebb-nagyobb darabja elveszhet). Amellett, hogy az α_1 alegység ellenes antitest specificitását ezzel igazoltuk, ezek az eredmények azt is sugallják, hogy mivel nincs β_1 alegység pozitív interneuron α_1 alegység nélkül, ezért nincs olyan interneuron, ami csak $\alpha_2\beta_1$ alegységösszetételű receptort tartalmazna, ami összhangban van az *in situ* hibridizációs eredményeinkkel miszerint α_2 alegység mRNS hiányzott az interneuronokból.

VI.4. Mind a periszomatikus, mind a dendritikus GABAerg neuronok tartalmazzák NOsGC α_1 alegységet

Ahogy korábbi kísérleteinkből már látható volt, az NOsGC α_1 alegység mRNS-e számos interneuronban kifejeződött, és fehérje szinten is számos α_1 és β_1 alegységet tartalmazó interneuron festődött, de korántsem 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 (lásd a III.3.4. alfejezetet) tartalmazzák-e ezt az NO receptort. Habár nincs adat az összes felsorolt sejtjelölő anyag direkt kolokalizációjára a patkány hippokampusz CA1 régiójában, indirekt megfigyelések alapján gyakorlatilag ez a négy sejtmarker különböző, át nem lapolódó interneuron populációt alkot (Freund, 2003; Freund and Buzsáki, 1996; Jinno and Kosaka, 2000, 2002, 2004, 2006; Seress et al., 2005). Az általános festődési mintázat ezekre a sejtjelölő anyagokra hasonló volt a korábban leírtakhoz. Az NOsGC α_1 alegység elleni immunfluoreszcens jel megfelelt a korábban immunperoxidáz (DAB) módszerrel kapott festődésnek (lásd a fenti fejezeteket). Sejtmag festést nem tapasztaltunk. Az α_1 alegység festésénél különböző immunfluoreszcens intenzitású jelet kaptunk, azonban azt nem vizsgáltuk, hogy az α_1 jelintenzitás és a különböző interneuron markerek korrelálnak-e egymással. Vékony axonszerű nyúlványokat szintén megfigyeltünk a neuropil körül az immunfluoreszcens festéssel is (13. ábra). A patkány dorzális hippokampusz CA1-ben jelölt interneuronjainak véletlenszerű mintavételezése és vizsgálata után (részletes leírás a V.12. alfejezetben található) a következő median arányokat kaptuk (zárójelben egy adott kolokalizációra tesztelt sejtek száma található a három patkányból, illetve az egyes állatokból származó százalékos értékek külön-külön): az összes vizsgált NOsGC α_1 pozitív sejt közül ~21% ($n = 1383$; 23, 15 és 21%) volt CCK pozitív (13/A), 40% ($n = 1527$; 38, 41 és 40%) volt PV pozitív (13/B), 11% ($n = 1322$; 11, 10 és 20%) nNOS (13/C) és 7% ($n = 1599$; 4, 7 és 7%) SOM pozitív volt (13/F). Az interneuron jelölő anyagok oldaláról vizsgálva az NOsGC α_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 α_1 pozitív.



13. Ábra. Az NOsGC α_1 alegységének immunfluoreszcens kolokalizációja különböző interneuronmarkerekkel a patkány hippocampusz CA1 régiójában.

A fluoreszcens mikroszkópos felvételeken látható, hogy az NOsGC α_1 alegysége részben kifejeződik a CCK (A), PV (B), nNOS (C), vagy SOM (F) pozitív interneuronokban. D, Az nNOS és a SPR jelölés ugyancsak részben átfed, azonban a CB₁R és az nNOS soha nem volt együtt kimutatható (E). A nyílhegyek markereket együttesen kifejező sejteket jelölnek, az üres nyílhegyek a nem kolokalizáló sejteket mutatják. Lépték: 50 μ m.

Habár direkt és indirekt adatok azt sugallták, hogy ez a négy interneuron jelölő anyag 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 (Hájos et al., 2000; Katona et al., 1999), ezért CB1 receptor-nNOS kettős immunfluoreszcens festéssel teszteltük a lehetséges kolokalizációt (13. ábra, E), de a véletlenszerű minta elemzése során nem találtunk kettősen jelölt sejteket ($n = 206$ CB1-pozitív sejt összesen három patkányból). Vruwink és mtsai. (Vruwink et al., 2001) eredményei alapján feltételezhető volt, hogy reciprok kémiai összeköttetés van két gátló hálózat közt az agykéregben. Az egyik populáció P-anyag receptor (SPR) és nNOS pozitív volt, míg a másik P-anyag és NOsGC pozitivitást mutatott. Eredményeik alapján a nagyagykéregben 94-95%-os átfedés mutatkozott mindkét irányban az nNOS és SPR pozitív sejtek között. Éppen ezért azt is megvizsgáltuk, ugyanilyen erős átfedés van-e a hippocampusz nNOS és SPR tartalmú sejtei közt. Eredményeink azt mutatták, hogy a hippocampuszban ez az átfedés messze eltér az agykéreghez képest, szám szerint a vizsgált SPR pozitív sejtek ~47%-a ($n = 709$; 47, 41 és 50%) volt nNOS tartalmú, míg az nNOS pozitív sejtek ~43%-a ($n = 654$; 43, 37 és 68%) bizonyult SPR tartalmúnak (13. ábra, D).

VI.5. Az NOsGC α_1 alegység tartalom és bizonyos interneuron típusok sejttest mérete közti korreláció

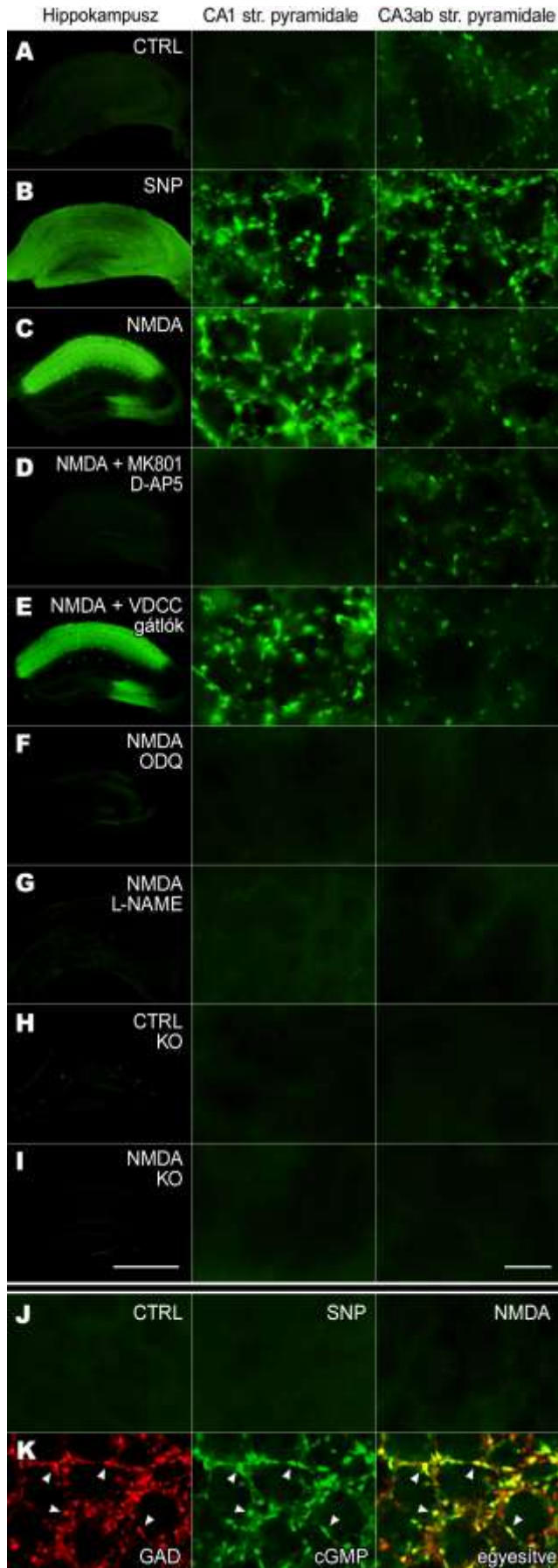
Sok esetben egy idegsejt funkciója vagy metabolikus állapota összhangban van a sejttestének méretével, ezért megvizsgáltuk, hogy a különböző interneuronok mérete

korrelál-e az NOsGC α_1 alegység tartalmával. Megmértük az adott színben megjelölt interneuronok keresztmetszeti területét, és két csoportra osztottuk az adatokat az alapján, hogy tartalmazott-e α_1 alegységet. A CCK és SOM sejtek esetében nem találtunk korrelációt az α_1 tartalom és sejttestük méretük közt. Érdekes azonban, hogy azok a PV interneuronok, melyek NOsGC α_1 pozitívak is voltak, szignifikánsan nagyobb keresztmetszeti területtel rendelkeztek (átlagosan $164,75\mu\text{m}^2$), mint az NOsGC α_1 negatív PV interneuronok (átlagosan $136,44\mu\text{m}^2$), vagyis a területük $\sim 21\%$ -kal volt nagyobb ($p < 0,001$). (Ha azt vesszük, hogy hipotetikusán a sejtek gömb alakúak, akkor ez a területkülönbség 33% különbséget okozna a sejtek térfogatában.) Az nNOS pozitív interneuronok esetében az α_1 alegységet tartalmazók keresztmetszeti területe szignifikánsan kisebb volt (átlagosan $121,13\mu\text{m}^2$) az α_1 -negatív nNOS-pozitív interneuronokénál (átlagosan $131,81\mu\text{m}^2$), ami 8% -kal kisebb területet jelent ($p < 0.01$). (Ismét gömb alakú sejteket feltételezve ez 12% különbséget jelent a sejtek térfogatában.)

VI.6. NMDA indukálta cGMP termelés a túlélő hippokampusz CA1 régiójának GABAerg terminálisaiban

Az eddig ismertetett eredményekből megtudtuk, hogy a hippokampális GABAerg terminálisok rendelkeznek NO receptorral, a piramissejtek pedig képesek szinaptikusan a nitrogén-monoxid előállítására. Azonban, kíváncsiak voltunk arra, hogy a kalcium által beindítható szinaptikus NO szintézishez hogyan jut megfelelően magas kalcium koncentráció egy egyébként gátló posztszinaptikus aktív zónába. Kézenfekvőnek tűnt tesztelni, hogy ugyanaz az NMDA receptor, ami a serkentő szinapszisokban elvégzi ezt a feladatot, rendelkezésre áll-e itt is.

Ezért túlélő szeleteket készítettünk egér dorzális hippokampuszokból és módosított mesterséges agy-gerincvelői folyadékban (mACSF) inkubáltuk őket, ami foszfodiészteráz gátlókat (hogy megelőzzük a cGMP hidrolízisét) és L-arginint (az nNOS szubsztrátját) tartalmazott a szükséges ionokon és glükózon kívül. Fixálást követően a cGMP termelést immunfluoreszcens módszerrel tettük láthatóvá cGMP ellenes antitest segítségével.



14. Ábra. NMDA-indukált cGMP termelés akut túlélő hippocampális szeletben.

A–I, Az első oszlop a teljes hippocampusban mutatja a jelölést, a második oszlop a CA1, a harmadik oszlop pedig a CA3ab régió piramissejt-rétegét jeleníti meg kinagyítva. A, A CA3ab régióban jelölt néhány kosár-terminálisról eltekintve a kontroll metszetekben nem volt észlelhető cGMP termelés. B, A nitrogén-monoxid-donor SNP minden régióban megemelte a cGMP-szintet, de a kosár-terminálisok csak az Ammon-szarvban jelölődtek, a gyrus dentatusban nem. Figyelemre méltó, hogy a CA3ab régióban az SNP erősebb cGMP-jelet indukált, mint az NMDA-kezelés. C, 5 μ M NMDA adása régiófüggő hatást váltott ki: erős cGMP termelést indukált a CA1/CA3c régiókban, míg a gyrus dentatusban nem volt jelölt terminális. D, Az NMDAR-gátló MK-801 és D-AP5 teljesen kivédtek az NMDA hatását, de nem változtatták meg a CA3ab régióban a jelölést. E, A poszt-szinaptikus feszültségfüggő kalciumcsatornák (L- és R-típusú) gátlása érintetlenül

hagyta az NMDA hatását. F, G, Az NO-receptor gátló ODQ és az nNOS gátló L-NAME is megakadályozta az NMDA-indukált cGMP-termelést. H, I, nNOS génkiütött állatból készített szeletben nem volt kimutatható cGMP-jelölés, és az NMDA adása sem volt hatással a cGMP-termelésre. A szeletben látható elszórt fluoreszcens jelet minden esetben érátmetszetek adták. J, A gyrus dentatus szemcsesejt rétege kontroll körülmények között, SNP illetve NMDA adagolás hatására. Nem indukált cGMP termelést egyik körülmény sem. K, GAD65 és cGMP kettős immunjelölés a CA1 régió piramisajt-rétegében. Lépték: I, első oszlop 1 mm (A-I első oszlopaira vonatkozóan); I, harmadik oszlop, 10 μ m (A-I második és harmadik oszlopaira és J-K sorokra vonatkozóan).

A kontroll szeletekben (n=20, 10 egérből) idegi alapaktivitás által indukált cGMP jel csak néhány interneuron szómában és dendritben volt megfigyelhető. A kosáresejt-terminális festés teljesen hiányzott a CA1 hippokampális régióból, míg gyenge és ritkán előforduló kosáresejt-terminális szerű jelet figyeltünk meg a CA3ab piramisajt rétegében (14. ábra, A). Kettős immunfluoreszcens módszer használatával megállapítottuk, hogy ezek a terminálisok valóban GABAergek (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 kosáresejt-terminálisoknak volt cGMP immunreaktív CA3ab régióban (15. ábra A, 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 hippokampális régióban meg lehetett figyelni, minden biztonnal annak eredményeként, hogy az asztroglia mind NO szenzitív, mind NO inszenzitív guanilat-cikláz is kifejeznek (de Vente and Steinbusch, 1992; Teunissen et al., 2001).

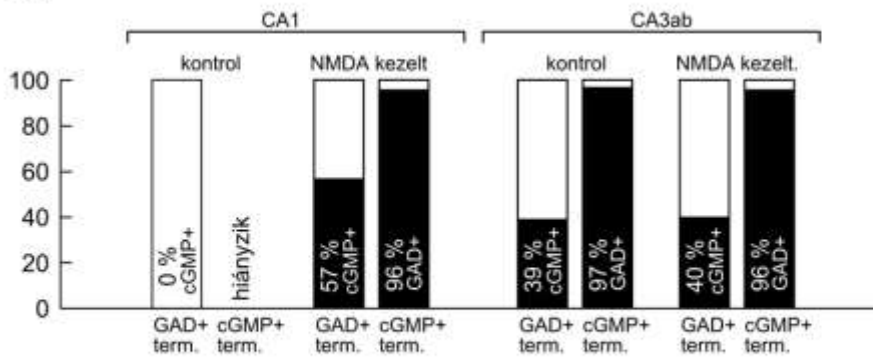
Egy NO donor, nitroprusszid-nátrium (SNP; 200 μ M, 10 percre) hozzáadására hatalmas cGMP szint növekedést tapasztaltunk a legtöbb idegi elemben. A legerősebb jelintenzitást a CA1 és CA3 kosáresejt terminálisaiban kaptuk (14. ábra, B), a gyrus dentatus kosáresejt terminálisai (14. ábra, J) azonban jelöletlenek maradtak (5 szelet, 2 egér.).

Ezt követően 5 μ M NMDA-át adtunk 3 percre a kontroll szeletekhez (14. ábra, C), ami jelentős régió-specifikus cGMP halmozódást eredményezett (27 szelet, 10

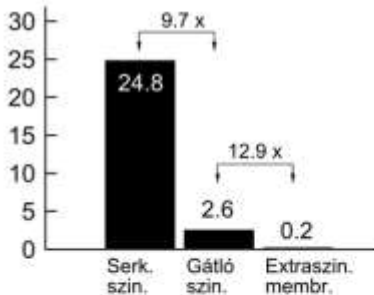
egér). A stratum radiatumban és oriensben megfigyelt erős homogén neuropil festődés mellett határozott cGMP jel-erősödést tapasztaltunk a CA1 kosársejt terminálisiban. Amennyiben az 5 μ M NMDA-át csak 30 másodpercig adagoltuk, a szelet felső 50mikrométerében már erősen jelölt terminálisokat kaptunk. A cGMP jelölt terminálisok valóban GABAerg terminálisok voltak a CA1 piramissejt rétegében (14. ábra, K), mivel kettős immunfluoreszcens kísérleteink során a cGMP jelölt terminálisok 96,3 \pm 0,6%-a bizonyult GAD65 pozitívnak (n=375, 9 szelet, 3 egér), ami 57,3 \pm 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 halmozódást figyeltünk meg, mely kevésbé intenzív jelet adott, mint a piramissejt-réteg terminálisai, és gyakran GAD65 enzimet is kifejeztek. Voltak azonban olyan cGMP jelölt profilok a strata 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 \pm 2,5% volt GAD65 pozitív n=201, 9 szelet, 3 egér). Ez az arány 39,8 \pm 2,8%-nak felel meg az összes GAD65 pozitív kosársejt terminálist tekintve a CA3ab régióban (n=290, 4 szelet, 2 egér, 15 ábra, A). Röviden összefoglalva, nem találtunk cGMP jelölt kosársejt terminálist a gyrus dentatusban sem NMDA adagolás előtt, sem utána (14. ábra, J); a CA3ab régióban találtunk néhány gyengén jelölt kosársejt terminálist a kontroll szeletekben, de az NMDA adagolásának semmi 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, 50 μ M) és non-kompetitív (MK-801, 50 μ M) 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 és nem a CA3ab kosársejt terminálisai szabályozhatók NMDA indukálta NO termeléssel (n=4 szelet, 2 egér, 14. ábra, D).

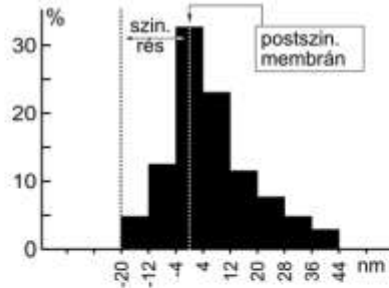
A a GAD-cGMP jelölés %-os kolokalizációja a terminálisokban, kontroll szeletben és NMDA kezelés után



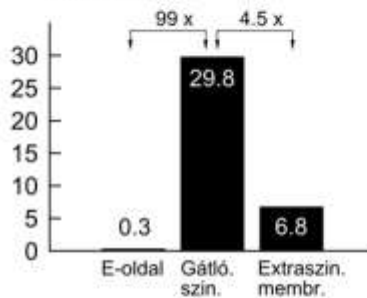
B A GluN1-jel sűrűsége beágyazás-utáni kísérletekben [arany/ μm]



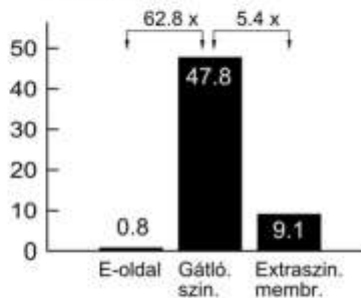
C NMDAR eloszlása GABAerg szin.-ban



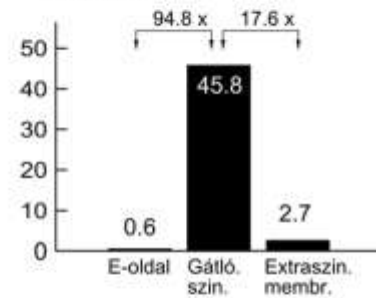
D A GluN1 jelölés sűrűsége replikán [arany/ μm^2]



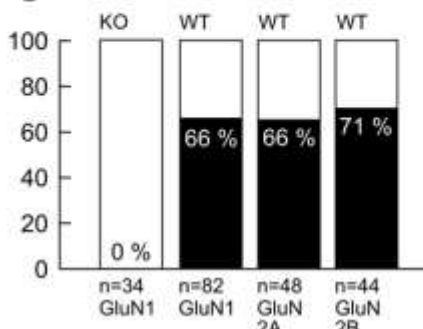
E A GluN2A jelölés sűrűsége replikán [arany/ μm^2]



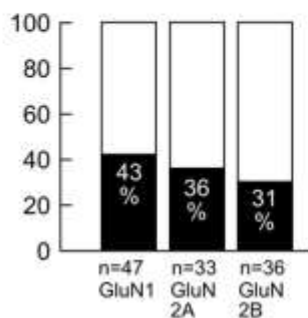
F A GluN2B jelölés sűrűsége replikán [arany/ μm^2]



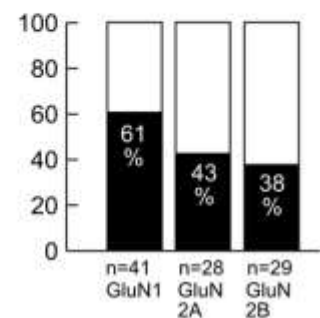
G NMDAR+ szomatikus szin. %-os aránya (replika)



H PV pozitív szin. NMDAR-pozitivitása %-ban (beágy. előtti imm.)



I vGluT3 pozitív szin. NMDAR-pozitivitása %-ban (beágy. előtti imm.)



15. Ábra. NMDA-receptor alegységek eloszlásának vizsgálata és kolokalizációja a kosársejt terminálisok szinapszisaival.

A, Kontroll és NMDA-indukált cGMP-immunjelölt CA1 és CA3ab kosárterminálisok GAD65 tartalmának vizsgálata. A CA1 régióban kontroll körülmények között a GAD65 tartalmú terminálisok nem tartalmaztak cGMP-t, míg NMDA hatására többségük erősen immunpozitív lett (n=513 GAD pozitív terminális; n=375 cGMP pozitív terminális, 3 állatból mérve). A CA3ab régióban kontroll körülmények között néhány gyengén jelölt cGMP-pozitív terminális megfigyelhető volt (n=330 GADpozitív, n=118 cGMP pozitív terminális, 2 állatból mérve), azonban NMDA adagolására itt nem változott a jelölés mértéke és erőssége sem (n=290 GAD pozitív és n=201 cGMP pozitív terminális, 3 állatból mérve). B, A beágyazás utáni immunarany kísérletekből származó mérések azt mutatják, hogy az NMDA receptorok (a GluN1 alegység alapján) besűrűsödnek a GABAerg gátló szinapszisokban (12,9-szer nagyobb receptor sűrűség) a nem szinaptikus sejttest membránnal összehasonlítva. A receptor jelölés a serkentő szinapszisokban volt a legsűrűbb (9,7-szerese a GABAerg szinapszisokban mért értéknek). C, A beágyazás utáni immunarany NMDA-receptor jelölés posztzinaptikus membránhoz viszonyított eloszlása azt mutatta, hogy a GABAerg szinapszisokban az NMDA-receptorok a posztzinaptikus membránhoz asszociálódnak. Preszinaptikus NMDA-receptorok jelenlétére nincs bizonyíték. D–F, A GluN1, GluN2A és GluN2B receptor alegységek piramissejtek sejttest-membránján mért immunarany sűrűsége fagyasztva-tört replika kísérletekből. Mindhárom alegység esetében a háttér jelölés (az E-oldalon nézve) elhanyagolhatónak bizonyult, míg a sejtplazma felőli P-oldal esetében az immunarany jel bedúsulását figyeltünk meg a GABAerg szinapszisokban (Gátló szin.) a szomszédos nem szinaptikus membrán (Extraszin. membrán) felületekhez képest. G, A fagyasztva-tört replika kísérletekben immunarannal jelölt NMDA receptor alegységek bedúsulást mutatnak a sejttesten létesített, teljesen rekonstruált GABAerg szinapszisokban. Az agykérgi piramissejtekre specifikus GluN1 génkiütött egérben hiányzott a szinaptikus GluN1 jelölés.

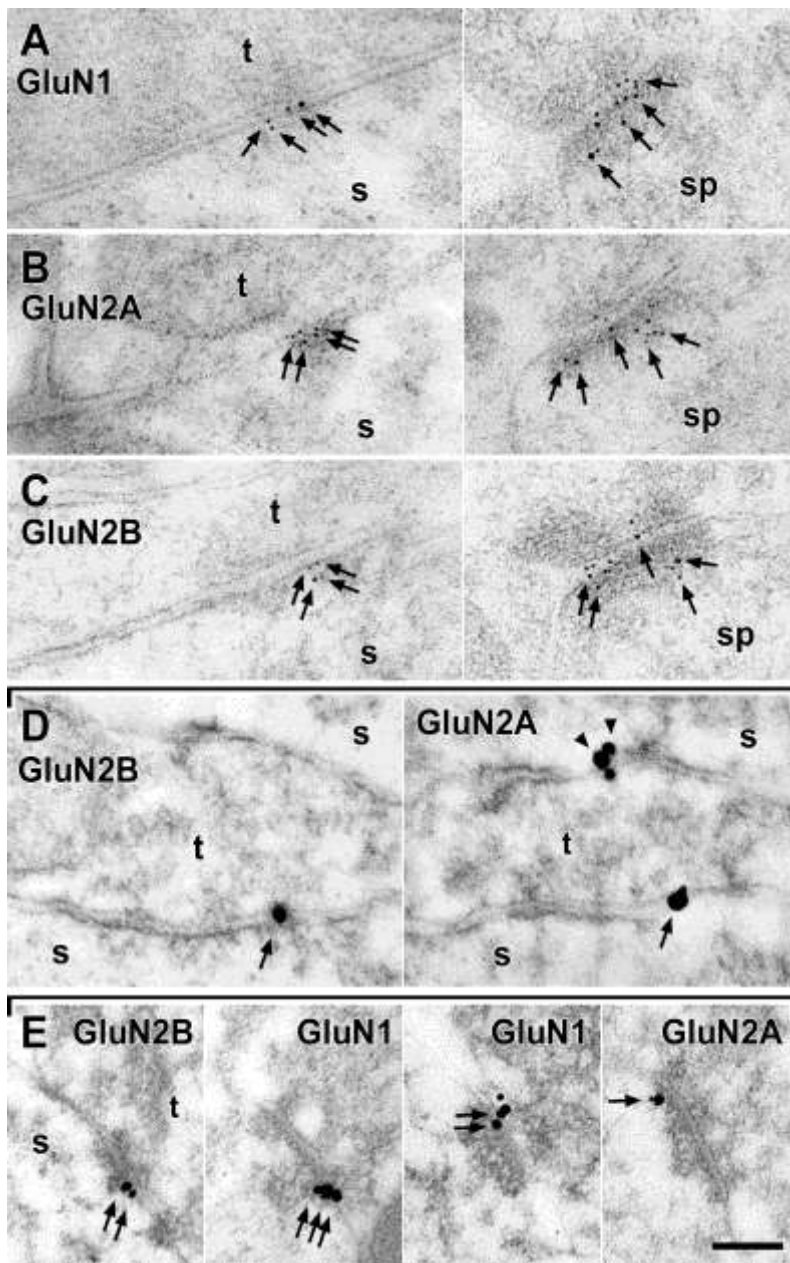
H, I, Az NMDA receptor alegységek százalékos kolokalizációja kombinált immunarany-immunperoxidáz kísérletekből származó sorozatmetszetek teljesen rekonstruált parvalbumin (PV) és vezikuláris glutamát-transzporter 3 (vGLuT3) tartalmú terminálisainak szinapszisaiban. Rövidítés: Beágy. előtti imm.= Beágyazás előtti immunreakció

Azért, hogy kizárjuk annak a lehetőségét, hogy feszültségfüggő kalcium csatornák hozzájárulnak az NMDA indukálta hatáshoz, gátoltuk a posztszinaptikusan elhelyezkedő L- és R-típusú kalcium csatronákat (20 μ M nifedipin + 100nM SNX482). Az 5 μ M 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, 14. ábra, E). Az NMDA okozta hatás szintén teljesen kivédhető volt, ha nNOS gátlóval (L-NAME; 100 μ M, n=5 szelet, 3 egér) vagy NO receptor gátlóval (ODQ; 20 μ M, n=14 szelet, 5 egér, 14. ábra, G, F) előinkubáltuk a szeleteket.

Megvizsgáltuk a továbbiakban azt is, hogy a piramissejtek és interneuronok spontán akciós potenciál generálása mennyiben járult hozzá az NMDA hatásához, ezért a kísérletsorozatot megismételtük olyan magnéziummentes ACSF-ben, amibe 1 μ M tetrodotoxint (TTX) tettünk, de eredmények teljesen azonosak lettek. Hogy bizonyítsuk az nNOS kizárólagos szerepét a kísérleteinkben nNOS génkiütött egerekből is készítettünk túlélő szeleteket (14. ábra, H-I). Minden idegi cGMP festés eltűnt a kontroll (n=8 szelet, 4 egér) és az NMDA kezelt szeletekből is (n=9 szelet, 4 egér) a hippocampusz 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 hippocampális CA1 és CA3c régió GABAerg termináisaiban. 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 különbözők (Takahashi and Magee, 2009; Xu et al., 2010), 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 figyelembe kell venni egyrészt a GABAerg szinaptikus áramokban létrejövő, másrészt a hálózati aktivitásban bekövetkező indirekt hatását az NMDA-NO-cGMP jelátviteli útvonalnak.

VI.7. A CA1 piramisisejtekre érkező periszomatikus GABAerg szinapszisokban kifejeződik az NMDA-receptor GluN1, GluN2A és GluN2B alegysége

A fenti kísérletek azt sugallták, hogy az NMDA receptoroknak közel kell lenniük a GABAerg szinapszisokhoz. Éppen ezért, kvantitatív beágyazás utáni immunarany jelölést végeztünk GluN1, 2A és 2B alegységre, olyan antitestekkel, amik bizonyítottan specifikus jelölést adnak (részletes leírás az V.3. fejezetben található). A piramisisejtek tuskéiről jól ismert, hogy kifejeződnek bennük ezek az alegységek (lásd a III.6.3.1.



alfejezetben), amit mi is megerősítettünk (16. ábra, A-C, jobb oldali oszlop).

16. ábra Az NMDA receptor alegységek a CA1 piramisisejtek sejttestére érkező szinapszisok poszt-szinaptikus aktív zónájában helyezkednek el.

Az elektronmikroszkópos ábrákon beágyazás utáni immunarany módszerrel jelölt NMDA receptor alegységek láthatók (fekete szemcsék). A-C, A GluN1, GluN2A és GluN2B alegységek mind a GABAerg (baloldali ábra), mind a glutamaterg (jobb oldali

ábra) szinapszisok posztszinaptikus aktív zónájában feldúsulnak, azonban jelentős mennyiségi különbség tapasztalható közöttük. **D**, Ugyanazon szinapszis sorozatmetszeteiből származó szomszédos metszetek GluN2B és GluN2A immunjelölése (ezüst intenzifikált arany szemcsék). Az ábra alsó felén látható szinapszisban mindkét receptor alegység megtalálható (nyilak), míg a másik szinapszisban csak a GluN2A alegység jelölődött (nyílhegyek). **E**, Ugyanazon szinapszis sorozatmetszeteiből származó szomszédos metszetek GluN2B-GluN1-GluN2A immunarany jelölése (nyilak). Rövidítések: *t*, terminális; *s*, piramissejt-sejttest; *sp*, tüske-fej. Lépték: 100 nm.

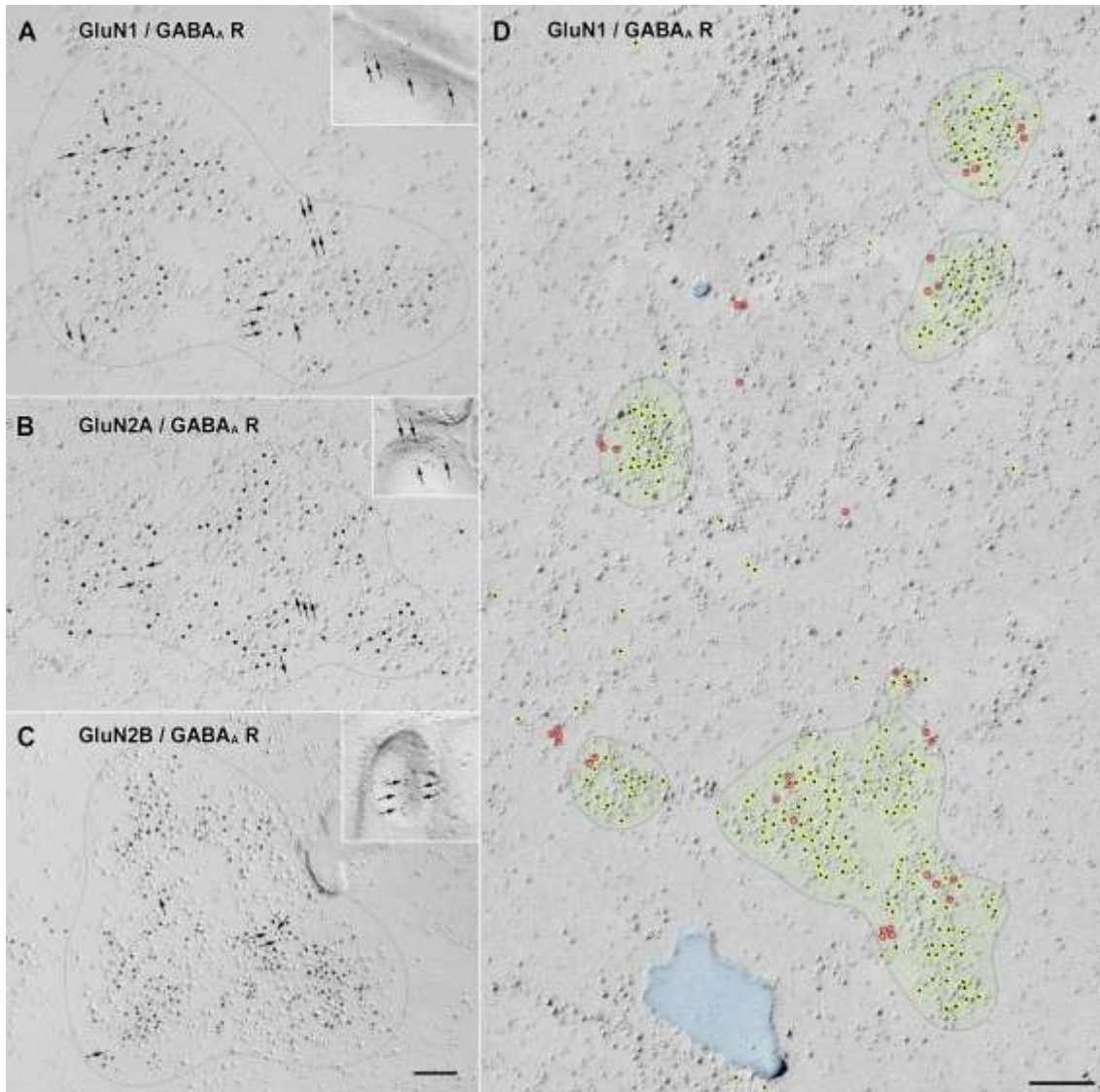
Ezen felül a GluN1, 2A és a 2B alegység egyértelműen megtalálható volt a piramissejtek sejttestére érkező GABAerg szinapszisok posztszinaptikus aktív zónájában (16. ábra, A-C, bal oldali oszlop). Az immunarany jel átlagos távolsága a posztszinaptikus membrántól, amit a szinapszis síkjára merőlegesen mértünk, 3,63 nm-nek adódott az intracelluláris oldalon (medián; 0-12,8 interkvartilis távolság; lásd még 15. ábra, C; Az arany szemcsék 72,8%-a posztszinaptikus 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 kvantitatív módszerrel megbecsültük a serkentő és periszomatikus gátló szinapszisok NMDA receptor sűrűségét. A GluN1 alegység immunarany sűrűségét mértük, mivel az minden NMDA receptorban egyformán van jelen. Véletlenszerű mintát vettünk a periszomatikus 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 , 15. ábra, B). Mindazonáltal, a GABAerg szinapszisok 1,8-szor nagyobbak, mint a tüske szinapszisok (Nyíri et al., 2001; Racca et al., 2000), így az NMDA receptorok becsült száma csak $5,4 \pm 0,75$ -szor kevesebb a GABAerg szinapszisokban. Néhány NMDA receptort extraszinaptikusan is találtunk a piramissejtek sejttestén ($0,198 \pm 0,03$ arany szemcse/ μm , 15. ábra, B). Azért, hogy közvetlenül bizonyítsuk, hogy a különböző NMDA receptor alegységek egyazon szinapszisban is megtalálhatók, az alegységeket ugyanazon szinapszis egymást követő metszetein lokalizáltuk (részletek az V.3. fejezetben található). Azt találtuk, hogy a GluN1-2A, GluN1-2B és GluN2A-2B alegységek gyakran kolokalizáltak (16. ábra, D-

E). Ezentúl a három különböző alegységet ugyanazon szinapszisban is kimutattuk (16. ábra, E). Eredményeink azt mutatták, hogy egyazon GABAerg szinapszis mind GluN2A, mind GluN2B alegység összetételű NMDA receptort hasznosít posztszinaptikusan.

VI.8. 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 szinapszistra van szükség, ezért SDS-kezelt fagyasztva tört replika immunjelölést végeztünk. A piramis sejtek felszínén teljes szinaptikus aktív zónák tárulnak 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 C-terminális vége ellen készített antitest a P-oldal intramembrán fehérjéinek (IMP) sűrű csoportját jelölte (Kasugai et al., 2010). 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 (részletes leírás a V.10.1. alfejezetben található, 8. ábra). 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 tuskéken (17. ábra, A-C, betétek), de asszociálódott a GABA_AR tartalmú szomatikus szinapszisokkal is (17. ábra, A-D). Az antitest háttérjelölését a szomatikus 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 GABA_A receptor-dús területeken (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.



17. ábra *A fagyasztva-tört replika kísérletek alapján az NMDA-receptor jelölés a poszt-szinaptikus GABA_AR jelöléssel együtt fordul elő.*

Az elektronmikroszkópos ábrákon replika immunarany reakcióból származó CA1 piramisisejtek sejttestén elhelyezkedő GABA_ARg szinapszisok poszt-szinaptikus oldala látható (az ábrán szürke vonallal határolva). A–C, Kettős immunarany jelölés a GABA_AR β3 alegység (10nm aranyzemcsék) és az NMDA receptor alegységek (5 nm aranyzemcsék, az ábrán nyíllal jelölve) ellen. Jól látható a GluN1 (A), GluN2A (B) és GluN2B (C) alegységek erőteljes asszociációja a GABA_ARg szinaptikus területekhez. A betét ábrákon feltételezett piramisisejt tüskéken levő NMDA receptor alegység jelölések láthatók. Lépték: 100nm. D, Az elektronmikroszkópos ábrán az NMDA receptorok és GABA_AR szoros együttállása figyelhető meg egy piramisisejt sejttest-felületén lévő öt

különálló szinapszis-asszociált területen. Az IMP csoportosulások szórványosan helyezkednek el a piramissejt egész plazma felőli, P-oldalán. Két kisebb extracelluláris, E-oldal törés látható a replikán késsel jelölve. A GABA_AR immunarany jelölés (az ábrán zöld gyűrűkkel jelölve) feldúsul az IMP csoportosulások mentén. A GABA_AR helyi sűrűség-eloszlása alapján, elfogultság nélkül határoztuk meg a szinaptikus területeket (az ábrán halványzöld területként látható, szürke vonallal határolva). Ezt követően figyeltük meg a GluN1 alegység elhelyezkedését (piros gyűrűkkel határolva). Végezetül a GluN1 alegység immunarany sűrűség-eloszlását mértük meg szinaptikus és szinapszison kívüli sejttest felszíneken. Lépték: 200 nm

Másképpen fogalmazva, a szinaptikus NMDAR sűrűség a mért háttér-jelölés 99,06-szorosa a GluN1, 62,78-szorosa a GluN2A és 94,79-szorosa volt a GluN2B immunreakció esetében (15. ábra, D-F). Ennek megfelelően, azt találtuk, hogy a szomatikus GABA_Aerg 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 (15. ábra, G), és a szinaptikus receptorsűrűség minden egyes szinapszis estében meghaladta a háttér mértékének 30-szorosát. Az egy szinapszisban lévő átlagos NMDAR aranyzemcse szám 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 (17. ábra). 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 immunarany részecskék hozzáférését a szinapszishoz (Részletes leírás a V.10. fejezetben található). 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 aranyzemcsék 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 aranyzemcséket a piramis sejtek szómáján a piramis sejt specifikus GluN1 géniütött egerekben (15. ábra, G, n=34

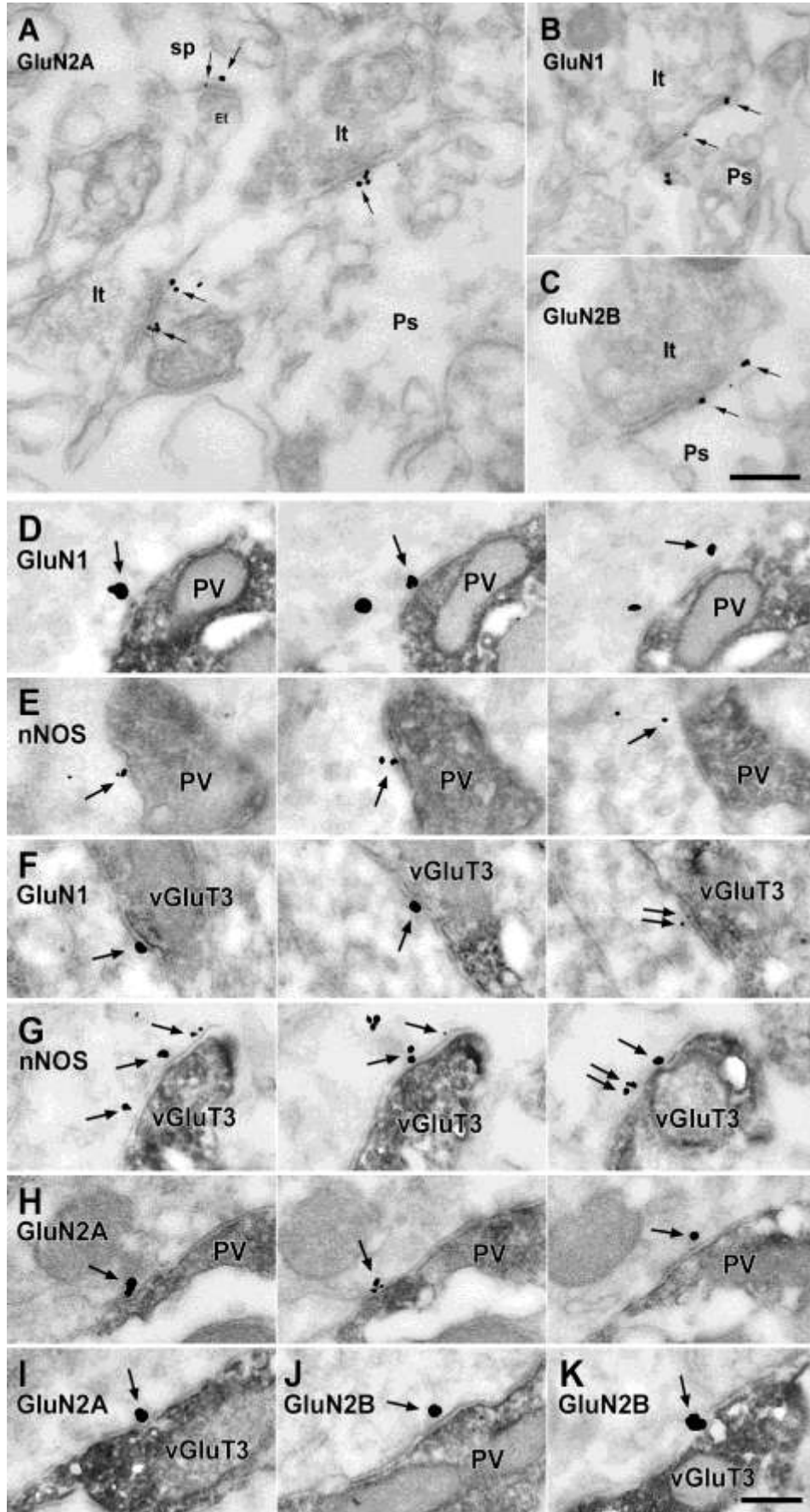
szinapszis, 2 egér). Az interneuronok dendrittrözsére érkező glutamáterg szinapszisok viszont intenzíven jelölődtek ezekben az egerekben (nincs ábra), azt mutatva, hogy a szomatikus jel hiánya nem technikai okokból eredt a génkiütött állatokban, ugyanis csak a piramis sejtekből hiányzott a GluN1 fehérje, az interneuronokból nem.

Tekintve, hogy elektrofiziológiai kísérletek már mutatták, hogy extraszinaptikusan is vannak NMDA receptorok (részletes kifejtés a III.6.3.2. alfejezetben található), megvizsgáltuk az extraszinaptikus sejttest membránokat is. Az extraszinaptikus NMDAR sűrűség $6,76 \pm 1,72$, $9,10 \pm 1,51$ és $2,65 \pm 0,66$ aranyzemcse/ μm^2 volt a GluN1, 2A és 2B alegységek elleni immunreakcióban külön-külön. Ez a sűrűség 4,49-szor, 5,41-szor és 17,62-szor volt alacsonyabb a szinaptikus sűrűségekénél, 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 (15. ábra, D-F). Ezek az NMDA receptorok talán (pl. aktivitásfüggő módon) később a GABAerg szinapszisokba kerülnek, vagy asszociálódnak lipid-tutaj fehérjékkel, amik az NMDA receptorok internalizációját vezérlik (Swanwick et al., 2009).

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

VI.9. Mindkét kosársejt-típus által képzett szinapszisban megtalálhatók a posztszinaptikus NMDA receptorok

Azért, hogy meghatározzuk az NMDAR pozitív GABAerg szinapszisok eredetét, és hogy tovább erősítsük, hogy kizárólag posztszinaptikusak az NMDA receptorok, beágyazás előtti immunarany kísérleteket végeztünk GluN1, 2A és 2B alegység ellen a CA1 hippocampális régióban. Minden alegység festés posztszinaptikusan helyezkedett el a szomatikus GABAerg szinapszisokban (18. ábra). GABAerg terminálisok nem festődtek. A szomatikus GABAerg szinapszisokban mért aranyzemcsék lineáris sűrűsége a GluN1 reakcióban $0,520$ aranyzemcse/ μm volt, míg az extraszinaptikus jelölés jóval alacsonyabb volt ($0,058$ aranyzemcse/ μm). Ez az eredmény-most még egy módszer használatával- tovább megerősíti, hogy az NMDA receptorok specifikusan a GABAerg szinapszisokkal asszociálódnak.



18. Ábra. Az NMDA-receptorok és az nNOS együtt fejeződnek ki a kosársejtek terminálisaiban.

A–C, A beágyazás előtti, GluN1, GluN2A, és GluN2B alegységek elleni immunreakciókból származó elektronmikroszkópos felvételeken a sejttestre érkező GABAerg szinapszisokban kizárólag posztszinaptikusan elhelyezkedő NMDA-receptor jelölés látható. Et, glutamáterg terminális; It, GABAerg terminális; Ps, piramisajt sejtteste. Lépték: (C-ben) A–C, 200 nm. D–K, Beágyazás előtti kombinált immunarany-immunperoxidáz reakciókból származó felvételek. Sorozat- (D, F, H) és egyes-(I–K) metszeteken látható, hogy mind a PV-, mind pedig a vGluT3/CCK-pozitív (sötét csapadék) kosársejt-terminálisok szinapszisai posztszinaptikusan kifejezik a GluN1, 2A, és 2B alegységeket (aranszemcsék, nyilakkal jelölve). E, Sorozatmetszeteken látható, hogy az nNOS posztszinaptikusan van jelen mind a PV- (E), mind pedig a vGluT3-pozitív terminálisok szinapszisaiban. Lépték: (K-ban) D–K, 250 nm.

Ezt követően immunarany-immunperoxidáz kettős jelölést végeztünk NMDAR-parvalbumin (PV) és NMDAR- vezikuláris glutamát transzporter 3 (vGluT3) ellen. Az utóbbiról jól ismert, hogy az interneuronok közül kizárólag a kolecisztokinin (CCK)-tartalmúakban található meg a hippocampusban (lásd III.3.4.2. alfejezet, Somogyi et al., 2004), és körül-belül 90%-át jelöli meg CCK-pozitív kosárterminálisoknak a CA1 régióban (nem publikált megfigyelés). A hippocampusban nincs átfedés a PV- és CCK-tartalmú interneuron populációk közt. Azt találtuk, hogy a PV pozitív terminálisok által képzett szinapszisok 42,6%-a (n=47 szinapszis 2 egérből) volt jelölt GluN1alegységre, 36,4 % (n=33, 2 egér) GluN2A alegységre és 30,6% (n=36, 2 egér) volt jelölt GluN2B alegységre (18. ábra, D, H, J, 15. ábra, H). A vGluT3 pozitív terminálisok szinapszisai esetében 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 (18. ábra, F, I, K, 15. ábra, I). Habár a munkánk során a szomatikus szinapszisokra fókuszáltunk, néhány dendritikus gátló szinapszis szintén pozitív volt NMDAR alegységekre (nem mutatjuk).

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 (majdnem azonos arányban; részletes kifejtés a VII.6. fejezetben található), szintén erősen azt sugallja, hogy kolokalizálódnak a szomatikus GABAerg szinapszisok posztzinaptikus kompartmentjében.

VII. MEGBESZÉLÉS

Értekezésem legfontosabb eredményei a következők:

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

(2) a NO receptora az NOsGC megtalálható az interneuronoknak mind a szomatodendritikus mind az axon terminális kompartmentjében,

(3) NOsGC $\alpha_1\beta_1$ kizárólag az interneuronokban fejeződik ki, míg $\alpha_2\beta_1$ alegység kompozíció piramis sejtekben található,

(4) NMDA adagolása határozott cGMP növekedést okozott a GABAerg kosársejt terminálisokban NMDAR-, nNOS- és NOsGC-függő módon specifikusan a hippokampusz CA1 és CA3c régiójában, ezzel szemben a CA3ab esetében a cGMP halmozódás NMDAR független módon történik,

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

(6) a szomatikus GABAerg szinapszisok legalább kétharmada tartalmazott NMDA receptort -mindhárom vizsgált alegységet- tized akkora sűrűségben, mint a glutamáterg szinapszisok,

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

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

VII.1. Szinapszis specifikus NO termelés a GABAerg szinapszisokban

A hippokampális piramis sejtekről jól ismert, hogy kifejeznek nNOS-t, és leírták a serkentő szinapszisok posztszinaptikus denzitásához viszonyított pontos elhelyezkedését is (lásd III.5.1. alfejezetben). Feltehetően azért nem volt adat az nNOS

GABAerg szinapszokban való elhelyezkedéséről, mert a serkentő szinapszisok hosszútávú plaszticitásában betöltött szerepe több figyelmet nyert (lásd III.5.7.2. alfejezet), illetve azért is, mert az nNOS jel csak nagyon gyengén fixált szöveten mutatható ki beágyazás előtti kísérletekben (lásd V.2. fejezet). A hippocampális CA1 piramissejtek különböző típusú interneuronok által szabályozódnak (lásd a III.3.4. alfejezetben), melyek a piramissejtek különböző doménjeit célozzák. Kvantitatív eredményeink és a kolokalizációs kísérletek arra engednek következtetni, hogy a kosársejtek (mind a PV, mind CCK/vGluT3 típusú) által képzett szinapszisok nagy része nNOS tartalmú egérben és patkányban is. Hasonlóan, az AIS szinapszisok, melyeket a kandeláber-sejtek képeznek, és számos dendritikus szinapszis is nNOS pozitív volt. A NO számára a membránok szabadon átjárhatók, mégis a NO jel csak pár mikrométerig detektálható a termelés helyétől (Iino, 2006; Namiki et al., 2005). Ezek a tulajdonságok, azt sugallják, hogy a NO jelátvitel nemcsak hatékony és gyors válaszra képes, hanem szinapszis specifikus is (lásd a III.5.3. alfejezetben). Eredményeink szerint az nNOS nagy feldúsulást mutatott a GABAerg szinapszisokban (a posztzinaptikus membránban) a szomszédos nem-szinaptikus membrán doménekkel összehasonlítva, és az interneuron terminálisok, melyek ezeket a szinapszist alkotják, tartalmaztak NO receptor NOsGC-t.

Az nNOS akkor képes NO termelésre, ha L-arginin és oxigén jelenlétében a megemelkedett intracelluláris kalcium koncentráció hatására a kalcium-kalmodulin azt aktiválja (Bredt és Snyder, 1990; Lee és Stull, 1998). A serkentő szinapszisokban ezt a lokális kalcium koncentrációt szinaptikus NMDA receptorok és egyéb feszültségfüggő kalcium csatornák tartják fenn. Eddig nem igazolták olyan kalcium csatornák jelenlétét a GABAerg szinapszisokban, amik kellően magas kalcium szintet biztosítanak a GABAerg szinapszisok posztzinaptikus oldalán egészen lokálisan. Mindez nem is meglepő tekintve, hogy ezek bedúsulása igen valószínűtlennek tűnt egy gátló szinapszisban. Az L- és T-típusú feszültségfüggő kalcium-csatornák jelen vannak ezen szinapszisok körül a dendriteken és a periszomatikus membránokon (Káli és Freund, 2005; Magee et al., 1998). Ezek a csatornák mind dendritikus, mind visszaterjedő akciós potenciál hatására aktiválódhatnak, megemelve a sejten belüli kalcium koncentrációját. Amikor azonban az NMDA-adagolás hatását vizsgáltuk, a feszültségfüggő kalcium-csatornák gátlása egyáltalán nem befolyásolta a cGMP-jelölést

(14. ábra E, VI.6. fejezet), így kicsi a valószínűsége, hogy szerepet játszanának az nNOS aktiválásában. Bizonyos irodalmi adatok alapján az nNOS metabotróp receptorokon keresztül intracelluláris kalcium forrásból is aktiválható: a mAChR (kifejezetten M1/M3) aktivációját vizsgálták (Hu és el-Fakahany, 1993; Mathes és Thompson, 1996), ráadásul az M1/M3 receptorok a piramis sejtek teljes szomatodendritikus tengelyén megtalálhatók (Levey, 1996; Levey et al., 1995; Yamasaki et al., 2010); valamint a mGluR5 aktivációja hozható még összefüggésbe nNOS aktiválással, ami viszont lényegesen kisebb mennyiségben van jelen a (tüskén kívüli) szomatodendritikus régióban (Luján et al., 1997). Más kutatócsoportok szerint azonban az nNOS kizárólag extracelluláris forrásból aktiválható (Alagarsamy et al., 1994; Muir et al., 2010). Saját kísérleteink a metabotróp receptorok ingerlésére ez utóbbit tudták megerősíteni a hippocampusra nézve, ugyanis sem a mAChR agonista karbachol, sem a mGluR5 agonista DHPG különböző koncentrációkban és ideig alkalmazva sem volt képes az NO jelpálya aktiválására (nem publikált adatok). A lehetséges kalcium forrásokat megvizsgálva tehát kizárólag az NMDA receptorok aktiválása tudta elindítani az NO szintézisét (részletesen lásd VII.5. és VII.6. fejezetben).

VII.2. Sejtípus specifikus NOsGC alegység expressziók és asszociációjuk nNOS-sal

Az NOsGC alegységek mRNS eloszlását 8 napos patkány hippocampusban kis felbontással már leírták, eszerint gyenge α_1 és erősebb α_2 és β_1 alegység mintázat volt megfigyelhető (Gibb és Garthwaite, 2001). Felnőtt patkányokban ugyancsak kis nagysággal fennmaradt a nagy különbség az α_1 és α_2 alegység festődésében (Pifarré et al., 2007). Eredményeink elsőként tárták fel nagy felbontással sejtes szinten az α alegységek elhelyezkedését a hippocampusban, valamint az α_1 és α_2 alegység festődésének szétválását immunhisztokémiai módszerrel. Kimutattuk, hogy míg az $\alpha_1\beta_1$ alegység összetételű receptor csak interneuronokban fejeződik ki, addig az $\alpha_2\beta_1$ komplex csak piramis sejtekre korlátozódik mind egérben, mind patkányban. Eredményünk, miszerint gyakorlatilag minden α_1 alegység pozitív interneuron pozitív volt β_1 alegységre és fordítva, nemcsak igazolja az antitestek specificitását, de

immunhisztokémiai bizonyítékot szolgáltat arra, hogy nincs olyan interneuron, ami csak α_2 tartalmú NOsGC-t fejezne ki. A legtöbb periszomatikus axon terminális kifejezett NOsGC α_1 alegységet, ami nagyban valószínűsíti, hogy mindkét típusú szomatikus gátló szinapszis jelölődött ezekben az állatokban. Ráadásul sok axo-axonikus terminális is tartalmazott NOsGC-t. Ezek az adatok jól illeszkednek a periszomatikus szinapszisok nNOS jelölésénél tapasztaltakhoz, ami azt sugallja, hogy az NO szintáz és az NO receptor kifejeződése a szinapszis két oldalán egybeesik. A dendritikus és periszomatikus GABAerg terminálisok NOsGC jelölődése egérben és patkányban megerősíti, hogy az NO jel detektálható ezekben a terminálisokban.

Habár a két α alegység elsődleges szerkezete jelentősen csak a regulátoros doménben tér el egymástól, eddig a két izoforma- $\alpha_1\beta_1$ és $\alpha_2\beta_1$ - közt semmilyen funkcionálisan releváns különbséget sem mutattak ki a regulációs tulajdonságaik, szubsztrát affinitásuk, katalitikus aktivitásuk vagy NO szenzitivitásuk tekintetében (lásd a III.5.4. alfejezetben, Russwurm et al., 1998). Egy fontos különbség azonban a két α alegység közt, hogy szelektív a szubcelluláris célelemük. Új eredmények azt mutatják, hogy míg az $\alpha_1\beta_1$ izoforma citoplazmatikus, addig az $\alpha_2\beta_1$ izoforma lehorgonyzódik a PDZ-domént hódító PSD-95 fehérjéhez (Russwurm et al., 2001), ami a serkentő posztszinaptikus denzitás egyik alkotója. További adatokból az is kiderül, hogy valójában a PSD-95 az NO/cGMP kaszkád szinte minden elemével képes kölcsönhatni, beleértve az nNOS-t is (Brenman et al., 1996; Koesling et al., 2004; Russwurm és Koesling, 2002). Éppen ezért, azt gondoljuk, hogy a hippokampális piramissejtek serkentő szinapszisaiban a PSD-95 köti az NOsGC $\alpha_2\beta_1$ -t az nNOS-sal és az NMDA receptorral együtt a posztszinaptikus oldalon, míg preszinaptikusan az $\alpha_2\beta_1$ egyéb PDZ-domén tartalmú horgonyzó fehérjéhez kötődhet, mint például a szinapszis-asszociált protein-97 (Müller et al., 1995). Habár a piramissejtekre érkező GABAerg szinapszisokban még nem figyeltek meg PSD-95 fehérjét, több PDZ-domén tartalmú horgonyzó fehérjét, mint a glutamát-receptor-kölcsönható proteint (GRIP1) vagy a szinaptikus állványzó molekula (SSCAM) sikerült kimutatni (Charych et al., 2004; Hirao et al., 1998; Kittler et al., 2004; Sumita et al., 2007). Ezek tehát horgonyzóik lehetnek az nNOS molekuláknak a GABAerg szinapszisokban, ahova akár még az NOsGC $\alpha_2\beta_1$ izoforma is bekötődhet. Ahogy a munkánkból is kiderült, az $\alpha_1\beta_1$ izoforma pedig a szinapszisok preszinaptikus oldalán, vagyis csak a GABAerg terminálisokban

volt jelen. Spekulációként azt is feltételezhetjük, hogy mivel az interneuronokon végződő serkentő szinapszisokban szintén található PSD-95 (El-Husseini et al., 2000), az α_2 alegység azonban hiányzik az interneuronokból, így az interneuronok serkentő szinapszisaiból hiányozhat a szinaptikus plaszticitás ezen formája.

VII.3. Az nNOS és NOsGC közvetítette jelátvitel a periszomatikus és a dendritikus GABAerg sejtek szinapszisa számára is elérhető, de nem egyforma mértékben

Az *in situ* hibridizációs és immunhisztokémiai adatok azt mutatták, hogy nem minden interneuron volt egyformán pozitív NOsGC α_1 alegységre. Megvizsgálva négy ritkán átlapolódó interneuron populációt, a fluoreszcens méréseink azt mutatták, hogy míg a periszomatikus CCK és PV pozitív interneuronok nagy része kifejez NOsGC-t, addig a dendriteket célzó SOM és nNOS pozitív interneuronok kevesebb mint egyharmada tartalmazott NOsGC-t. Azt is kimutattuk, hogy a CCK pozitív kosársejtek, amiket CB1 receptor ellenes immunreakció segítségével azonosítottunk, sosem fednek át az nNOS tartalmú interneuronok populációjával a CA1 területén. Az NOsGC kimutatása ezen interneuronok egy bizonyos részében nem feltétlenül jelenti azt, hogy az NOsGC tartalom további alpopulációkra osztaná ezeket az interneuron típusokat. Sokkal inkább egy dinamikusan változó, állapotfüggő tulajdonsága lehet az NOsGC tartalom ezeknek a sejteknek. Mindazonáltal érdekes, hogy szignifikáns korreláció mutatkozott a PV vagy nNOS pozitív sejtestek mérete és NOsGC α_1 tartalma között, ami arra utal, hogy az NOsGC jelenléte alapvető metabolikus különbségekkel van kapcsolatban, még egy adott interneuron populáción belül is (az ok-okozati összefüggés egyelőre bizonyításra vár). Összegezve, eredményeink megmutatták, hogy az NO jelátvitel molekuláris alkotóelemei jelen vannak a hippocampális GABAerg szinapszisok nagy részében, és különbözik a glutamáterg szinapszisokban találtakhoz képest. Ez a molekuláris különbség lehetővé teszi a gátló és serkentő szinaptikus plaszticitás szelektív és különböző manipulációját, ami reményt adhat a jövőben olyan idegrendszeri megbetegedések farmakoterápiájában, melyek a serkentés és a gátlás egyensúlyának felborulásával járnak az agykéregben.

VII.4. Az NO lehetséges hatásai a neurotranszmitter felszabadulásra

Az NOsGC-én keresztül létrejövő cGMP szintézis a meghatározó lépés a NO jelátvitel szempontjából az agyban (Boulton et al., 1994; Makhinson et al., 2006; Monfort et al., 2002). Szubkortikális területeken a NO-NOsGC-cGMP útvonal szerepét a GABAerg neurotranszmisszió serkentésében (Klyachko et al., 2001; Kraus és Prast, 2002; Li et al., 2004) és gátlásában (Ozaki et al., 2000) is kimutatták. A hippokampusz GABAerg szinapszisairól egyetlen adat áll rendelkezésünkre, amikor is a CCK (és CB1R) tartalmú kosársejtek DSI jelenségét vizsgálva az NO az eCB-okkal együttműködött, a GABAerg jelátvitel gátlását eredményezve (Makara et al., 2007). A hippokampusz többi interneuronjának NO szabályozásáról egyelőre nincs adat. A cGMP legfontosabb célelemei (részletesen lásd a III.5.6. alfejezetben) (1) a CNG csatornák, melyek közül néhányat már kimutattak hippokampális interneuronokban (Kingston et al., 1996; Lőrincz et al., 2002; Maccaferri és McBain, 1996), (2) a cGMP-függő foszfodiészterázok (PDE) szintén kimutathatók interneuronokban, és (3) a PKG enzimek, ami valószínűleg szintén megtalálható interneuronokban (de Vente et al., 2001; Feil et al., 2005; Kleppisch et al., 1999). A PKGII a paraentrikuláris magban NO-cGMP-függő módon a GABAerg transzmisszió növekedését okozta (Li et al., 2004). A PDE-k hatásai sokrétűek lehetnek: visszahatnak a cGMP bontására, cGMP függő módon kihathatnak a cAMP lebontására és a cAMP-függő PDE-k is fokozhatják a cGMP lebontását. A cGMP-cAMP egyensúly eltolása is kihat a neurotranszmisszióra. Habár a célelemek megléte többnyire igazolt a hippokampuszban, interneuron típus/terminális populációs szintű eloszlásuk nem ismert.

Az agyban általánosan a NO hatása kissé ellentmondásos: mind a GABAerg jelátvitel gátlása, mind serkentése ismert. Erre több magyarázat is lehetséges: vagy a kísérleteket nem végezték megfelelő NO koncentráció mellett, ami nem meglepő ismerve a mostanság napvilágot látott valós fiziológias NO koncentrációkat (lásd a III.5.3. alfejezetben), vagy pedig lehet egyéb biológiai magyarázata is. Utóbbira példa lehet, hogy a korábban említett célelemek különböző kombinációi a terminális populációkban akár ellentétes hatást is kifejthetnek a GABAerg transzmisszióra. A hippokampuszban – ahol az NO-eCB kölcsönhatását már leírták – egy nemrégiben publikált cikkből kiderült, hogy ha a kainát receptorok önmagukban helyezkedtek el a

preszinaptikus terminálison, akkor aktivációjuk a transzmisszió serkentését, amikor CB1 receptorokkal együtt fejeződtek ki, akkor annak gátlását okozzák (Lourenço et al., 2010). Párhuzamot vonva a periszomatikus kosársejtekkel, elképzelhetőnek tartom, hogy a PV kosársejtek terminálisaiban a NO növelné a GABA felszabadulását, a CCK-CB1 kosár terminálisokban pedig a NO, az eCB rendszerrel együttműködve csökkentené azt. Ez funkcionális szempontból is megállná a helyét, hiszen a CCK kosársejtek gátlásától adott esetben (fázis-előretelődés) mindenképpen meg kell szabadulni (a két pálya erősíti egymást), míg az "óramű" PV kosársejtek gátlásától semmiképpen sem, erősítésük pedig véleményem szerint segítené az oszcillációkban betöltött szerepüket. Egy ilyen "Janus" szabályozásra szintén elképzelhető egy PDE-hipotézis, a különböző PDE-k a jelátvitel serkentését és gátlását is okozhatják. Ha egy ilyen szétválás tényleg létezne, annak klinikai következményei is lehetnének, hiszen a legtöbb PDE-nak specifikus gátlószere is van, ráadásul ezek más indikációval már forgalomban lévő gyógyszerek (szívelégtelenség, erektilis zavarok).

VII.5. NMDA indukálta NO jelátvitel a hippocampusz GABAerg szinapszisaiban

Az NMDA receptorok és a kalciumfüggő nNOS együtt van lehorgonyozva a glutamaterg szinapsziszokban, ami biztosítja, hogy az nNOS működése aktivitásfüggő módon következzen be. Eredményeink alapján a nNOS a piramissejtek sejttestére érkező GABAerg szinapsziszokban is kifejeződik. Bizonyos periszomatikus szinapsziszokban a NO a szinaptikus transzmissziót is képes befolyásolni (lásd előbb, (Makara et al., 2007). Azt is kimutattuk, hogy az NMDA receptorok felelősek lehetnek az nNOS beindításáért a GABAerg szinapsziszokban, és ennek következményeként keletkezik is cGMP a GABAerg terminálisokban. Radioimmunoassay segítségével más kutatócsoportok kimutatták, hogy míg NMDA (300 μ M) adagolása hatalmas cGMP növekedéssel jár a vad típusú egér CA1 hippocampális régiójában, addig nem figyelhető meg cGMP szint növekedés az NOsGC α 1^{-/-} egér ugyanezen agyterületén (Taqatqeh et al., 2009). Tekintve, hogy kísérleteinkben az NOsGC α 1 alegység tartalmú NO receptor kizárólag GABAerg interneuronokban volt kimutatható ezen az agyterületen, a fenti eredmények azt sugallják, hogy az NMDA kiváltotta cGMP felhalmozódás elsősorban a GABAerg interneuronokban történt. Valóban, azt találtuk,

hogy a hippokampális túlélő szeletekhez adagolt mindössze 5 μ M NMDA masszív cGMP halmozódást indukált a kosársejtek axonterminálisaiban. Valószínűtlen azonban, hogy ez a hatás direkt módon az interneuronok dendritjein lévő NMDA receptorokon keresztül jött volna létre, mert a hatás változatlan maradt, mikor tetrodotoxin (TTX) segítségével gátoltuk az akciós potenciálok terjedését, ami természetesen érintette az interneuronokat is. Továbbá kimutatták, hogy valószínűtlen, hogy 10 μ M-nál kevesebb NMDA NO termelést váltson ki az nNOS pozitív interneuronokból. Amikor 100 μ M NMDA-val létre is hozták az NO termelést ezen interneuronokban, a TTX akkor is képes volt kivédeni ezt a hatást (Lovick et al., 1999). Ez megerősíti, hogy valószínűtlen, hogy kísérleteink során az 5 μ M NMDA adagolásának bármilyen hatása lett volna az interneuronok NO termelésére TTX jelenlétében. A feszültségfüggő kalcium csatornák gátlása sem befolyásolta az NMDA által létrehozott hatást, ami azt sugallja, hogy az NMDA receptorokon keresztüli kalcium beáramlás hatékony volt. Ráadásul élettani kísérletek alapján a NO koncentrációja 1 nM (vagy az alatti) értéket vesz fel a termelődés helyén, és gyorsan csökken a szinapszis körül a szövet magas NO elnyelőképesége miatt (Hall és Garthwaite, 2009). Így tehát valószínűtlen, hogy a NO a termelődés helyétől számított 1-1,5 mikrométeren túl képes lenne befolyásolni a helyi jelátvitelt az axon terminálisokban. Az NMDA indukálta cGMP felhalmozódás teljesen kivédhető volt NMDAR, nNOS vagy NOsGC gátlók előinkubálásával, és teljesen hiányzott az nNOS +/- egerekből. Ezen eredmények arra utalnak, hogy az NMDA receptorok, melyeket közvetlenül a szomatikus GABAerg szinapszisokban találtunk, felelősek az nNOS-NO-NOsGC-cGMP kaszkád beindításáért. Habár munkánkban a CA1 hippokampális régióra fókuszáltunk, eredményeink azt mutatták, hogy a szinapszisok NO-függő szabályozása különbözőképpen működik a hippokampusz egyes régióiban. A NO donor minden Ammon-szarvi területen képes volt a cGMP jel emelésére, a gyrus dentatusban azonban nem, ami valószínűleg a szemcsejtek speciális fiziológiai tulajdonságainak és ebből következő szerepüknek köszönhető (lásd a III.3.2. és III.3.3. alfejezetekben). Mindamellet, feltűnő különbségek voltak az Ammon szarv különböző régiói között is. A CA1 és CA3c kosársejt terminálisaiban nem volt nNOS-cGMP alapaktivitás, de masszívan aktiválható volt NMDA adagolásával, míg a CA3ab régió kosársejt terminálisai rendelkeztek némi cGMP aktivitással, de NMDA adásával már nem lehetett további növekedést elérni. Annak,

hogy a CA3ab és CA3c piramis sejtek morfológiai különbségeinek (lásd a III.3.2. és III.3.3. alfejezetekben) van-e jelentősége a jelenségben, nem tisztázott. Önmagában nem magyarázhatja a régiók közti különbséget az NMDA receptorok különböző NMDA kötési affinitása, mivel a CA3c ebben nem különbözik a többi CA3 régiótól, és az NMDA kötés a gyrus dentatusban is erős (Monaghan és Cotman, 1985). Ezek a regionális különbségek megfigyelhetők voltak a TTX tartalmú, magnézium-mentes oldat alkalmazásánál is, ami azt mutatja, hogy valószínűleg nem az NMDA receptorok feszültség-érzékenységében volt különbség az egyes régiókban. Egy korábbi tanulmányban nagy térbeli felbontású NMDA mikroinjektálást végeztek a hippocampális principális sejtek sejtteste mellett, és a keletkező NO koncentrációját a közvetlen közelében mérték mikroszenzor segítségével (Ledo et al., 2004). Ezekben a kísérletekben a hippocampus különböző régióiban mért NO koncentráció jól korrelált az általunk NMDA-val kiváltott régióspecifikus cGMP termeléssel. Eredményeink azt sugallják, hogy azok a mért különbségek jórészt a periszomatikus GABAerg szinapszisokban létrejövő masszív nNOS-cGMP kaszkád aktivációjából származnak, mivel a mikroszenzor a periszomatikus régióban volt és a glutamáterg terminálisok nagy része több tíz mikrométerre található innen, a stratum radiatumban.

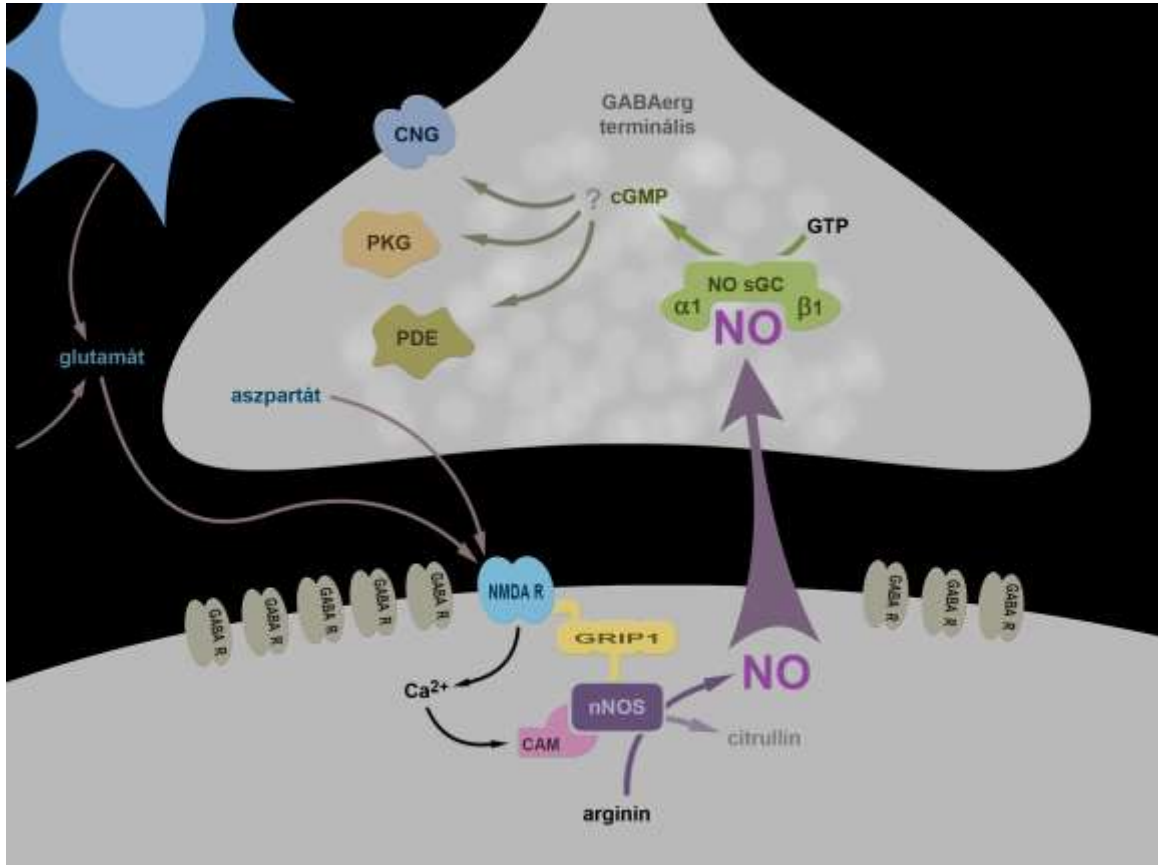
VII.6. Az NMDAR és az nNOS kolokalizál a GABAerg szinapszisokban

Ahogy az eredményeknél olvasható, a szomatikus GABAerg szinapszisok 75%-a tartalmazott nNOS enzimet posztszinaptikusan, míg 79%-a a terminálisoknak NO receptor tartalmú (NOsGC $\alpha_1\beta_1$) volt. Továbbá ezen GABAerg terminálisok 57%-a cGMP termelést mutat NMDA adagolására, és legalább 66%-a ezeknek a szinapszisoknak kifejezi az NMDA receptor GluN1, 2A és 2B alegységét posztszinaptikusan. Ezen alegységek eloszlása nem különbözött a különböző kosársejtek szinapszisaiban, ami arra utal, hogy az NMDAR-nNOS-NO-NOsGC-cGMP útvonal a legtöbb, ha nem az összes GABAerg szinapszisban megtalálható (19. ábra). A kalciumfüggő nNOS 0,5-1 μM kalcium hatására kezd NO termelésbe (Lee és Stull, 1998). A glutamáterg szinapszisokban ekkora mértékű kalciumszint növekedés a funkcionálisan kötött NMDA receptorokon keresztül jön létre (Brenman és Bredt, 1997). Az NMDA receptorok és az nNOS posztszinaptikus asszociációja biztosítja,

hogy a NO termelődése a szinapszisokban térben korlátozottan és aktivitás függő módon jöhessen létre, ami nagyban növeli az információ feldolgozó kapacitást és a térbeli szelektivitást. Ez különösen fontos lehet a GABAerg interneuronok által képzett szinapszisokban, mert ezen neuronok alapvető szerepet játszanak a populációs kisülési mintázatok szabályozásában a hippokampuszban (Freund, 2003). Habár becsléseink alapján körülbelül ötször kevesebb NMDA receptor van a GABAerg szinapszisokban a glutamáterg szinapszisokhoz képest, kinetikai mérések alapján ez több, mint elégséges ahhoz, hogy preszinaptikusan cGMP felhalmozódást okozzon köszönhetően a NO-jel nagyon hatékony detektációjának és amplifikációjának (lásd a III.5.4. alfejezetben, (Garthwaite, 2008). Mind az nNOS, mind az NMDA receptorok PDZ-tartalmú fehérjékhez vannak lehorgonyozva a glutamáterg szinapszisok posztzinaptikus denzitálásához. Mindemellett a “Synaptic Scaffolding Molecule” (SSCAM) PDZ-domén tartalmú horgonyzó fehérjét azonkívül, hogy megtalálták hippokampális GABAerg szinapszisokban is (lásd VII.2. fejezetben, (Sumita et al., 2007), kimutatták az NMDA receptor alegységekkel való interakcióját is (Hirao et al., 1998). Következésképpen ezek a fehérjék felelősek lehetnek az NMDA receptorok és nNOS együttes lehorgonyzásáért a GABAerg szinapszisokban.

A GABAerg szinapszisokban elhelyezkedő NMDA receptorok az NO rendszer aktiválásán kívül fontos szerepet játszhatnak a GABA_A receptorok szinaptikus szintjének aktivitásfüggő szabályozásában is (Muir et al., 2010).

NMDA receptor közvetítette áramokat már régóta leírtak a piramissejtek szómájából történő elvezetés során, és elektrofiziológiai mérések alapján az NMDA receptorok több, mint egyharmada a serkentő szinapszisokon kívül helyezkedik el (lásd a III.6.3.2. alfejezetben). Eredményeinkkel egyetértésben a legújabb eredmények alapján, a sejttesten a GluN1 alegység mellett GluN2A és GluN2B összetételű NMDA receptorok is vannak (Harris és Pettit, 2007). Bebizonyítottuk, hogy a GABAerg szinapszisok mindhárom NMDAR alegységet kifejezik, mindamelllett azt is kimutattuk, hogy egy részük “valóban” extraszinaptikus. A piramissejtek sejttestére nem érkeznek glutamáterg szinapszisok (Megías et al., 2001), ami tovább erősíti, hogy ezek a receptorok extraszinaptikusak.



19. Ábra. Az NMDAR-nNOS jelvény feltételezett útvonalának sematikus ábrája a piramis sejtekre érkező GABAerg szinapszisokban.

Az ábrán egy szinapszis sematikus vázlatát látható. A poszt-szinaptikus aktív zónában helyezkednek el az NMDA receptorok, melyeket feltételezhetően a GABAerg szinapszisokban is megtalálható glutamát-receptor horgonyzó fehérjék (pl. GRIP1, SSCAM) kapcsolják össze a membrán alatt található nNOS molekulákkal. Az nNOS Ca²⁺-kalmodulinnal történő aktivációjával jön létre a nitrogén-monoxid termelés, mely a preszinaptikus receptorán, az α₁β₁ alegység összetételű NOsGC-én hatva cGMP termeléshez vezet. A cGMP által irányított másodlagos jelátviteli útvonalak minden bizonnyal befolyásolják a terminálisban létrejövő neurotranszmissziót. A kezdeti lépés, vagyis az NMDA receptorok aktivációja számos forrásból származhat: „túlcsorduló” vagy asztrocita eredetű glutamátból és/vagy a GABAerg terminálisok aszpartát/glutamát ürítéséből.

VII.7. Lehetséges mechanizmusok a GABAerg szinapszisokban lévő NMDA receptorok aktiválására

A leghatásosabb endogén NMDA receptor ligand a glutamát és az aszpartát. A hippocampális CCK-tartalmú kosáresejtek kifejeznek vGluT3 típusú vezikuláris glutamát transzportert (Somogyi et al., 2004). Megfigyelték, hogy a hallórendszerben a hálózat működésének szempontjából alapvető a vGluT3 tartalmú GABAerg terminálisok együttes glutamát ürítése (Noh et al., 2010). Meglepő módon hippocampális GABAerg terminálisokról kimutatták, hogy képesek vezikulárisan aszpartátot üríteni (Gundersen et al., 2004). Az eddigi egyetlen ismert vezikuláris aszpartát transzportert is sikerült már kimutatni hippocampális szinaptikus vezikulákon (Miyaji et al., 2008). Így az aszpartát és/vagy glutamát, ami a GABAerg terminálisokból ürült, képes lehet aktiválni a GABAerg szinapszisban lévő NMDA receptorokat. Habár a gyrus dentatus-ban mutattak már ki NMDA receptorokat szomatikus szimmetrikus és aszimmetrikus szinapszisokban, és immuncitokémiai bizonyítékot is találtak GABAerg terminálisokból történő aszpartát ürítésre (Gundersen et al., 2004), az NO közvetítette szabályozás minden bizonnyal eltérő itt, mivel nem tapasztaltunk cGMP jelet a gyrus dentatus kosáresejt terminálisaiban.

Egy másik lehetséges mechanizmus az NMDA receptorok aktiválására, az asztrocitákból történő glutamát ürítés. A periszomatikus GABAerg interneuronok ismétlődő ingerlésével kalcium hullámokat lehet kiváltani a szomszédos asztrocitákban GABA_B receptorok aktivációján keresztül. Ennek eredményeként az asztrociták glutamátot ürítenek, mely képes változtatni a gátló posztzinaptikus áramokat. Ezt a hatást ionotróp glutamát receptor antagonistával gátolni lehetett (Kang et al., 1998). Annak érdekében, hogy hatékonyan lehessen beindítani az NMDAR-nNOS-cGMP útvonalat a GABAerg szinapszisokban, a glutamát vagy aszpartát jelnek egybe kell esnie a piramissejt membrán depolarizációjával, amit legnagyobb valószínűséggel egy akciós potenciál idéz elő. Dendritikus vagy visszaterjedő akciós potenciálok mind hatással lehetnek a távolabbi GABAerg szinapszisokra is. Ez a mechanizmus- az asztrocita hálózat aktivációs állapota által befolyásolva-lehetővé teszi a GABAerg transzmisszió befolyásolását mind a piramissejt, mind az afferens interneuron aktivitásának függvényében.

VII.8. A NO rendszer funkcionális összehasonlítása az endokannabinoid rendszerrel a GABAerg szinapszisokban

Felmerül a kérdés, hogy miért létezik két retrográd rendszer a GABAerg szinapszisokban egymással párhuzamosan? Miben más a nitrogén-monoxid jelátvitel a már jól ismert endokannabinoid jelátvitelhez képest? Ezekre a kérdésekre próbálok választ adni, némely ponton azonban csak hipotézisemre hagyatkozhatok.

Elsőre is szembeötlő különbség a két retrográd jel szinapszis populációk közötti megoszlása. Míg az eCB jelátvitel kizárólag a CCK tartalmú interneuronok számára érhető el, addig a NO jelátvitel az interneuronok szinapszisaiban jóval általánosabb mechanizmusnak tűnik.

Következő különbség a jelpálya aktiválásában, hogy míg az NO szintézise NMDA-receptorokhoz kötött (feszültségfüggő kalcium csatornák blokkolása nem változtatta a cGMP felhalmozódását, és a metabotróp receptrok aktiválása sem váltott ki NO szintézist, lásd a VII.1. alfejezetben), addig az eCB szintézise számos inger hatására (IC és EC kalcium-szint növekedésen keresztül egyaránt, illetve metabotróp receptorokon kalcium-független útvonalon is; lásd a III.4.2. alfejezetben) végbemehet. Ha a kalciumfüggő eCB szintézist vesszük az összehasonlítás alapjául, akkor irodalmi adatok alapján az eCB szintézis $4 \mu\text{M}$ körüli intracelluláris kalcium koncentráció mellett indul meg (Wang és Zucker, 2001), míg az NO szintézis kalciumigénye $\sim 0,5\text{-}1 \mu\text{M}$ (Bredt és Snyder, 1990), vagyis sokkal kisebb ingerület mellett is kialakul az NO hatása. A szintetizáló enzimek elhelyezkedése is fontos különbséget mutat, a DGL α sosem található a szinapszisban, az mindig periszinaptikus, míg az nNOS szorosan, makromolekuláris komplexbe van kötve a teljes jelátviteli apparátussal a szinapszisban, így az nNOS számára a kisebb NMDA receptor aktiváció is lokálisan elegendő kalciumot biztosít a szintézishez. NMDA receptor aktivációval sejt kultúrában sikerült eCB szintézist és DSI-t (helyesebben: NMDA-eCB-STD-t, lásd a III.4.2.2. alfejezetben) kiváltani a gátló szinapszisokban, de csak olyan magas NMDA koncentrációval, ami maximum egy glutamáterg szinapszisban fordulhat elő, alacsonyabb koncentrációval pedig nem sikerült DSI-t (NMDA-eCB-STD-t) kiváltani (Ohno-Shosaku et al., 2007). A két retrográd jel hatótávolsága is meghatározó. Az eCB-ok $20 \mu\text{m}$ belül is képesek még szabályozni a környezetükben lévő szinapszisokat (hetroszinapsztikus moduláció, lásd a

III.4.2.4. alfejezetben), míg a NO hatása szinapszis-specifikusnak tekinthető a maximális 1-2 μm terjedéssel.

Ezek alapján feltételezhető, hogy a két jelpálya más funkció ellátására specializálódott a GABAerg szinapszisokban. A eCB-CB1R jelátvitel a preszinaptikus GABAerg aktivitástól függetlenül, a posztszinaptikus piramissejt aktivitásának megfelelően, a depolarizáció, magas kalcium-szint és az eCB heteroszínaptikus terjedése miatt több szinapszisban együttesen beindul (ami a fázis-előretolódás kialakulását eredményezheti). Ezzel szemben, az NMDA receptorok koincidencia detektor tulajdonsága miatt, a NO rendszer aktiválása csak a pre- és posztszinaptikus sejt vagy a hálózati aktivitásra reagáló gliasejt és posztszinaptikus sejt együttes aktivációja során, lokális kalciumszint növekedéssel és szinapszis-specifikusan alakul ki, sokkal pontosabb szabályozást téve lehetővé a pre- és posztszinaptikus sejt kommunikációjában.

VIII. KÖVETKEZTETÉSEK

Értekezésem következtetései az alábbiak:

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

(2) a NO receptora 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 kosársejt terminálisokban NMDAR-, nNOS- és NOsGC-függő módon specifikusan a hippokampusz CA1 és CA3c régiójában, ezzel szemben a CA3ab esetében a cGMP halmozódás NMDAR független módon történik,

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

(6) a szomatikus GABAerg szinapszisok legalább kétharmada tartalmazott NMDA receptort -mindhárom vizsgált alegységet- tized akkora sűrűségben, mint a glutamáterg szinapszisok,

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

Eredményeink tükrében a CA1 piramissejtek periszomatikus 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.

IX. ÖSSZEFOGLALÁS

A nitrogén monoxid (NO) fontos szerepet játszik a neuronok szinaptikus plaszticitásában és a retrográd jelátvitelben. Szintetizáló enzime az idegsejtekben a neuronális NO szintáz (nNOS). Receptora, a NO szenzitív guanilát cikláz (NOsGC) az agyban két funkcionális alegységösszetételével van jelen, $\alpha_1\beta_1$ és $\alpha_2\beta_1$ heterodimerként. Első kísérletsorozatunkban vizsgáltuk, hogy a retrográd NO jelátviteli útvonal elemei jelenhetnek-e a glutamáterg szinapszisokon kívül a GABAergekben is. Munkánkban elsőként mutattuk ki, hogy a nNOS megtalálható a piramissejteken végződő GABAerg terminálisok szinapszisaiban is. Leírtuk, hogy az NOsGC α_1 -alegységét csak interneuronok fejezik ki, piramissejtek nem, így feltehetően az előbbieket $\alpha_1\beta_1$ -, míg utóbbiak $\alpha_2\beta_1$ -alegység-összetételű NO-receptort használnak. Kombinált immunarany-immunoperoxidáz módszerrel azt találtuk, hogy a PV és CCK pozitív sejtek terminálisaiban is jelen van az α_1 alegység. Az eredményeink igazolják, hogy a piramissejtekre érkező GABAerg szinapszisok rendelkeznek a retrográd NO jelátviteli útvonal molekuláris elemeivel.

Az NO termelődéséhez posztszinaptikus kalcium-jelre van szükség, mely a glutamáterg szinapszisokban NMDAR-aktiváció útján jön létre. Második kísérletsorozatunkban arra kerestük a választ, vajon a GABAerg szinapszisokban beindíthatja-e az NMDAR aktivációja az nNOS működését, és megtalálhatóak-e ezen receptorok a GABAerg szinapszisokban is. Hippokampális túlélő szeletben NMDA adagolásra jelentős cGMP termelést figyeltünk meg a GABAerg terminálisokban, ami eltűnt a NO rendszer blokkolóival és hiányzott az nNOS génkiütött egérből. Fagyasztva töréses replika immunarany technikával és beágyazás-utáni immunhisztokémiával kimutattuk, hogy a szomatikus GABAerg szinapszisok 2/3-a tartalmaz NMDAR-okat a posztszinaptikus aktív zónában, és ezekben a szinapszisokban közel 10-szer kisebb NMDA-R sűrűséget találtunk a serkentő szinapszisokhoz képest.

Következésképpen, a hippocampális kosársejt terminálisok szinapszisaiban jelen vannak az NMDAR-ok, és aktivációjuk NO közvetítette cGMP termeléshez vezet ezekben terminálisokban. Az általunk leírt jelátviteli útvonal szerepet játszhat a piramissejtek GABAerg bemenetének aktivitás-függő szabályozásában.

SUMMARY

Nitric oxide (NO) plays an important role in synaptic plasticity and retrograde signaling. In neurons, the synthesizing enzyme of NO is the neuronal nitric oxide synthase (nNOS). Its receptor, the NO-sensitive guanylate cyclase (NOsGC), is present in the brain with two functional subunit composition, as $\alpha_1\beta_1$ and $\alpha_2\beta_1$ heterodimers.

In the first series of experiments we examined, whether the molecular elements of the retrograde NO signaling pathway are present not only in glutamatergic, but also in GABAergic synapses. We showed for the first time that nNOS is also present in GABAergic synapses on pyramidal cells. We described that the α_1 -subunit of NOsGC is present only in interneurons, but not in pyramidal cells, suggesting that the former express $\alpha_1\beta_1$ NO receptors, while pyramidal cells express $\alpha_2\beta_1$ subunits. Using the combined immunogold-immunoperoxidase technique we found that both PV and CCK positive boutons express NO receptors. Our results prove that GABAergic synapses on pyramidal cells possess the molecular machinery for retrograde nitric-oxide signaling.

The release of NO requires postsynaptic calcium elevation, that is achieved via NMDA receptors in glutamatergic synapses. In the second series of experiments we investigated whether activation of NMDA receptors could lead to the production of NO in GABAergic synapses as well, and whether NMDA receptors are also present in these synapses. We observed a significant cGMP production in GABAergic terminals after NMDA application in *in vitro* hippocampal slice preparations, that was absent when co-applied with NO-system blockers or in slices from nNOS knockout animals. Using freeze-fracture replica labeling and postembedding immunogold labeling we found that 2/3 of somatic GABAergic synapses express NMDA receptors in the postsynaptic active zone, and the density of these receptors in these synapses was one order of magnitude smaller than in the glutamatergic synapses.

In conclusion, the synapses of hippocampal basket terminals express NMDA receptors postsynaptically, the activation of which leads to presynaptic cGMP production via the synthesis of NO. This retrograde signaling pathway could play an important role in the activity-dependent regulation of GABAergic input of pyramidal cells.

X. IRODALOMJEGYZÉK

- Abe, M., M. Fukaya, T. Yagi, M. Mishina, M. Watanabe, and K. Sakimura, 2004, NMDA receptor GluRepsilon/NR2 subunits are essential for postsynaptic localization and protein stability of GluRzeta1/NR1 subunit.: *J Neurosci*, v. 24, p. 7292-304.
- Abercrombie, M., 1946, Estimation of nuclear population from microtome sections: *Anat Rec*, v. 94, p. 239-47.
- Acsády, L., A. Kamondi, A. Sík, T. Freund, and G. Buzsáki, 1998, GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus: *J Neurosci*, v. 18, p. 3386-403.
- Acsády, L., and S. Káli, 2007, Models, structure, function: the transformation of cortical signals in the dentate gyrus: *Prog Brain Res*, v. 163, p. 577-99.
- Akashi, K., T. Kakizaki, H. Kamiya, M. Fukaya, M. Yamasaki, M. Abe, R. Natsume, M. Watanabe, and K. Sakimura, 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*, v. 29, p. 10869-82.
- Alagarsamy, S., G. Lonart, and K. M. Johnson, 1994, Regulation of nitric oxide synthase activity in cortical slices by excitatory amino acids and calcium: *J Neurosci Res*, v. 38, p. 648-53.
- Alderton, W. K., C. E. Cooper, and R. G. Knowles, 2001, Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition: *Biochem J*, v. 357, p. 593-615.
- Amaral DG, Witter, MP. Hippocampal formation. In: Paxinos G, szerkesztő. *The rat nervous system*, 2. kiadás. San Diego: Academic Press 1995:433-495
- Armstrong, C., E. Krook-Magnuson, and I. Soltesz, 2012, Neurogliaform and Ivy Cells: A Major Family of nNOS Expressing GABAergic Neurons: *Front Neural Circuits*, v. 6, p. 23.
- Auld, D. S., and R. Robitaille, 2003, Glial cells and neurotransmission: an inclusive view of synaptic function: *Neuron*, v. 40, p. 389-400.

- Bang, M. L., and S. Owczarek, 2013, A matter of balance: role of neurexin and neuroligin at the synapse: *Neurochem Res*, v. 38, p. 1174-89.
- Bellamy, T. C., J. Wood, D. A. Goodwin, and J. Garthwaite, 2000, Rapid desensitization of the nitric oxide receptor, soluble guanylyl cyclase, underlies diversity of cellular cGMP responses: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 97, p. 2928-33.
- Bergmann, O., and J. Frisé, 2013, Neuroscience. Why adults need new brain cells: *Science*, v. 340, p. 695-6.
- Blackshaw, S., M. J. Eliasson, A. Sawa, C. C. Watkins, D. Krug, A. Gupta, T. Arai, R. J. Ferrante, and S. H. Snyder, 2003, Species, strain and developmental variations in hippocampal neuronal and endothelial nitric oxide synthase clarify discrepancies in nitric oxide-dependent synaptic plasticity: *Neuroscience*, v. 119, p. 979-90.
- Blahos, J., and R. J. Wenthold, 1996, Relationship between N-methyl-D-aspartate receptor NR1 splice variants and NR2 subunits: *J Biol Chem*, v. 271, p. 15669-74.
- Blottner, D., 1999, Nitric oxide and target-organ control in the autonomic nervous system: anatomical distribution, spatiotemporal signaling, and neuroeffector maintenance: *J Neurosci Res*, v. 58, p. 139-51.
- Blundell, J., C. A. Blaiss, M. R. Etherton, F. Espinosa, K. Tabuchi, C. Walz, M. F. Bolliger, T. C. Südhof, and C. M. Powell, 2010, Neuroligin-1 deletion results in impaired spatial memory and increased repetitive behavior: *J Neurosci*, v. 30, p. 2115-29.
- Blundell, J., K. Tabuchi, M. F. Bolliger, C. A. Blaiss, N. Brose, X. Liu, T. C. Südhof, and C. M. Powell, 2009, Increased anxiety-like behavior in mice lacking the inhibitory synapse cell adhesion molecule neuroligin 2: *Genes Brain Behav*, v. 8, p. 114-26.
- Bon, C. L., and J. Garthwaite, 2003, On the role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation: *J Neurosci*, v. 23, p. 1941-8.
- Bottos, A., A. Rissone, F. Bussolino, and M. Arese, 2011, Neurexins and neuroligins: synapses look out of the nervous system: *Cell Mol Life Sci*, v. 68, p. 2655-66.

- Boulton, C. L., A. J. Irving, E. Southam, B. Potier, J. Garthwaite, and G. L. Collingridge, 1994, The nitric oxide--cyclic GMP pathway and synaptic depression in rat hippocampal slices: *Eur J Neurosci*, v. 6, p. 1528-35.
- Bredt, D., and S. Snyder, 1990, Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 87, p. 682-5.
- Brenman, J., and D. Bredt, 1997, Synaptic signaling by nitric oxide.: *Curr Opin Neurobiol*, v. 7, p. 374-8.
- Brenman, J. E., D. S. Chao, S. H. Gee, A. W. McGee, S. E. Craven, D. R. Santillano, Z. Wu, F. Huang, H. Xia, M. F. Peters, S. C. Froehner, and D. S. Bredt, 1996, Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains: *Cell*, v. 84, p. 757-67.
- Budreck, E. C., O. B. Kwon, J. H. Jung, S. Baudouin, A. Thommen, H. S. Kim, Y. Fukazawa, H. Harada, K. Tabuchi, R. Shigemoto, P. Scheiffele, and J. H. Kim, 2013, Neuroligin-1 controls synaptic abundance of NMDA-type glutamate receptors through extracellular coupling: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 110, p. 725-30.
- Burette, A., U. Zabel, R. J. Weinberg, H. H. Schmidt, and J. G. Valtschanoff, 2002b, Synaptic localization of nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase in the hippocampus: *J Neurosci*, v. 22, p. 8961-70.
- Burgunder, J. M., and P. T. Cheung, 1994, Expression of soluble guanylyl cyclase gene in adult rat brain: *Eur J Neurosci*, v. 6, p. 211-7.
- Buzsáki, G., 1986, Hippocampal sharp waves: their origin and significance: *Brain Res*, v. 398, p. 242-52.
- Buzsáki, G., 1989, Two-stage model of memory trace formation: a role for "noisy" brain states: *Neuroscience*, v. 31, p. 551-70.
- Chang, Y., and D. Gottlieb, 1988, Characterization of the proteins purified with monoclonal antibodies to glutamic acid decarboxylase.: *J Neurosci*, v. 8, p. 2123-30.
- Charych, E. I., W. Yu, R. Li, D. R. Serwanski, C. P. Miralles, X. Li, B. Y. Yang, N. Pinal, R. Walikonis, and A. L. De Blas, 2004, A four PDZ domain-containing splice variant form of GRIP1 is localized in GABAergic and glutamatergic synapses in the brain: *J Biol Chem*, v. 279, p. 38978-90.

- Chazot, P. L., and F. A. Stephenson, 1997, Molecular dissection of native mammalian forebrain NMDA receptors containing the NR1 C2 exon: direct demonstration of NMDA receptors comprising NR1, NR2A, and NR2B subunits within the same complex: *J Neurochem*, v. 69, p. 2138-44.
- Chevaleyre, V., and P. E. Castillo, 2003, Heterosynaptic LTD of hippocampal GABAergic synapses: a novel role of endocannabinoids in regulating excitability: *Neuron*, v. 38, p. 461-72.
- Csicsvari, J., B. Jamieson, K. D. Wise, and G. Buzsáki, 2003, Mechanisms of gamma oscillations in the hippocampus of the behaving rat: *Neuron*, v. 37, p. 311-22.
- Daff, S., 2010, NO synthase: structures and mechanisms: *Nitric Oxide*, v. 23, p. 1-11.
- de Vente, J., E. Asan, S. Gambaryan, M. Markerink-van Ittersum, H. Axer, K. Gallatz, S. M. Lohmann, and M. Palkovits, 2001, Localization of cGMP-dependent protein kinase type II in rat brain: *Neuroscience*, v. 108, p. 27-49.
- de Vente, J., and H. Steinbusch, 1992, On the stimulation of soluble and particulate guanylate cyclase in the rat brain and the involvement of nitric oxide as studied by cGMP immunocytochemistry.: *Acta Histochem*, v. 92, p. 13-38.
- de Vente, J., H. Steinbusch, and J. Schipper, 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*, v. 22, p. 361-73.
- Ding, J. D., A. Burette, P. I. Nedvetsky, H. H. Schmidt, and R. J. Weinberg, 2004, Distribution of soluble guanylyl cyclase in the rat brain: *J Comp Neurol*, v. 472, p. 437-48.
- Dingledine, R., K. Borges, D. Bowie, and S. F. Traynelis, 1999, The glutamate receptor ion channels: *Pharmacol Rev*, v. 51, p. 7-61.
- Domek-Łopacińska, K., and J. B. Strosznajder, 2005, Cyclic GMP metabolism and its role in brain physiology: *J Physiol Pharmacol*, v. 56 Suppl 2, p. 15-34.
- Doyle, C., C. Hölscher, M. J. Rowan, and R. Anwyl, 1996, The selective neuronal NO synthase inhibitor 7-nitro-indazole blocks both long-term potentiation and depotentiation of field EPSPs in rat hippocampal CA1 in vivo: *J Neurosci*, v. 16, p. 418-24.
- Drachman, D. A., 2005, Do we have brain to spare?: *Neurology*, v. 64, p. 2004-5.

- East, S., and J. Garthwaite, 1991, NMDA receptor activation in rat hippocampus induces cyclic GMP formation through the L-arginine-nitric oxide pathway.: *Neurosci Lett*, v. 123, p. 17-9.
- Edwards, T. M., and N. S. Rickard, 2007, New perspectives on the mechanisms through which nitric oxide may affect learning and memory processes: *Neurosci Biobehav Rev*, v. 31, p. 413-25.
- El-Husseini, A. E., E. Schnell, D. M. Chetkovich, R. A. Nicoll, and D. S. Bredt, 2000, PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses: *Science*, v. 290, p. 1364-8.
- Etherton, M., C. Földy, M. Sharma, K. Tabuchi, X. Liu, M. Shamloo, R. C. Malenka, and T. C. Südhof, 2011, Autism-linked neuroligin-3 R451C mutation differentially alters hippocampal and cortical synaptic function: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 108, p. 13764-9.
- Feil, S., P. Zimmermann, A. Knorn, S. Brummer, J. Schlossmann, F. Hofmann, and R. Feil, 2005, Distribution of cGMP-dependent protein kinase type I and its isoforms in the mouse brain and retina: *Neuroscience*, v. 135, p. 863-8.
- Fellin, T., O. Pascual, S. Gobbo, T. Pozzan, P. G. Haydon, and G. Carmignoto, 2004, Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors: *Neuron*, v. 43, p. 729-43.
- Freund, J., A. M. Brandmaier, L. Lewejohann, I. Kirste, M. Kritzler, A. Krüger, N. Sachser, U. Lindenberger, and G. Kempermann, 2013, Emergence of individuality in genetically identical mice: *Science*, v. 340, p. 756-9.
- Freund, T. F., 2003, Interneuron Diversity series: Rhythm and mood in perisomatic inhibition: *Trends Neurosci*, v. 26, p. 489-95.
- Freund, T. F., and M. Antal, 1988, GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus: *Nature*, v. 336, p. 170-3.
- Freund, T. F., and G. Buzsáki, 1996, Interneurons of the hippocampus: *Hippocampus*, v. 6, p. 347-470.
- Freund, T. F., and A. I. Gulyás, 1997, Inhibitory control of GABAergic interneurons in the hippocampus: *Can J Physiol Pharmacol*, v. 75, p. 479-87.
- Freund, T. F., and I. Katona, 2007, Perisomatic inhibition: *Neuron*, v. 56, p. 33-42.

- Friebe, A., E. Mergia, O. Dangel, A. Lange, and D. Koesling, 2007, Fatal gastrointestinal obstruction and hypertension in mice lacking nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 104, p. 7699-704.
- Fuentealba, P., R. Begum, M. Capogna, S. Jinno, L. F. Márton, J. Csicsvari, A. Thomson, P. Somogyi, and T. Klausberger, 2008, Ivy cells: a population of nitric-oxide-producing, slow-spiking GABAergic neurons and their involvement in hippocampal network activity: *Neuron*, v. 57, p. 917-29.
- Fukaya, M., A. Kato, C. Lovett, S. Tonegawa, and M. Watanabe, 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*, v. 100, p. 4855-60.
- Förstermann, U., H. H. Schmidt, J. S. Pollock, H. Sheng, J. A. Mitchell, T. D. Warner, M. Nakane, and F. Murad, 1991, Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types: *Biochem Pharmacol*, v. 42, p. 1849-57.
- Garthwaite, J., 2008, Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission.: *Eur J Neurosci*, v. 27, p. 2783-802.
- Garthwaite, J., G. Garthwaite, R. Palmer, and S. Moncada, 1989, NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices.: *Eur J Pharmacol*, v. 172, p. 413-6.
- Gibb, B. J., and J. Garthwaite, 2001, Subunits of the nitric oxide receptor, soluble guanylyl cyclase, expressed in rat brain: *Eur J Neurosci*, v. 13, p. 539-44.
- Goebel-Goody, S. M., K. D. Davies, R. M. Alvestad Linger, R. K. Freund, and M. D. Browning, 2009, Phospho-regulation of synaptic and extrasynaptic N-methyl-d-aspartate receptors in adult hippocampal slices: *Neuroscience*, v. 158, p. 1446-59.
- Gulyás, A. I., R. Miles, A. Sík, K. Tóth, N. Tamamaki, and T. F. Freund, 1993, Hippocampal pyramidal cells excite inhibitory neurons through a single release site: *Nature*, v. 366, p. 683-7.
- Gundersen, V., A. Holten, and J. Storm-Mathisen, 2004, GABAergic synapses in hippocampus exocytose aspartate on to NMDA receptors: quantitative immunogold evidence for co-transmission.: *Mol Cell Neurosci*, v. 26, p. 156-65.

- Hall, C., and J. Garthwaite, 2009, What is the real physiological NO concentration in vivo?: Nitric Oxide, v. 21, p. 92-103.
- Hardingham, G. E., and H. Bading, 2003, The Yin and Yang of NMDA receptor signalling: Trends Neurosci, v. 26, p. 81-9.
- Harris, A. Z., and D. L. Pettit, 2007, Extrasynaptic and synaptic NMDA receptors form stable and uniform pools in rat hippocampal slices: J Physiol, v. 584, p. 509-19.
- Hawkins, R. D., H. Son, and O. Arancio, 1998, Nitric oxide as a retrograde messenger during long-term potentiation in hippocampus: Prog Brain Res, v. 118, p. 155-72.
- Hirao, K., Y. Hata, N. Ide, M. Takeuchi, M. Irie, I. Yao, M. Deguchi, A. Toyoda, T. Sudhof, and Y. Takai, 1998, A novel multiple PDZ domain-containing molecule interacting with N-methyl-D-aspartate receptors and neuronal cell adhesion proteins.: J Biol Chem, v. 273, p. 21105-10.
- Hu, J., and E. E. el-Fakahany, 1993, Role of intercellular and intracellular communication by nitric oxide in coupling of muscarinic receptors to activation of guanylate cyclase in neuronal cells: J Neurochem, v. 61, p. 578-85.
- Hunt, D. L., and P. E. Castillo, 2012, Synaptic plasticity of NMDA receptors: mechanisms and functional implications: Curr Opin Neurobiol, v. 22, p. 496-508.
- Hájos, N., I. Katona, S. S. Naiem, K. MacKie, C. Ledent, I. Mody, and T. F. Freund, 2000, Cannabinoids inhibit hippocampal GABAergic transmission and network oscillations: Eur J Neurosci, v. 12, p. 3239-49.
- Hájos, N., J. Pálhalmi, E. O. Mann, B. Németh, O. Paulsen, and T. F. Freund, 2004, Spike timing of distinct types of GABAergic interneuron during hippocampal gamma oscillations in vitro: J Neurosci, v. 24, p. 9127-37.
- Iino, M., 2006, Ca²⁺-dependent inositol 1,4,5-trisphosphate and nitric oxide signaling in cerebellar neurons.: J Pharmacol Sci, v. 100, p. 538-44.
- Ito, I., K. Futai, H. Katagiri, M. Watanabe, K. Sakimura, M. Mishina, and H. Sugiyama, 1997, Synapse-selective impairment of NMDA receptor functions in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 or epsilon 2 subunit.: J Physiol, v. 500 (Pt 2), p. 401-8.

- Iwasato, T., A. Datwani, A. Wolf, H. Nishiyama, Y. Taguchi, S. Tonegawa, T. Knöpfel, R. Erzurumlu, and S. Itoharu, 2000, Cortex-restricted disruption of NMDAR1 impairs neuronal patterns in the barrel cortex.: *Nature*, v. 406, p. 726-31.
- Jinno, S., and T. Kosaka, 2000, Colocalization of parvalbumin and somatostatin-like immunoreactivity in the mouse hippocampus: quantitative analysis with optical disector: *J Comp Neurol*, v. 428, p. 377-88.
- Jinno, S., and T. Kosaka, 2002, Patterns of expression of calcium binding proteins and neuronal nitric oxide synthase in different populations of hippocampal GABAergic neurons in mice: *J Comp Neurol*, v. 449, p. 1-25.
- Jinno, S., and T. Kosaka, 2004, Patterns of colocalization of neuronal nitric oxide synthase and somatostatin-like immunoreactivity in the mouse hippocampus: quantitative analysis with optical disector: *Neuroscience*, v. 124, p. 797-808.
- Jinno, S., and T. Kosaka, 2006, Cellular architecture of the mouse hippocampus: a quantitative aspect of chemically defined GABAergic neurons with stereology: *Neurosci Res*, v. 56, p. 229-45.
- Káli Sz. és Acsády L.: A hippocampuszfüggő memória neurobiológiai alapjai, In: Pléh Cs.-Kovács Gy.-Gulyás B. (szerk.), *Kognitív Igedtudomány*, Osiris Kiadó, Budapest 2003: 360-384.
- Kang, J., L. Jiang, S. Goldman, and M. Nedergaard, 1998, Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission.: *Nat Neurosci*, v. 1, p. 683-92.
- Kano, M., T. Ohno-Shosaku, Y. Hashimoto-dani, M. Uchigashima, and M. Watanabe, 2009, Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission: *Physiol Rev*, v. 89, p. 309-80.
- Kasugai, Y., J. D. Swinny, J. D. B. Roberts, Y. Dalezios, Y. Fukazawa, W. Sieghart, R. Shigemoto, and P. Somogyi, 2010, Quantitative localisation of synaptic and extrasynaptic GABAA receptor subunits on hippocampal pyramidal cells by freeze-fracture replica immunolabelling: *European Journal of Neuroscience*.
- Katona, I., and T. F. Freund, 2008, Endocannabinoid signaling as a synaptic circuit breaker in neurological disease: *Nat Med*, v. 14, p. 923-30.
- Katona, I., B. Sperlág, A. Sík, A. Káfalvi, E. S. Vizi, K. Mackie, and T. F. Freund, 1999, Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA

- release from axon terminals of specific hippocampal interneurons: *J Neurosci*, v. 19, p. 4544-58.
- Katona, I., G. M. Urbán, M. Wallace, C. Ledent, K. M. Jung, D. Piomelli, K. Mackie, and T. F. Freund, 2006, Molecular composition of the endocannabinoid system at glutamatergic synapses: *J Neurosci*, v. 26, p. 5628-37.
- Kennedy, M. B., 2000, Signal-processing machines at the postsynaptic density: *Science*, v. 290, p. 750-4.
- Kingston, P. A., F. Zufall, and C. J. Barnstable, 1996, Rat hippocampal neurons express genes for both rod retinal and olfactory cyclic nucleotide-gated channels: novel targets for cAMP/cGMP function: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 93, p. 10440-5.
- Kittler, J. T., I. L. Arancibia-Carcamo, and S. J. Moss, 2004, Association of GRIP1 with a GABA(A) receptor associated protein suggests a role for GRIP1 at inhibitory synapses: *Biochem Pharmacol*, v. 68, p. 1649-54.
- Klausberger, T., L. F. Marton, J. O'Neill, J. H. Huck, Y. Dalezios, P. Fuentealba, W. Y. Suen, E. Papp, T. Kaneko, M. Watanabe, J. Csicsvari, and P. Somogyi, 2005, Complementary roles of cholecystinin- and parvalbumin-expressing GABAergic neurons in hippocampal network oscillations: *J Neurosci*, v. 25, p. 9782-93.
- Klausberger, T., and P. Somogyi, 2008, Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations: *Science*, v. 321, p. 53-7.
- Kleppisch, T., A. Pfeifer, P. Klatt, P. Ruth, A. Montkowski, R. Fässler, and F. Hofmann, 1999, Long-term potentiation in the hippocampal CA1 region of mice lacking cGMP-dependent kinases is normal and susceptible to inhibition of nitric oxide synthase: *J Neurosci*, v. 19, p. 48-55.
- Klyachko, V. A., G. P. Ahern, and M. B. Jackson, 2001, cGMP-mediated facilitation in nerve terminals by enhancement of the spike afterhyperpolarization: *Neuron*, v. 31, p. 1015-25.
- Kobialka, M., and W. A. Gorczyca, 2000, Particulate guanylyl cyclases: multiple mechanisms of activation: *Acta Biochim Pol*, v. 47, p. 517-28.
- Koesling, D., M. Russwurm, E. Mergia, F. Mullershausen, and A. Friebe, 2004, Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase: structure and regulation: *Neurochem Int*, v. 45, p. 813-9.

- Kosaka, T., K. Kosaka, K. Tateishi, Y. Hamaoka, N. Yanaihara, J. Y. Wu, and K. Hama, 1985, GABAergic neurons containing CCK-8-like and/or VIP-like immunoreactivities in the rat hippocampus and dentate gyrus: *J Comp Neurol*, v. 239, p. 420-30.
- Kraus, M. M., and H. Prast, 2002, Involvement of nitric oxide, cyclic GMP and phosphodiesterase 5 in excitatory amino acid and GABA release in the nucleus accumbens evoked by activation of the hippocampal fimbria: *Neuroscience*, v. 112, p. 331-43.
- Krumenacker, J. S., K. A. Hanafy, and F. Murad, 2004, Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase: *Brain Res Bull*, v. 62, p. 505-15.
- Káli, S., and T. F. Freund, 2005, Distinct properties of two major excitatory inputs to hippocampal pyramidal cells: a computational study: *Eur J Neurosci*, v. 22, p. 2027-48.
- Köhr, G., 2006, NMDA receptor function: subunit composition versus spatial distribution: *Cell Tissue Res*, v. 326, p. 439-46.
- Lau, C. G., and R. S. Zukin, 2007, NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders: *Nat Rev Neurosci*, v. 8, p. 413-26.
- Laube, B., J. Kuhse, and H. Betz, 1998, Evidence for a tetrameric structure of recombinant NMDA receptors.: *J Neurosci*, v. 18, p. 2954-61.
- Lauri, S. E., Z. A. Bortolotto, D. Bleakman, P. L. Ornstein, D. Lodge, J. T. Isaac, and G. L. Collingridge, 2001, A critical role of a facilitatory presynaptic kainate receptor in mossy fiber LTP: *Neuron*, v. 32, p. 697-709.
- Ledo, A., J. Frade, R. Barbosa, and J. Laranjinha, 2004, Nitric oxide in brain: diffusion, targets and concentration dynamics in hippocampal subregions.: *Mol Aspects Med*, v. 25, p. 75-89.
- Lee, S., and J. Stull, 1998, Calmodulin-dependent regulation of inducible and neuronal nitric-oxide synthase.: *J Biol Chem*, v. 273, p. 27430-7.
- Levey, A. I., 1996, Muscarinic acetylcholine receptor expression in memory circuits: implications for treatment of Alzheimer disease: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 93, p. 13541-6.
- Levey, A. I., S. M. Edmunds, V. Koliatsos, R. G. Wiley, and C. J. Heilman, 1995, Expression of m1-m4 muscarinic acetylcholine receptor proteins in rat

- hippocampus and regulation by cholinergic innervation: *J Neurosci*, v. 15, p. 4077-92.
- Li, D. P., S. R. Chen, T. F. Finnegan, and H. L. Pan, 2004, Signalling pathway of nitric oxide in synaptic GABA release in the rat paraventricular nucleus: *J Physiol*, v. 554, p. 100-10.
- Lorente de Nó R (1934) Studies on the structure of the cerebral cortex – II. Continuation of the study of the ammonic system. *J Psychol Neurol* 46:113-177
- Lourenço, J., A. Cannich, M. Carta, F. Coussen, C. Mulle, and G. Marsicano, 2010, Synaptic activation of kainate receptors gates presynaptic CB(1) signaling at GABAergic synapses: *Nat Neurosci*, v. 13, p. 197-204.
- Lovick, T., L. Brown, and B. Key, 1999, Neurovascular relationships in hippocampal slices: physiological and anatomical studies of mechanisms underlying flow-metabolism coupling in intraparenchymal microvessels.: *Neuroscience*, v. 92, p. 47-60.
- Luján, R., J. D. Roberts, R. Shigemoto, H. Ohishi, and P. Somogyi, 1997, Differential plasma membrane distribution of metabotropic glutamate receptors mGluR1 alpha, mGluR2 and mGluR5, relative to neurotransmitter release sites: *J Chem Neuroanat*, v. 13, p. 219-41.
- Lörincz, A., T. Notomi, G. Tamás, R. Shigemoto, and Z. Nusser, 2002, Polarized and compartment-dependent distribution of HCN1 in pyramidal cell dendrites: *Nat Neurosci*, v. 5, p. 1185-93.
- Maccaferri, G., and C. J. McBain, 1996, The hyperpolarization-activated current (I_h) and its contribution to pacemaker activity in rat CA1 hippocampal stratum oriens-alveus interneurons: *J Physiol*, v. 497 (Pt 1), p. 119-30.
- Magee, J., D. Hoffman, C. Colbert, and D. Johnston, 1998, Electrical and calcium signaling in dendrites of hippocampal pyramidal neurons: *Annu Rev Physiol*, v. 60, p. 327-46.
- Makara, J., I. Katona, G. Nyíri, B. Németh, C. Ledent, M. Watanabe, J. de Vente, T. Freund, and N. Hájos, 2007, Involvement of nitric oxide in depolarization-induced suppression of inhibition in hippocampal pyramidal cells during activation of cholinergic receptors.: *J Neurosci*, v. 27, p. 10211-22.

- Makhinson, M., P. Opazo, H. J. Carlisle, B. Godsil, S. G. Grant, and T. J. O'Dell, 2006, A novel role for cyclic guanosine 3',5'monophosphate signaling in synaptic plasticity: a selective suppressor of protein kinase A-dependent forms of long-term potentiation: *Neuroscience*, v. 140, p. 415-31.
- Mathes, C., and S. H. Thompson, 1996, The nitric oxide/cGMP pathway couples muscarinic receptors to the activation of Ca²⁺ influx: *J Neurosci*, v. 16, p. 1702-9.
- Megías, M., Z. Emri, T. F. Freund, and A. I. Gulyás, 2001, Total number and distribution of inhibitory and excitatory synapses on hippocampal CA1 pyramidal cells: *Neuroscience*, v. 102, p. 527-40.
- Mergia, E., A. Friebe, O. Dangel, M. Russwurm, and D. Koesling, 2006, Spare guanylyl cyclase NO receptors ensure high NO sensitivity in the vascular system: *J Clin Invest*, v. 116, p. 1731-7.
- Miyaji, T., N. Echigo, M. Hiasa, S. Senoh, H. Omote, and Y. Moriyama, 2008, Identification of a vesicular aspartate transporter.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 105, p. 11720-4.
- Monaghan, D., and C. Cotman, 1985, Distribution of N-methyl-D-aspartate-sensitive L-[³H]glutamate-binding sites in rat brain.: *J Neurosci*, v. 5, p. 2909-19.
- Monfort, P., M. D. Muñoz, E. Kosenko, and V. Felipe, 2002, Long-term potentiation in hippocampus involves sequential activation of soluble guanylate cyclase, cGMP-dependent protein kinase, and cGMP-degrading phosphodiesterase: *J Neurosci*, v. 22, p. 10116-22.
- Monyer, H., R. Sprengel, R. Schoepfer, A. Herb, M. Higuchi, H. Lomeli, N. Burnashev, B. Sakmann, and P. Seeburg, 1992, Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes.: *Science*, v. 256, p. 1217-21.
- Muir, J., I. L. Arancibia-Carcamo, A. F. MacAskill, K. R. Smith, L. D. Griffin, and J. T. Kittler, 2010, NMDA receptors regulate GABAA receptor lateral mobility and clustering at inhibitory synapses through serine 327 on the γ 2 subunit: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 107, p. 16679-84.
- Müller, B. M., U. Kistner, R. W. Veh, C. Cases-Langhoff, B. Becker, E. D. Gundelfinger, and C. C. Garner, 1995, Molecular characterization and spatial distribution of SAP97, a novel presynaptic protein homologous to SAP90 and

- the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein: *J Neurosci*, v. 15, p. 2354-66.
- Namiki, S., S. Kakizawa, K. Hirose, and M. Iino, 2005, NO signalling decodes frequency of neuronal activity and generates synapse-specific plasticity in mouse cerebellum.: *J Physiol*, v. 566, p. 849-63.
- Nicoll, R. A., and K. W. Roche, 2013, Long-term potentiation: Peeling the onion: *Neuropharmacology*.
- Noh, J., R. Seal, J. Garver, R. Edwards, and K. Kandler, 2010, Glutamate co-release at GABA/glycinergic synapses is crucial for the refinement of an inhibitory map.: *Nat Neurosci*, v. 13, p. 232-8.
- Nyilas, R., B. Dudok, G. M. Urbán, K. Mackie, M. Watanabe, B. F. Cravatt, T. F. Freund, and I. Katona, 2008, Enzymatic machinery for endocannabinoid biosynthesis associated with calcium stores in glutamatergic axon terminals: *J Neurosci*, v. 28, p. 1058-63.
- Nyíri, G., C. Cserép, E. Szabadits, K. Mackie, and T. Freund, 2005, CB1 cannabinoid receptors are enriched in the perisynaptic annulus and on preterminal segments of hippocampal GABAergic axons.: *Neuroscience*, v. 136, p. 811-22.
- Nyíri, G., T. Freund, and P. Somogyi, 2001, Input-dependent synaptic targeting of alpha(2)-subunit-containing GABA(A) receptors in synapses of hippocampal pyramidal cells of the rat.: *Eur J Neurosci*, v. 13, p. 428-42.
- Ohno-Shosaku, T., Y. Hashimoto-dani, M. Ano, S. Takeda, H. Tsubokawa, and M. Kano, 2007, Endocannabinoid signalling triggered by NMDA receptor-mediated calcium entry into rat hippocampal neurons: *J Physiol*, v. 584, p. 407-18.
- Ohno-Shosaku, T., S. Sawada, and M. Kano, 2000, Heterosynaptic expression of depolarization-induced suppression of inhibition (DSI) in rat hippocampal cultures: *Neurosci Res*, v. 36, p. 67-71.
- Ozaki, M., I. Shibuya, N. Kabashima, T. Isse, J. Noguchi, Y. Ueta, Y. Inoue, A. Shigematsu, and H. Yamashita, 2000, Preferential potentiation by nitric oxide of spontaneous inhibitory postsynaptic currents in rat supraoptic neurones: *J Neuroendocrinol*, v. 12, p. 273-81.
- Paoletti, P., 2011, Molecular basis of NMDA receptor functional diversity: *Eur J Neurosci*, v. 33, p. 1351-65.

- Papadia, S., and G. E. Hardingham, 2007, The dichotomy of NMDA receptor signaling: *Neuroscientist*, v. 13, p. 572-9.
- Pifarré, P., A. García, and G. Mengod, 2007, Species differences in the localization of soluble guanylyl cyclase subunits in monkey and rat brain: *J Comp Neurol*, v. 500, p. 942-57.
- Prast, H., and A. Philippu, 2001, Nitric oxide as modulator of neuronal function: *Prog Neurobiol*, v. 64, p. 51-68.
- Pérez-Otaño, I., and M. D. Ehlers, 2004, Learning from NMDA receptor trafficking: clues to the development and maturation of glutamatergic synapses: *Neurosignals*, v. 13, p. 175-89.
- O'Keefe J, Nadel L, *The Hippocampus as a Cognitive Map*, Oxford University Press 1978:103-140
- Racca, C., F. Stephenson, P. Streit, J. Roberts, and P. Somogyi, 2000, NMDA receptor content of synapses in stratum radiatum of the hippocampal CA1 area.: *J Neurosci*, v. 20, p. 2512-22.
- Ramón y Cajal S (1893) Estructura del asta de Ammon y fascia dentata. *Ann Soc Esp Hist Nat* 22.
- Ramón y Cajal S (1911) *Histologie de systeme nerveux de l'Homme et des vertebres tomme II*. Paris: Malonie
- Riou, M., D. Stroebel, J. M. Edwardson, and P. Paoletti, 2012, An alternating GluN1-2-1-2 subunit arrangement in mature NMDA receptors: *PLoS One*, v. 7, p. e35134.
- Rozen, S., and H. Skaletsky, 2000, Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers: *Methods Mol Biol*, v. 132, p. 365-86.
- Röhlich Pál: *Szövettan, Semmelweis Kiadó* 2006.
- Russwurm, M., S. Behrends, C. Harteneck, and D. Koesling, 1998, Functional properties of a naturally occurring isoform of soluble guanylyl cyclase: *Biochem J*, v. 335 (Pt 1), p. 125-30.
- Russwurm, M., and D. Koesling, 2002, Isoforms of NO-sensitive guanylyl cyclase: *Mol Cell Biochem*, v. 230, p. 159-64.
- Russwurm, M., N. Wittau, and D. Koesling, 2001, Guanylyl cyclase/PSD-95 interaction: targeting of the nitric oxide-sensitive alpha2beta1 guanylyl cyclase to synaptic membranes: *J Biol Chem*, v. 276, p. 44647-52.

- Ryan, T. J., R. D. Emes, S. G. Grant, and N. H. Komiyama, 2008, Evolution of NMDA receptor cytoplasmic interaction domains: implications for organisation of synaptic signalling complexes: *BMC Neurosci*, v. 9, p. 6.
- Schelshorn, D. W., A. Schneider, W. Kuschinsky, D. Weber, C. Krüger, T. Dittgen, H. F. Bürgers, F. Sabouri, N. Gassler, A. Bach, and M. H. Maurer, 2009, Expression of hemoglobin in rodent neurons: *J Cereb Blood Flow Metab*, v. 29, p. 585-95.
- Schlossmann, J., and F. Hofmann, 2005, cGMP-dependent protein kinases in drug discovery: *Drug Discov Today*, v. 10, p. 627-34.
- Schnell, S. A., W. A. Staines, and M. W. Wessendorf, 1999, Reduction of lipofuscin-like autofluorescence in fluorescently labeled tissue: *J Histochem Cytochem*, v. 47, p. 719-30.
- Seress, L., H. Abrahám, A. Hajnal, H. Lin, and S. Totterdell, 2005, NOS-positive local circuit neurons are exclusively axo-dendritic cells both in the neo- and archi-cortex of the rat brain: *Brain Res*, v. 1056, p. 183-90.
- Sik, A., M. Penttonen, A. Ylinen, and G. Buzsáki, 1995, Hippocampal CA1 interneurons: an in vivo intracellular labeling study: *J Neurosci*, v. 15, p. 6651-65.
- Sik, A., A. Ylinen, M. Penttonen, and G. Buzsáki, 1994, Inhibitory CA1-CA3-hilar region feedback in the hippocampus: *Science*, v. 265, p. 1722-4.
- Sobolevsky, A. I., M. P. Rosconi, and E. Gouaux, 2009, X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor: *Nature*, v. 462, p. 745-56.
- Somogyi, J., A. Baude, Y. Omori, H. Shimizu, S. El Mestikawy, M. Fukaya, R. Shigemoto, M. Watanabe, and P. Somogyi, 2004, GABAergic basket cells expressing cholecystinin contain vesicular glutamate transporter type 3 (VGLUT3) in their synaptic terminals in hippocampus and isocortex of the rat.: *Eur J Neurosci*, v. 19, p. 552-69.
- Standaert, D. G., G. B. Landwehrmeyer, J. A. Kerner, J. B. Penney, and A. B. Young, 1996, Expression of NMDAR2D glutamate receptor subunit mRNA in neurochemically identified interneurons in the rat neostriatum, neocortex and hippocampus: *Brain Res Mol Brain Res*, v. 42, p. 89-102.

- Stuehr, D., J. Santolini, Z. Wang, C. Wei, and S. Adak, 2004, Update on mechanism and catalytic regulation in the NO synthases.: *J Biol Chem*, v. 279, p. 36167-70.
- Sumita, K., Y. Sato, J. Iida, A. Kawata, M. Hamano, S. Hirabayashi, K. Ohno, E. Peles, and Y. Hata, 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*, v. 100, p. 154-66.
- Swanwick, C., M. Shapiro, Z. Yi, K. Chang, and R. Wenthold, 2009, NMDA receptors interact with flotillin-1 and -2, lipid raft-associated proteins.: *FEBS Lett*, v. 583, p. 1226-30.
- Tabuchi, K., J. Blundell, M. R. Etherton, R. E. Hammer, X. Liu, C. M. Powell, and T. C. Südhof, 2007, A neuroligin-3 mutation implicated in autism increases inhibitory synaptic transmission in mice: *Science*, v. 318, p. 71-6.
- Takahashi, H., and J. Magee, 2009, Pathway interactions and synaptic plasticity in the dendritic tuft regions of CA1 pyramidal neurons.: *Neuron*, v. 62, p. 102-11.
- Tamás, G., A. Lorincz, A. Simon, and J. Szabadics, 2003, Identified sources and targets of slow inhibition in the neocortex: *Science*, v. 299, p. 1902-5.
- Tanaka, J., M. Markerink-van Ittersum, H. Steinbusch, and J. De Vente, 1997, Nitric oxide-mediated cGMP synthesis in oligodendrocytes in the developing rat brain.: *Glia*, v. 19, p. 286-97.
- Tao, H. W., and M. Poo, 2001, Retrograde signaling at central synapses: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 98, p. 11009-15.
- Taqatqeh, F., E. Mergia, A. Neitz, U. Eysel, D. Koesling, and T. Mittmann, 2009, More than a retrograde messenger: nitric oxide needs two cGMP pathways to induce hippocampal long-term potentiation.: *J Neurosci*, v. 29, p. 9344-50.
- Teunissen, C., H. Steinbusch, M. Markerink-van Ittersum, D. Koesling, and J. de Vente, 2001, Presence of soluble and particulate guanylyl cyclase in the same hippocampal astrocytes: *Brain Res*, v. 891, p. 206-12.
- Tochio, H., Y. K. Mok, Q. Zhang, H. M. Kan, D. S. Bredt, and M. Zhang, 2000, Formation of nNOS/PSD-95 PDZ dimer requires a preformed beta-finger structure from the nNOS PDZ domain: *J Mol Biol*, v. 303, p. 359-70.

- Toth, K., G. Soares, J. J. Lawrence, E. Philips-Tansey, and C. J. McBain, 2000, Differential mechanisms of transmission at three types of mossy fiber synapse: *J Neurosci*, v. 20, p. 8279-89.
- Tovar, K., and G. Westbrook, 2002, Mobile NMDA receptors at hippocampal synapses.: *Neuron*, v. 34, p. 255-64.
- Tóth, K., Z. Borhegyi, and T. F. Freund, 1993, Postsynaptic targets of GABAergic hippocampal neurons in the medial septum-diagonal band of Broca complex: *J Neurosci*, v. 13, p. 3712-24.
- Valtschanoff, J. G., and R. J. Weinberg, 2001, Laminar organization of the NMDA receptor complex within the postsynaptic density: *J Neurosci*, v. 21, p. 1211-7.
- Van Staveren, W. C., H. W. Steinbusch, M. Markerink-Van Ittersum, D. R. Repaske, M. F. Goy, J. Kotera, K. Omori, J. A. Beavo, and J. De Vente, 2003, mRNA expression patterns of the cGMP-hydrolyzing phosphodiesterases types 2, 5, and 9 during development of the rat brain: *J Comp Neurol*, v. 467, p. 566-80.
- Vruwink, M., H. H. Schmidt, R. J. Weinberg, and A. Burette, 2001, Substance P and nitric oxide signaling in cerebral cortex: anatomical evidence for reciprocal signaling between two classes of interneurons: *J Comp Neurol*, v. 441, p. 288-301.
- Wang, J., and R. S. Zucker, 2001, Photolysis-induced suppression of inhibition in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons: *J Physiol*, v. 533, p. 757-63.
- Watanabe, M., M. Fukaya, K. Sakimura, T. Manabe, M. Mishina, and Y. Inoue, 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*, v. 10, p. 478-87.
- Watanabe, M., Y. Inoue, K. Sakimura, and M. Mishina, 1993, Distinct distributions of five N-methyl-D-aspartate receptor channel subunit mRNAs in the forebrain.: *J Comp Neurol*, v. 338, p. 377-90.
- Wendland, B., F. E. Schweizer, T. A. Ryan, M. Nakane, F. Murad, R. H. Scheller, and R. W. Tsien, 1994, Existence of nitric oxide synthase in rat hippocampal pyramidal cells: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 91, p. 2151-5.
- Wilson, R. I., and R. A. Nicoll, 2001, Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses: *Nature*, v. 410, p. 588-92.

- Wood, K. C., A. M. Batchelor, K. Bartus, K. L. Harris, G. Garthwaite, J. Vernon, and J. Garthwaite, 2011, Picomolar nitric oxide signals from central neurons recorded using ultrasensitive detector cells: *J Biol Chem*, v. 286, p. 43172-81.
- Xu, J., R. Chen, J. Zhang, and C. Chen, 2010, Endocannabinoids differentially modulate synaptic plasticity in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons.: *PLoS One*, v. 5, p. e10306.
- Yamasaki, M., M. Matsui, and M. Watanabe, 2010, Preferential localization of muscarinic M1 receptor on dendritic shaft and spine of cortical pyramidal cells and its anatomical evidence for volume transmission: *J Neurosci*, v. 30, p. 4408-18.
- Zhang, X. L., Z. Y. Zhou, J. Winterer, W. Müller, and P. K. Stanton, 2006, NMDA-dependent, but not group I metabotropic glutamate receptor-dependent, long-term depression at Schaffer collateral-CA1 synapses is associated with long-term reduction of release from the rapidly recycling presynaptic vesicle pool: *J Neurosci*, v. 26, p. 10270-80.

XI. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Az értekezés témájában megjelent 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

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:

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

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.

XII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni a kitartó támogatást és a segítséget édesanyámnak, nagymamámnak és férjemnek, mert nélkülük nem jöhetett volna létre ez az értekezés.

A tudományos munkával kapcsolatos szemléletbeli és morális nevelést és hasznos tudományos tanácsokat nagyon köszönöm Prof. Freund Tamás laborvezetőnek és Dr. Nyiri Gábor témavezetőmnek. Ezenkívül szeretném megköszönni az Agykéreg kutatócsoport minden tagjának a sok éves segítséget, és hogy emberileg is olyan környezetben dolgozhattam, ami azt gondolom páratlan.