

Molekuláris jelátviteli útvonalak a fejlődő idegsejthálózatok GABAerg és glutamáterg szinapszisaiban

Doktori tézisek

Dr. Cserép Csaba

Semmelweis Egyetem
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Nyiri Gábor tudományos főmunkatárs

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

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Csillag András

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Dobolyi Árpád, Dr. Rác Bence

Budapest, 2013.
MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet

1. BEVEZETÉS

Az agy egyedfejlődése egymást időben követő, egymást meghatározó események sorozata, melyek során egy egyszerű, néhány sejtből álló szövetsomóból kifejlődik a létező legmagasabb szintű és legösszetettebb anyagi struktúra, az emberi észlelés, a tudat, a lélek és a szellem anyagi szubsztrátuma.

Ez a hihetetlenül összetett folyamat egy fajokon átívelő általános sémát követ, melynek során több egymást követő, de időben sokszor átfedő részfeladatot kell megoldania a fejlődő rendszernek. Először létre kell jönnie a megfelelő számú sejtnak, azoknak a sejtváándorlás során el kell jutniuk rendeltetési helyükre, ott ki kell alakítaniuk a feladatuk ellátásához szükséges bonyolult térbeli formájukat, és a szinaptogenezis folyamata során létre kell hozniuk a rájuk jellemző szinaptikus kapcsolatrendszert. Mindezen folyamatok folyamatok alapvető jellemzője az aktivitás-függőség, mely szükségessé teszi egy belső, spontán neuronális aktivitás létét.

A fejlődő idegsejthálózatokban egy adott sejt először GABAerg szinaptikus bemeneteket fog kapni, majd ezt követően jelennek meg rajta a glutamáterg kapcsolatok, melyek először csak NMDA típusú glutamát receptorokat tartalmaznak, az AMPA típusú glutamát receptorok csak később jelennek meg bennük. Felmerül a kérdés, hogy ha egy intenzíven fejlődő hálózatban először gátló szinapszisok alakulnak ki egy sejten, akkor az a sejt hogyan tudja a saját fejlődéséhez, éréséhez elengedhetetlen aktivitást biztosítani? A válasz az, hogy a fejlődés ideje alatt a GABA nem gátló hatást fejt ki, hanem ezzel ellenkezőleg, depolarizálót, és csak később, a hálózat éretté válása során válik hiperpolarizáló, azaz gátló hatásúvá. A „GABA-váltás”-nak nevezett jelenség hátterében az áll, hogy a fejlődés során a sejtek belső klorid koncentrációja elég magas ahhoz, hogy a felnőthöz képest megfordítsa a klorid-ionok elektrokémiai gradiensét. Bár az ionszatorna ugyanúgy működik – aktiváció hatására klorid-ionokat enged át – a megfordult elektrokémiai gradiens miatt a GABA_A-receptorok nyitására a sejtekből kifelé fog a klorid áramlani, ezáltal depolarizációt okozva. A magas belső Cl⁻-koncentráció hátterében az áll, hogy a fejlődés során a sejtek nagy számban rendelkeznek sejt felszíni nátrium-kálium-klorid-kotranszporter 1-gyel (NKCC1, ami kloridot pumpál a sejtbe), melynek szintje az érés során fokozatosan csökken, miközben megjelenik a klorid-kálium-kotranszporter 2-es fehérje (KCC2, mely kloridot pumpál ki a sejtől).

Jól ismert, hogy a GABAerg depolarizáció jelenléte elengedhetetlen a posztnatális fejlődés korai szakaszára jellemző spontán szinkron aktivitás (SSA) kialakulásához. Ez az aktivitásmintázat a GABA-váltással párhuzamosan tűnik el, helyét pedig átveszik a felnőtt agyra jellemző aktivitásminták. Bizonyították, hogy mind a depolarizáló GABAerg szinaptikus transzmisszó, mind pedig a tőle függő SSA alapvető szerepet töltenek be a hálózatok fejlődésében.

Az NMDA-receptorok feszültség- és ligandfüggő ionotrop glutamát receptorok, aktiválásukhoz egyidejű depolarizáció és ligand-kötődés szükséges. Széleskörű vizsgálatok egyértelműen bizonyították, hogy az NMDA-receptorok az agy posztnatális fejlődésében nagyon fontos szerepet játszanak, hiszen gátlásuk,

vagy genetikai inaktiválásuk markánsan károsította a fehérje-átíródást, a dendritikus és axonális morfológia kialakulását, a szinapszisok létrejöttét, és a memóriafunkciókat is. Ezen receptorok aktivációja nagymértékben hozzájárul az SSA fenntartásához is. Felmerül azonban a kérdés: a nagy számú, AMPAR-t tartalmazó glutamáterg szinapszis hiányában mi biztosítja a depolarizációt, mely elengedhetetlen az NMDAR-aktivációhoz és annak minden, fejlődésre kifejett hatásához? A válasz az, hogy a fejlődő hippocampusban a GABAerg depolarizáció képes kilökní a Mg^{2+} -blokkot az NMDA-receptorokból, és aktiválásukon keresztül posztzinaptikus kalciumszint-emelkedést létrehozni. Ez a receptorok közötti szinergista együttműködés nagyon fontos szerepet játszik a hálózat megfelelő kialakulásában, szinaptogenezisben, mégis mindezüig nem volt ismert a fejlődés ezen kritikus szakaszában az NMDA-receptorok pontos sejt felszíni eloszlása.

A fejlődés korai posztnatális szakaszában a depolarizáló GABAerg és az ugyancsak depolarizáló glutamáterg szinaptikus jelátvitel dominál. Szükségszerű tehát, hogy jelen legyen egy hatékony, aktivitást érzékelő, arra mintegy reagáló negatív visszacsatoló rendszer. A retrográd nitrogén-monoxid jelátvitel elvben alkalmas lehet ezen feladat ellátására. Az általában posztzinaptikusan elhelyezkedő neuronális nitrogén-monoxid szintáz (nNOS) kalcium-kalmodulin komplexet kötve aktiválódik, és arginin bontásával NO-t termel. Ez az NO képes a sejtmembránon átdiffundálva a preszinaptikus végkészülékbe jutni, ahol receptorához, a nitrogén-monoxid szenzitív guanilát cikláshoz (NOsGC) kötődve azt cGMP termelésére készíti. A cGMP több, másodlagos jelátviteli útvonalon keresztül befolyásolhatja a terminálisból történő transzmitterfelszabadulást.

Az NO-jelátviteli rendszer fejlődésben betöltött szerepének meghatározására irányuló kísérletek során bebizonyosodott, hogy a posztnatális fejlődési időszakban, akár a szintézis, akár a receptor szintjén történő beavatkozások komoly morfológiai és szinaptikus eltéréseket okoznak különféle agyterületeken. Ezek az eredmények alátámasztják, hogy a retrográd nNOS-NO-NOsGC-cGMP jelátviteli útvonal fontos szerepet játszik a neuronális hálózatok posztnatális fejlődése során, és zavartalan működése feltétele a hálózat megfelelő morfológiai és szinaptikus szerkezetének kialakulásának. Mindezek ellenére nem ismert ezen jelátviteli útvonal molekuláris elemeinek sem sejt-szintű, sem annál nagyobb felbontású pontos elhelyezkedése.

2. CÉLKITŰZÉSEK

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

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

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

2. A fejlődés során megjelenő spontán szinkron aktivitást elsősorban az – ekkor még – depolarizáló GABAerg, és az ugyancsak depolarizáló glutamaterg transzmisszió hozza létre. Bár a GABAerg rendszer képes sőtölésen keresztül valamekkora gátlást is kifejteni, feltehető, hogy a hálózatnak rendelkeznie kell valamiféle hatékony, az aktivitást érzékelő, mintegy arra reagáló, negatív visszacsatolást közvetítő szabályozórendszerre, elküldendő a túlserkentettség állapotát. A retrográd nitrogén-monoxid rendszer ideális lehetne ennek a feladatnak

az ellátására, de ezen rendszer elemeit sejt-szinten illetve annál nagyobb felbontásban még nem írták le a fejlődés során. Ezért a második kísérletsorozat során arra voltunk kíváncsiak, vajon a szinaptikus retrográd nitrogén monoxid jelátvitel szabályozhatja-e a szinapszisok működését illetve a spontán szinkron aktivitást a posztnatális fejlődés során. Ehhez a következő kérdésekre kerestük a választ:

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

3. KÍSÉRLETI MÓDSZEREK

3.1. Etikai állásfoglalás

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

3.2 Vizsgálati időszak kiválasztása

A posztnatális fejlődésnek azt a szakaszát szerettük volna vizsgálni, mely során a GABAerg depolarizáció képes az NMDAR-k aktiválására, azaz mindenképpen a GABA-váltás előtti időablakra volt szükségünk. Ugyancsak fontos kritérium volt, hogy a vizsgált időszak lehetőség szerint essen egybe a spontán szinkron aktivitás maximumával. Az általunk is vizsgált hippocampális piramissejtek esetében egerben a GABA-váltás a posztnatális 12-16. nap között történik meg. A spontán szinkron aktivitás a legerőteljesebben mind a nagyagykéregben, mind pedig a hippocampusban a posztnatális 6-9. napok között volt jelen. Mindezek figyelembevételével a születés utáni 6-9. nap közötti szakaszt találtuk alkalmasnak vizsgálatainkhoz.

3.3. Állatok kezelése, szövetek előkészítése az anatómiai kísérletekhez

Az állatokat általános érzéstelenítés után szíven keresztül perfundáltuk. A fixáló oldat az első kísérletsorozatban az NMDA-receptorok megjelöléséhez felhasznált állatok esetében 4% frissen beoldott paraformaldehidet tartalmazott, kivéve a szinapsziszok méretének meghatározásához használt, beágyazás előtti vGluT1-immunperoxidáz és GAD-immunperoxidáz egyes reakciók esetében, ahol ezt 0.25% glutáraldehiddel egészítettük ki. A második kísérletsorozatban az nNOS megjelöléséhez a fixáló oldat 1% paraformaldehidet tartalmazott, az NOsGC alegységek megjelöléséhez pedig 4% paraformaldehidet. Az eltávolított agyakból koronális metszeteket készítettünk, melyek vastagsága 40-60 μm volt az immunfluoreszcens kísérletekhez, 70-80 μm volt a beágyazás előtti elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz, és 300 μm volt a fagyasztva-dehidrállással egybekötött alacsony-hőmérsékletű beágyazáshoz. Minden beágyazás előtti kísérletben, melyben NMDA-receptorokat jelöltünk, a szövetet pepszines emésztésnek vetettük alá az epitóp feltárásának céljából.

3.4. Fiziológiai szeletek készítése

Túlélő szeletek készítéséhez öt-nyolc napos állatokat használtunk. Az állatokat az engedélyezett leghumánusabb protokollt használva érzéstelenítettük, majd lefejezésük után az agyakat jéghideg vágóoldat alatt eltávolítottuk, és koronális vagy horizontális szeleteket készítettünk. Az elektrofiziológiai és multilineuron kalcium képkalkotási kísérletekhez a 450 μm vastag szeleteket alámerített típusú, kettős-átfolyású kamrákba helyeztük. A cGMP-immunhisztokémiai kísérletekhez a 300 μm vastag szeleteket steril, 12 kamrával ellátott sejt-kultúra-tálcákba helyeztük. Minden kamra 1 mL ACSF-et tartalmazott, melyhez foszfodiestrasz (PDE) gátlókat adtunk. A kamrákat egyenként, egyenlő mértékben buborékoltattuk karbogén gázzal. A megfelelő drogok hozzáadása után tíz percig inkubáltuk a szeleteket, majd a kamrákban levő oldatokat gyorsan jéghideg, 4%-os paraformaldehid oldatra cseréltük. A szeleteket az immunhisztokémiai reakciók megkezdése előtt ugyanebben az oldatban utófixáltuk negyvennyolc órán keresztül, 4 °C-on.

3.5. Elsődleges antitestek

Az első kísérletsorozatban a GABA_Aerg végkészülékek megjelölésére két ellenanyagot használtunk: Millipore, MAB5406, 1G10.2-es klónú antitestet, és az 1440-es számú Oertel GAD65/67 ellenes antitestet. A glutamaterg végkészülékek szelektív megjelöléséhez két, az 1-es típusú vezikuláris glutaminsav transzporter (vGluT1) elleni antitestet használtunk: Millipore, AB5905, és Synaptic Systems, kat. sz.: 135 303, aa 456-560. A szinapszisok megjelöléséhez egy egérben készült monoklonális anti-Bassoon ellenanyagot használtunk: Abcam, SAP7F-es klón. Az NMDA-receptorok jelölését a GluN1, GluN2A és GluN2B alegységek C-terminusa ellen nyúlban termeltetett antitestekkel végeztük. Ezen antitestek specificitását széleskörű vizsgálatokkal igazolták, immunoblottolás, antigén peptidok, teljes génkiütött illetve feltételes génkiütött állatok felhasználásával mind beágyazás előtti, mind pedig beágyazás utáni immunreakciók során. Ezek az ellenanyagokon kívül használtunk egy, az NMDA-receptor sejten kívül elhelyezkedő szakasza elleni egér monoklonális antitestet (Millipore, MAB363, 54.1-es klón). A GABA_A-receptorok megjelölésére egy, a receptor $\beta 3$ alegysége ellen tengerimalacban termeltetett antitestet használtunk, melyet Japánban, Ryuichi Shigemoto laboratóriumában állítottak elő. A másik GABA_A-receptor elleni antitestünk egy nyúlban készült poliklonális ellenanyag volt, melyet a receptor $\gamma 2$ alegysége ellen termeltettek (SynapticSystems, immunizáló szekvencia: aa 39-67, kat. sz.: 224 003).

A második kísérletsorozatban az nNOS megjelöléséhez egy nyúlban készült poliklonális antitestet használtunk (Zymed Laboratories, kat. sz.: 61-7000), mellyel nNOS génkiütött állatból származó agyszöveten semmiféle jelölést nem kaptunk. A GABA_Aerg végkészülékek megjelölésére egy egér monoklonális antitestet használtunk: Millipore, kat. sz.: MAB351. Az NOsGC alegységeinek megjelöléséhez nyúlban termeltetett poliklonális ellenanyagokat használtunk, NOsGC $\alpha 1$ -ellenes (Sigma-Aldrich, kat. sz.: G4280) és NOsGC $\beta 1$ -ellenes antitestet (Cayman Chemical, kat. sz.: 160897). A ciklikus guanozin-monofoszfát (cGMP)

kimutatását juhban termelt cGMP-ellenes antitesttel végeztük, melyet Jan de Vente laboratóriumában állítottak elő.

3.6. Immunfluoreszcens jelölés és konfokális lézer-pásztázó mikroszkópia

A metszeteket mosás és blokkolás után elsődleges antitestek oldataiban inkubáltuk egy éjszakán keresztül, szobahőmérsékleten. Ezután a metszeteket alapos mosásnak vetettük alá, majd másodlagos antitestek oldataival kezeltük. Ezt követően a metszeteket újra mostuk, végül pedig tárgylemezre szedtük ki és lefedtük. Az immunfluoreszcens jel vizsgálatához egy Nikon Eclipse Ti-E inverz mikroszkópot és A1R konfokális rendszert használtunk.

A második kísérlet sorozatban a droggal kezelt túlélő szeletekben történt cGMP-termelés vizsgálatához használtunk immunfluoreszcens jelölést és konfokális lézer pásztázó mikroszkópiát. A fixált szeleteket mostuk, agarba ágyasztuk, majd 50 µm vastagságúra szeleteltük. További mosások után a metszeteket blokkoltuk, majd elsődleges antitestek oldatával inkubáltuk. A metszeteket ezután mostuk, majd másodlagos reagensek oldatával kezeltük. Ezután újabb mosások következtek, végül pedig a metszeteket tárgylemezre szedtük ki és lefedtük. Az immunfluoreszcens jelet ebben az esetben egy Olympus Optical FluoView300 konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal vizsgáltuk.

3.7. Beágyazás előtti immun-elektronmikroszkópia

A glutamáterg és GABAerg szinapszisok méretének meghatározásához immunperoxidáz reakciókat végeztünk el. A minták mosása és blokkolása után elsődleges ellenanyagok oldatával inkubáltuk őket. Ezt mosás követte, majd a metszeteket másodlagos antitestek oldatával kezeltük. Újabb mosások és ABC-oldattal való inkubálás után a reakciót 3,3-diaminobenzidinnel (DAB) jelenítettük meg. További mosások után a metszeteket ozmiummal kezeltük, és dehidráltuk.

A különböző NMDA-receptor alegységek vizsgálatát célzó, kombinált immunarany-immunperoxidáz jelölések során 4% paraformaldehiddel fixált szövetet használtunk, melyet előtte pepszines kezelésnek vetettünk alá. A minták mosása és blokkolása után elsődleges ellenanyagok oldatával inkubáltuk őket. Ezt mosás követte, majd a metszeteket másodlagos antitestek oldatával kezeltük. Újabb mosások és ABC-oldattal való inkubálás után a reakciót 3,3-diaminobenzidinnel (DAB) jelenítettük meg. Az immunarany jelölést ezüstözöldat (SE-EM) segítségével erősítettük fel 40-60 percen keresztül, szobahőmérsékleten. További mosások után a metszeteket ozmiummal kezeltük, és dehidráltuk végül pedig epoxigyantába (Durcupan) ágyasztuk azokat. A polimerizáció után 80-100 nm vastagságú metszeteket készítettünk, majd a metszeteket Veleta CCD kamerával felszerelt Hitachi H-7100-as elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

Az nNOS kimutatására irányuló immunarany illetve kombinált immunarany-immunperoxidáz reakciókhoz 1%-os paraformaldehiddel fixált szövetet használtunk. Ezekben a kísérletekben pepszines feltárást nem végeztünk. A minták mosása és blokkolása után elsődleges ellenanyagok oldatával inkubáltuk

őket. Ezt mosás követte, majd a metszeteket másodlagos antitestek oldatával kezeltük. Ezt követően az immunarany illetve immunperoxidáz jelek előhívása, a minták gyantába ágyazása, és elektronmikroszkópos vizsgálata a fent leírt módon történt.

3.8. Beágyazás utáni immun-elektronmikroszkópia

A szövetminták Lowicryl gyantába való beágyazása során a 4% paraformaldehiddel fixált, 300 μm vastag szeleteket mosás után krioprotektív oldattal kezeltük, ezután folyékony nitrogénnel hűtött, arannyal bevont réztükrőkhöz csaptuk, majd alacsony hőmérsékleten víztelenítettük és Lowicryl HM20-as gyantába ágyasztuk. A beágyazás utáni immunreakciókat 70 nm vastag metszeteken végeztük. A metszeteket blokkolás után az elsődleges antitesteket tartalmazó cseppeken tartottuk. Ezt követően a metszeteket mostuk, majd a másodlagos ellenanyagok cseppjein inkubáltuk. Alapos mosások után a metszeteket desztillált vízben megmártottuk, majd uranil-acetát telített vizes oldatával kontrasztoltuk. A mintákat egy Veleta CCD kamerával szerelt Hitachi H-7100-as elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

3.9. In vitro elektrofiziológia (társ-munkacsoport munkája)

A teljes-sejt elvezetések Zeiss Axioscope segítségével végezték 31-32 °C-on, vizuális irányítás mellett. A karbogénnel kiegyenlített ACSF folyási sebessége a kamrában 2-3 ml volt percenként. A 3-6 M Ω ellenállású patch-elektrodákat intracelluláris oldattal töltötték fel. Egyes kísérletekben a pipettaoldat biocytint is tartalmazott, és az elvezetett sejtek post-hoc immunfluoreszcens vizsgálata igazolta, hogy azok minden esetben piramisisejtek voltak. A posztszinaptikus áramokat (PSC) -70 mV-os tartófeszültség mellett vezették el. A szeletekre folyó ACSF-hez kinurénsavat vagy pikrotoxint adtak, hogy az ionotróp glutamát receptorokat, illetve a GABA_A-receptorokat legátolják. A rostok elektromos ingerlését egy Supertech időzítő és izolátor segítségével végezték el egy ACSF-el töltött théta-üvegpipettával, 0.1 Hz-es frekvenciával. A glutamát receptor-mediálta szinaptikus áramok (GluR-PSC) kiváltásához a hippocampusz CA1 területének radiátum rétegbe, míg a GABA_A receptor-közvetítette szinaptikus áramok (GABA_AR-PSCs) kiváltásához a piramisisejtek rétegébe vezették az ingerlelektrodát. Az ellenállást szorosan ellenőrizték, mely az elvezetések alatt állandó volt ($\pm 20\%$).

3.10. Multineuron kalcium képkalkotás (társ-munkacsoporttal együttműködve)

A méréseket percenkénti 8-10 ml-es átfolyási sebesség mellett, 32-33 °C-on végeztük. A CA1 régió piramisisejtrétegében kisebb területeket feltöltöttünk a sejtekbe hatolni képes kalcium indikátorral (Fura-2 AM). Az aránymértékes képkalkotást 340 és 380 nm-es hullámhosszokon történő váltakozó gerjesztéssel végeztük, 100 ms-os expozíciós idővel. A Ca²⁺ viszonyított változásait a két

gerjesztési hullámhossz (340 és 380 nm) hatására kibocsájtott fluoreszcens fény arányából számoltuk ki. Minden aktív sejtet kézzel jelöltünk ki mint vizsgálandó terület (ROI), majd a szoftver meghatározta minden egyes sejthez tartozó Ca^{2+} -változást az idő függvényében. Az eseményeket akkor tekintettük szinkronnak, amennyiben a kalciumszint egyidejűleg változott az aktív sejtek több mint 90%-ában. A kontrol szakasz felvétele után különböző drogot mostunk a szeletekre, majd 10-12 perc elteltével elvégeztük a második mérést, hogy a drogok szinkron eseményekre kifejtett hatását vizsgálhassuk. Minden szeletben a kontrol felvétel során mért szinkron események számát összevetettük a drog alkalmazása utáni felvételen mért szinkron események számával. Néhány esetben a kalcium-szint optikai mérésével párhuzamosan egyes sejtek aktivitását is elvezettük. Ezekben a mérésekben az egy-sejt aktivitást loose-patch módon ACSF-el töltött patch pipetta segítségével (3-6 M Ω) végeztük. Minden adatot egy Multiclamp 700B erősítő segítségével rögzítettünk, 2 kHz-en szűrtük, 10 kHz-en digitalizáltuk és szoftveresen analizáltuk.

3.11. Drogok

Az L-NAME-t, SNP-t és a 8-Br-cGMP-t desztillált vízben oldottuk fel, az IBMX-et, BAY-73 6691-et és az ODQ-t pedig dimetil-szulfoxidban. A drogokból törzsoldatokat készítettünk, és azokat használat előtt a megfelelő koncentrációra hígítottuk. A drogot a Tocris-tól vagy a Sigma-tól szereztük be.

3.12. Analízis

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

Az első kísérletsorozatban mind a GABAerg, mind pedig a glutamáterg végkészülékeket szelektíven megjelöltük. A második kísérletsorozatban a GABAerg és a glutamáterg szinapszisok elkülönítése a következőképpen történt. GABAergnek tekintettük a GAD65-ellenes immunreaktivitást mutató végkészülékeket, míg ugyanezekben a mintákban azokat a GAD65-elleni immunreaktivitást nem mutató végkészülékeket, melyek egyúttal aszimmetrikus szinapszist hoztak létre, glutamátergnek tekintettük. Minden vizsgált szinapszist a hippocampus CA1-es területének radiátum rétegéből gyűjtöttük. A glutamáterg és GABAerg szinapszisok méretét sorozatmetszetekből elvégzett teljes rekonstrukció segítségével határoztuk meg. A beágyazás előtti reakciókban az NMDA-receptor alegységek, illetve az nNOS immunarany jelölésének elemzéséhez megszámláltuk az aranszemcséket az azonosított GABAerg és glutamáterg szinapszisokban és a szinapszisokon kívüli

membránok mentén. Az immunarany részecskéket membránhoz vagy szinapszishoz tartozónak vettük, amennyiben a membrántól való távolságuk nem haladta meg a 40 nm-t. A beágyazás utáni immunarany reakciók elemzése során a sejthártya mindkét oldalán 40 nm széles sávokat határoztunk meg, és az azokra eső jelet membránhoz tartozónak tekintettük. Méréseink során az ImageJ/Fiji nyílt forráskódú szoftvert használtuk.

4. EREDMÉNYEK

4.1. NMDA-receptorok vizsgálata a posztantális agyban

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

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

A fejlődés során a radiatum rétegben nagy számban vannak jelen mind glutamáterg, mind pedig GABAerg szinapszisok, ezért vizsgálataink során ebből a rétegből végeztük a mintavételezést. Ebben a régióban a dendritek túlnyomó többsége a piramissejtektől származik, így nagy valószínűséggel a vizsgált szinapszisok legnagyobb részének posztszinaptikus célelemei piramissejt-dendritek voltak. A vGluT1 illetve a GAD65/67 jelölés egy nem átfedő, pontszerű mintát adott, így megjelenítve a glutamáterg illetve a GABAerg végkészületek eloszlását. A négyes-jelölések során azt találtuk, hogy a Bassoon pozitív foltok vagy a vGluT1, vagy pedig a GAD65/67 pozitív terminálisokhoz kötődtek, jelölve a kétféle terminális szinapszisait. Több esetben a GluN1-es alegység elleni jel a vGluT1 pozitív (glutamáterg) vagy a GAD65/67 pozitív (GABAerg) végkészületek Bassoon-nal jelölt szinapszisaikhoz kapcsolódott a 6-7 napos állapotokban, mutatva azok NMDA-receptor tartalmát.

Ugyancsak konfokális lézer pásztázó mikroszkópiával vizsgáltuk a GABA_A- és NMDA-receptorok közvetlen kolokalizációját. Először egy hármas-jelölést végeztük el Bassoon, GluN1-es alegység, és a GABA_A-receptor β 3-as alegysége ellen. Több esetben megfigyeltük, hogy a GluN1-es alegység illetve a GABA_AR β 3-as alegység jele átfedett, és Bassoon pozitív foltokhoz kapcsolódott. Másodszor egy kettős-jelölést végeztünk el, mely során a GluN1-es alegység sejten kívüli szakaszát, illetve a GABA_A-receptor γ 2-es alegységét jelöltük meg.

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

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

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

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

Technikai korlátok miatt a beágyazás előtti kísérletek eredményei nem teljes mértékben kvantitatívak, ezért, hogy teljesen pontosan meghatározhassuk az NMDA-receptorok mennyiségét, beágyazás utáni immunarany reakciókat végeztünk el. A módszer alkalmazásával kvantitatív módon összehasonlíthattuk a szinaptikus és extraszinaptikus területek receptortartalmát a 6-7 napos egerben. A hippokampusz CA1 területének radiátum rétegéből véletlenszerűen gyűjtöttünk glutamáterg és GABAerg szinapszisokat. Kimutattuk, hogy NMDA-receptorok mind a glutamáterg, mind pedig a GABAerg szinapszisokban jelen vannak. Méréseink szerint a jelölés sűrűsége 2.46 ± 0.71 aranyzemcse/ μm volt a glutamáterg ($n=32$), 0.81 ± 0.16 aranyzemcse/ μm a GABAerg szinapszisokban ($n=28$), és csak 0.03 ± 0.01 aranyzemcse/ μm extraszinaptikusan (103 μm extraszinaptikus membránszakasz mentén. Hogy meghatározhassuk a kétféle szinapszisban

elhelyezkedő NMDA-receptorok tényleges számának arányát, lemértük a szinapszisok méreteit, és a megfelelő jelsűrűség értékeivel megszoroztuk. A szinapszisméreték megbízható meghatározásához immunperoxidáz egyes-jelöléseket végeztünk el (erősen fixált szöveten) vagy vGluT1 vagy pedig GAD67 ellen, két állapotban. A mintákat Durcupan gyantába ágyztuk, minden szinapszist a radiátum rétegből gyűjtöttünk. A teljesen rekonstruált glutamáterg szinapszisok (n=29) mérete $0.097 \pm 0.013 \mu\text{m}^2$ volt, míg a GABAerg szinapszisoké (n=32) $0.186 \pm 0.026 \mu\text{m}^2$, azaz az utóbbi 1.91-szer nagyobb volt az előbbinél. Ezek az eredmények az ahhoz a váratlan felismeréshez vezettek, miszerint a glutamáterg szinapszisok csak 1.6-szor annyi NMDA-receptort tartalmaznak, mint a GABAerg szinapszisok.

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

4.2. Az NO rendszer vizsgálata a posztnatális agyban

4.2.1. Az nNOS a glutamáterg és a GABAerg szinapszisokban is jelen van posztszinaptikusan a fejlődés során

Mivel a spontán szinkron hálózati aktivitás (SSA) – mely a fejlődő idegsejthálózatok alapvető jellemzője – egérben a születés utáni 6.-9. nap között a legerőteljesebb, kísérleteinkben főleg ezt a fejlődési szakaszt vizsgáltuk. Vad típusú és nNOS génkiütött (KO) állatok hippocampuszaiból készült metszeteken végeztünk el immunarany, immunperoxidáz illetve kombinált immunarany-immunperoxidáz reakciókat nNOS és GAD65 ellen. Az nNOS elleni immunperoxidáz reakcióban a piramis sejtek gyengén jelölődtek, és néhány erősen jelölt interneuront lehetett megfigyelni a CA1 és CA3 területeken. Az nNOS KO állatban nem volt jelölés látható. A vizsgált CA1 és CA3 területeken főként a posztszinaptikus denzitások jelölődtek, kevesebb jel kapcsolódott az extraszinaptikus membránokhoz, és néhány arany szemcse volt megfigyelhető sejten belüli szervecskéken a szinapszisok közelében. A fejlődés során a radiatum rétegben nagy számban vannak jelen mind glutamáterg, mind pedig GABAerg szinapszisok, ezért vizsgálataink során ebből a rétegből végeztük a mintavételezést. Ebben a régióban a dendritek túlnyomó többsége a piramis sejtektől származik, így nagy valószínűséggel a vizsgált szinapszisok legnagyobb részének posztszinaptikus célelemei piramis sejt-dendritek voltak. Az nNOS jelölés membrán menti sűrűsége 1.36 arany szemcse/ μm volt a szinapszisokban (medián, 0.7-1.37 min-max, 3 állat)

és 0.06 arany szemcse/ μm extraszinaptikusan (medián, 0.06-0.07 min-max, 3 állat), míg az nNOS KO állatban nem volt jelölés. A véletlenszerűen gyűjtött és teljesen rekonstruált szinapszisok figyelemreméltó 46%-a jelölődött posztzinaptikusan nNOS ellen a hatnapos állat CA1 radiátum rétegében (medián, 41-50% min-max; n=66 szinapszis 3 állatban). GAD65 elleni immunperoxidáz reakció és morfológiai kritériumok alapján azonosítottunk GABAerg és glutamáterg szinapszisokat, és azt találtuk, hogy a posztzinaptikus nNOS jelölés mindkétféle szinapszisban jelen volt a 4, a 6, a 10 és a 14 napos állatok hippokampuszának CA1 és CA3 területein. Azt találtuk, hogy a GABAerg szinapszisok 40%-a (medián, 27-47% min-max; n=45 szinapszis 3 6 napos állatban) és a glutamáterg szinapszisok 33%-a (medián, 29-40% min-max; n=44 szinapszis 3 6 napos állatban) tartalmazta az nNOS-t posztzinaptikusan.

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

Az NOsGC $\alpha 1$ -es és $\beta 1$ -es alegységek sejteken belüli eloszlásának vizsgálata érdekében egyes- illetve kettős-jelöléseket végeztünk el ezen alegységek és GAD65 ellen. A posztnatális 4. és 14. nap között az $\alpha 1$ -es alegység elleni jelölés hasonló volt a GAD enzim fejlődés alatti eloszlásához, ami arra enged következtetni, hogy az $\alpha 1$ -es alegység elsősorban a GABAerg végkészülékekben van jelen. A piramis sejtekkel ellentétben az interneuronok sejttestjei illetve főleg a radiátum rétegben elhelyezkedő, sűrű rosthálózat erős $\alpha 1$ alegység elleni jelölést mutatott a posztnatális 4. és 10. nap között. A 14. napon a jelölés kicsit gyengébb volt, és a felnőtt állatban leírthoz hasonlított, azaz az interneuronok sejttestjei, illetve az elsősorban a piramis sejtek rétegében elhelyezkedő végkészülékeik mutattak $\alpha 1$ -es alegység elleni jelölést. A felnőtt állatok hippokampuszán elvégzett mRNS in situ hibridizációs, mind pedig immunhisztokémiai kísérleteink igazolták, hogy az $\alpha 1$ - $\beta 1$ alegységösszetételű NO-receptor csak az interneuronokban van jelen, és a fejlődő állatban ugyancsak az interneuronok tartalmaztak $\alpha 1$ -es alegységet, míg a piramis sejtek nem. Azt is megfigyeltük, hogy az $\alpha 1$ -es alegységet tartalmazó végkészülékek soha nem adtak szinapszist dendrittűskékre, vagy túske-szerű képződményekre a fejlődés során. Ezek az adatok arra engednek következtetni, hogy a legtöbb, ha nem az összes $\alpha 1$ -es alegységet tartalmazó végkészülék GABAerg már a fejlődés során is. Ezt megerősítve a kettős-reakciókban gyakran találtunk szinapszist adó végkészülékeket, melyek mind $\alpha 1$ -es alegységre, mind pedig GAD65-re pozitívak voltak a vizsgált CA1 és a CA3 területeken 4-napos, 6-napos, 10- és 14-napos korban. A CA1 területről véletlenszerűen gyűjtött összes szinapszist adó GABAerg végkészülék legalább 54%-a (medián, 53-57% min-max; n = 88 szinapszis 3 6-napos egérben) tartalmazta az $\alpha 1$ -es alegységet. A $\beta 1$ -es alegység elleni jelölés hasonló volt a felnőttben leírthoz. A piramis sejtek gyenge sejtplazma-jelölést, a szövet pedig diffúz, pontszerű jelölést mutatott. Az interneuronok sejttestjei és végkészülékei már a postnatális 4.-6.-naptól kezdve jelölődtek a $\beta 1$ -es alegység ellen. A kettősen jelölt mintákban azt figyeltük meg, hogy GAD65 $\beta 1$ -es alegység elleni immunpozitivitást mutató végkészülékek

szinapszisokat létesítettek a CA1 és CA3 területek radiátum rétegében 4-, 6-, 10- és 14-napos egérben. Ezek az eredmények mutatják, hogy az NOsGC valószínűleg $\alpha 1$ - $\beta 1$ alegységösszetétellel van jelen a GABAerg végkészülékekben már a posztnatális fejlődés során, és ideális helyzetet foglal el az nNOS által posztszinaptikusan képzett retrográd NO-jel fogadására.

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

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

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

Teljes-sejt patch-clamp módszer használatával kiváltott posztszinaptikus áramokat (PSC) vezettek el CA1 piramissejtekből, 5-8-napos egerekből származó szeletkészítményekben. Először az NO-donor (SNP, 200 μ M) farmakológiailag elkülönített GABA_A-receptor mediált posztszinaptikus áramokra (GABA_AR-PSC) kifejtett hatását vizsgálták. A PSC-k kiváltása a piramissejtréteg elektromos ingerlésével történt. Az SNP alkalmazása szignifikánsan, a kontrol érték 67%-ára csökkentette a GABA_AR-PSC-k csúcs-amplitúdóját (kontrol medián amplitúdó: 186.5 pA és interkvartilis tartomány: 149.2-240.8 pA; medián amplitúdó SNP mellett: 125.6 pA és interkvartilis tartomány: 92.8-184.8 pA, n=12 szelet, P=0.00097, Wilcoxon-matched pairs test – WMP-próba. A GABA_AR-PSC-k SNP-vel szemben mutatott érzékenysége nem volt egyforma. Az esetek többségében az SNP az események csúcs-amplitúdóját szignifikánsan, a kontrol 52%-ára

csökkentette (kontrol medián amplitúdó: 231.7 pA és interkvartilis tartomány: 161.6-443.9 pA; medián amplitúdó SNP mellett: 120.3 pA és interkvartilis tartomány: 56.1-329.6 pA, n=7 szelet, P=0.015, WMP-próba). Más esetekben az SNP nem okozott szignifikáns változást a csúcs-amplitúdóban (kontrol medián amplitúdó: 151.3 pA és interkvartilis tartomány: 142.7-180.9 pA; medián amplitúdó SNP mellett: 137.6 pA és interkvartilis tartomány: 126.8-77.2 pA, n=5 szelet, P=0.12, WMP-próba). Ezek után megvizsgálták, hogy az SNP az NOsGC-n keresztül fejt-e ki hatását. A szeleteket az NO-receptor gátlószerével, ODQ-val előkezelték, majd együttesen alkalmaztak ODQ-t és SNP-t. A kontrol időszak után 10 μ M ODQ-t adtak a szeletekhez, mely a GABA_AR-PSC-k csúcs-amplitúdójának enyhe csökkenését idézte elő (kontrol medián amplitúdó: 130.8 pA és interkvartilis tartomány: 92.8-226.2 pA; medián amplitúdó ODQ mellett: 99.5 pA és interkvartilis tartomány: 50.2-171.8 pA, n=9 szelet, P=0.004, WMP-próba). Ezt követően ODQ jelenlétében adtak SNP-t a szeletekhez. Egyetlen eset kivételével az SNP nem tudta csökkenteni az amplitúdót (medián amplitúdó ODQ mellett: 132.3 pA és interkvartilis tartomány: 63.3-194.2 pA; medián amplitúdó SNP és ODQ mellett: 131.8 pA és interkvartilis tartomány: 56.7-181.4 pA, n=8 szelet, P=0.25, WMP-próba). A két kísérletben mért GABA_AR-PSC-k drogok adása előtti kontrol csúcs-amplitúdójának összehasonlítása (SNP-kísérletek [kontrol: 186.5 pA] vagy ODQ+SNP-kísérletek [kontrol: 130.8 pA]) nem mutatott különbséget (P=0.18, Mann-Whitney U-próba), mely arra enged következtetni, hogy a hasonló GABAerg rostkötegeket ingereltek a két kísérletben. Ezen eredmények alátámasztották, hogy az NO az NO-receptor aktiválásán keresztül képes a GABAerg szinaptikus jelátvitel hatékonyságát befolyásolni már a korai posztnatális fejlődés során.

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

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

4.2.6. A nitrogén-monoxid jelátviteli rendszer befolyásolása hatással van a fejlődő hippocampusz szinkron hálózati aktivitására

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

5. KÖVETKEZTETÉSEK

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

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

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

6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Az értekezés témájában megjelent első szerzős közlemények:

NMDA Receptors in GABAergic Synapses during Postnatal Development.

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

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

Nitric oxide signaling modulates synaptic transmission during early postnatal development.

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

Cerebral Cortex, 2011;21:2065-2074

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

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

J Neurosci. 2007 Jul 25;27(30):8101-11.

* Megosztott elsőszereplőség

Az értekezés témájában megjelent nem első szerzős közlemények:

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

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

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

Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – közlemények:

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

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

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

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

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

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