

A 2-AG jelpálya molekuláris anatómiai vizsgálata glutamáterg szinapszisokban

Doktori értekezés

Katona-Urbán Gabriella

Semmelweis Egyetem
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Konzulens: Dr. Freund Tamás, MTA rendes tagja,
kutatóprofesszor

Hivatalos bírálók: Dr. Alpár Alán, MTA doktora,
habilitált egyetemi docens
Dr. Rácz Bence, PhD,
habilitált egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Csillag András, biológiai tudományok
doktora, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Kittel Ágnes, MTA doktora,
tudományos tanácsadó
Dr. Kocsis Katalin, PhD,
egyetemi adjunktus

Budapest
2016

TARTALOMJEGYZÉK

I. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	5
II. BEVEZETÉS	9
1. Az endokannabinoid rendszer megismerésének rövid története	11
2. Az endokannabinoid rendszer molekuláris és anatómiai felépítése	12
2.1 Kannabinoid receptorok a központi idegrendszerben	13
2.2 Az endokannabinoid molekulák és metabolizmusuk	14
2.2.1 A 2-AG szintézise és lebontása	15
2.2.2. Az anandamid szintézise és lebontása	18
3. A szinaptikus endokannabinoid jelpálya működése	19
3.1 A 2-AG-közvetítette endokannabinoid jelátvitel	20
3.1.1 A 2-AG felszabadulást kiváltó élettani hatások	20
3.1.2 A periszinaptikus domén és a 2-AG jelátviteli szerepe a szinaptikus biztosíték modellben	22
3.2. Endokannabinoidok által szabályozott szinaptikus plaszticitás a CB ₁ receptor aktivációján keresztül.....	24
4. A dolgozatomban vizsgált központi idegrendszeri területek rövid bemutatása.....	26
4.1 A hippokampusz.....	27
4.1.1. A hippokampusz általános anatómiai felépítése	27
4.1.2 A hippokampusz főbb sejtípusai és kapcsolatrendszerük	28
5. A ventrális tegmentális área általános anatómiai felépítése és kapcsolatrendszere	33
III. CÉLKITŰZÉSEK.....	35
IV. MÓDSZEREK.....	37
1. Mintaelőkészítés a molekuláris biológiai és az anatómiai kísérletekhez.....	37
2. In situ hibridizáció	38
2.1. Az in situ hibridizációs próbák előállítása	38
2.2 Az in situ hibridizáció	40
3. Immunhisztokémia.....	41
4. In situ hibridizációval kombinált immunhisztokémia	44
5. Elektronmikroszkópia.....	45
6. DGL- α enzim eloszlásának kvantitatív analízise.....	45

V. EREDMÉNYEK	48
1. Az endokannabinoid rendszer vizsgálata a hippocampusz serkentő sejtjeiben.....	48
1.1 A DGL- α enzim expressziója és fehérje szintű eloszlása a hippocampuszban	48
1.2 A DGL- α enzim posztszinaptikusan helyezkedik el a principális sejtek dendrittüskéire érkező serkentő szinapszisokban.....	49
1.3 A DGL- α enzim periszinaptikus elhelyezkedése a principális sejtek dendrittüskéiben levő posztszinaptikus denzitás körül	53
1.4 A CB ₁ receptor preszinaptikus elhelyezkedése a principális sejtekre érkező a glutamáterg axonterminálisokban	55
1.5 A posztszinaptikus DGL- α enzim és a preszinaptikus CB ₁ receptor együttes előfordulása a serkentő szinapszisokban.....	57
2. Az endokannabinoid rendszer vizsgálata a hippocampusz GABAerg sejtjeiben...	58
2.1 A DGL- α enzim eloszlása a hippocampusz gátló interneuronjaiban.....	58
2.2 A DGL- α mRNS expressziója hippocampális parvalbumin-pozitív és szomatosztatin-pozitív GABAerg interneuronokban	61
2.3 A DGL- α enzim periszinaptikusan helyezkedik el az interneuronok afferens serkentő szinapszisaiban	63
3. Az endokannabinoid rendszer vizsgálata a ventral tegmental área (VTA) serkentő és gátló szinapszisaiban.....	65
3.1 A DGL- α enzim mRNS expressziója és fehérje szintű kimutatása a VTA-ben	65
3.2 A DGL- α enzim posztszinaptikusan helyezkedik el a GABAerg és glutamáterg szinapszisok közelében	67
3.3 A dopaminerg és nem-dopaminerg sejtek is expresszálnak DGL- α enzimet ...	71
3.4 A preszinaptikus CB ₁ receptor jelenléte a VTA GABAerg és glutamáterg axonterminálisain	72
3.5 Posztszinaptikus DGL- α és preszinaptikus CB ₁ receptorok kolokalizációja a VTA glutamáterg és GABAerg szinapszisaiban.....	75
VI. MEGBESZÉLÉS	77
1. Az endokannabinoid rendszer felépítése a hippocampusz principális sejtjeire érkező serkentő szinapszisaiban	77
1.1 A 2-AG termelő DGL- α enzim posztszinaptikus elhelyezkedése.....	77
1.2 A posztszinaptikusan elhelyezkedő DGL- α enzim és a mGluR5 receptorok funkcionális kapcsolata és a heteroszínaptikus plaszticitás	78
1.3 A glutamáterg szinapszisokban a CB ₁ receptor preszinaptikus elhelyezkedése	80

2. Az endokannabinoid jelpálya jelenléte a hippocampusz interneuronjaira és principális sejtjeire érkező serkentő szinapszisaiban és endokannabinoid-függő hosszú távú depresszió (E-LTD)	80
2.1 A 2-AG-t szintetizáló DGL- α enzim jelenléte a hippocampális interneuronokban	81
2.2 Endokannabinoid-függő LTD a hippocampusz piramissejtjeiben.....	81
3. Az endokannabinoid rendszer szinaptikus elemeinek jelenléte a ventrális tegmentális área glutamáterg és GABAerg szinapszisaiban	82
3.1 Nagy számú dopaminerg és nem dopaminerg sejt termel DGL- α enzimet a VTA-ban	82
3.2 A dopaminerg és nem-dopaminerg sejtek DGL- α -t tartalmazó szinapszisaiban a CB ₁ receptor preszinaptikus elhelyezkedése.....	83
3.3 Az endokannabinoid rendszernek a drogaddikcióval, valamint a droghasználat agyi jutalmazórendszerével való kapcsolata	83
VII. KÖVETKEZTETÉSEK.....	85
VIII. ÖSSZEFOGLALÁS.....	86
IX. SUMMARY.....	87
X. IRODALOMJEGYZÉK	88
XI. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	105
XII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	106

I. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

2-AG	2-arachidonil-glicerin
5-HT3	hármás típusú 5-hidroxi-triptamin receptor
AA	arachidonsav
ABHD4	α/β -hidroláz 4
ABHD6	α/β -hidroláz 6
AC-PKA	adenilát-cikláz/protein-kináz útvonal
AEA	N-arachidonil-etanolamin (anandamid)
AMPA	2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il)propánsav
basal-RER	receptor-irányított endokannabinoid felszabadulás
BSA	bovine serum albumin
C57BL/6H	egértörzs
C57BL/6J	egértörzs
CA	Ammon-szarv (Cornu Ammonis)
CA1-CA3	Hippokampusz régiói
Ca-assisted RER	kalcium-segített endokannabinoid felszabadulás
CaER	kalcium-irányított endokannabinoid felszabadulás
CB ₁	1-es típusú kannabinoid receptor
CB ₂	2-es típusú kannabinoid receptor
CCK	kolecisztokinin
CD1	egértörzs
cDNS	komplementer dezoxi-ribonukleinsav
COX-2	ciklooxygenáz -2 enzim
D1/D2	1-es/2-es típusú dopamin receptor
DAB	3,3'-diaminobenzidin

DAG	1,2-diacil-glicerin
DEPC	dietil-pirokarbonát
DG	gyrus dentatus (hippokampusz régió)
DGL- α	diacil-glicerin lipáz alfa
DGL- β	diacil-glicerin lipáz béta
DH5 α	baktériumtörzs
EPSC	serkentő posztszinaptikus áram (excitatory postsynaptic current)
FA	zsírsav (fatty acid)
FAAH	zsírsavamid-hidroláz (fatty acid amide hydrolase)
GABA	gamma- amino-vajsav (gamma-amino-butyric acid)
GDE1	glicerofoszfodiészteráz-1
GLU	glutamát
GPR55	55-ös típusú G-fehérje kapcsolt receptor
INT/C42/L26	DGL- α antitestek
I-LTD	gátlás hosszú távú depressziója (long-term depression of inhibition)
IP3	inozitol-1,4,5-triszfoszfát
IPSC	gátló posztszinaptikus áram (inhibitory postsynaptic current)
KO	„knock-out” génkiütött (egér törzs)
LTD	hosszú távú szinaptikus depresszió (long term depression)
lyso-PI	lizo-foszfatidil-inozitol
mAChR	M1/M3 muszkarinikus acetilkolin receptor
MGL	monoacil-glicerin lipáz
mGluR	metabotróp glutamát receptor
mGluR1	1-es típusú metabotróp glutamát receptor
mGluR1a	metabotróp glutamát receptor 1a
mGluR5	5-ös típusú metabotróp glutamát receptor

mRNS	hírvivő (messenger) ribonukleinsav
MSN	medium spiny neuron
NAE	N-acil-etanolamin
NAPE	N-acil-foszfamidil-etanolamin
NAPE-PLD	N-acil-foszfamidil-etanolamin foszfolipáz D
NAT	N-acil-transzferáz
NGS	normál kecske szérum
NMDA	N-metil-D-aszparaginsav
O-LM	oriens-lacunosum-moleculare interneuron
ORF	nyitott leolvasási keret (open reading frame)
PA	foszfatidsav (phosphatidic acid)
PB	foszfát puffer
PC	foszfamidil-kolin
PCR	polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)
PE	foszfamidil-etanolamin
PIP ₂	foszfamidil-inozitol-4,5-biszfoszfát
PLA ₁	foszfamidil-inozitol foszfolipáz A1
PLC β	foszfolipáz C β
PSD	posztzinaptikus denzitás
PSM	periszinaptikus masinéria
PV	parvalbumin
SD	standard deviáció
SOM	szomatosztatin
STD	rövid távú szinaptikus depresszió (short term depression)
TBS	trisz-pufferelt sóoldat
TH	tirozin-hidroxiláz

THC	Δ^9 -tetrahydro-kannabinol
TRPV1	1-es típusú tranziens receptor potenciál vanilloid típusú ioncsatorna
VGCC	feszültség-függő kalcium csatorna
VGLUT3	vezikuláris glutamát transzporter 3-as receptor
VIP	vazoaktív intesztinális polipeptid
VTA	ventrális tegmentális área
WT	vad típusú állat

II. BEVEZETÉS

A kémiai szinapszisok klasszikus anterográd jelátviteli folyamatait és aktivitás-függő plaszticitását a több évtizedes intenzív kutatásoknak köszönhetően már meglehetősen jól ismerjük molekuláris szinten (Granger és Nicoll, 2013; Südhof, 2013; Fritschy és Panzanelli, 2014). Ezzel szemben a kémiai szinapszisok visszacsatolás elvén alapuló szabályozásában szerepet játszó retrográd jelátviteli útvonalokról sokkal kevesbé részletes tudás áll rendelkezésünkre. Habár több olyan jelmolekula is ismert, például egyes gázok (nitrogén-monoxid), peptidek (dinorfin), és aminosav neurotranszmitterek (glutamát, GABA), amelyek a posztszinaptikus sejtek szomatodendritikus régiójában keletkezhetnek és a preszinaptikus idegsejtek axonterminálisain fejthetik ki hatásukat, de ezek a retrográd mediátorok mai tudásunk szerint viszonylag kevés szinapszis- és sejttípusban fordulnak elő, valamint csak meghatározott élettani folyamatokban vesznek részt (Regehr et al., 2009). Ezzel szemben az elmúlt másfél évtizedben kiderült, hogy létezik egy sokkal általánosabb élettani szerepet játszó retrográd jelátviteli útvonal is, az úgynevezett endokannabinoid jelpálya (Kreitzer és Regehr, 2001; Ohno-Shosaku et al., 2001; Wilson és Nicoll, 2001), amely a gerincvelőtől az agykéregig a kémiai szinapszisok túlnyomó többségében alapvető fontosságú szerepet tölt be az anterográd ingerületátvivő anyagok felszabadulásának aktivitás-függő szabályozásában (Castillo et al., 2012; Ohno-Shosaku és Kano, 2014).

Minden biológiai információátviteli rendszernek szüksége van pozitív és negatív visszacsatolási lehetőségekre (erősítőkre és fékekre) amelyekkel az alulműködés vagy a túlműködés ellen védekezni tud (Freeman, 2000; Mitrophanov és Groisman, 2008). A kémiai szinapszisok esetében ez azt jelenti, hogy a posztszinaptikus idegsejt képes kell legyen a preszinaptikus sejt felől érkező jel mértékének szabályozására. Habár speciális esetekben a szinaptikus potenciációban is fontos lehet (Navarette és Araque, 2010; Cui et al., 2015), mai tudásunk szerint a szinaptikus endokannabinoid jelpálya elsődlegesen negatív visszacsatolásként működik és ezzel kulcsszerepet játszik a kémiai szinapszisok rövid távú, hosszú távú vagy tónusos depressziójában (Castillo et al., 2012). Az endokannabinoidok élettani és kórélettani jelentősége is ezen alapszik. Jól ismert például a szinaptikus endokannabinoid jelpálya fontos feladata a negatív emléknymok kitörlésében (Marsicano et al., 2002; Gunduz-Cinar et al., 2016) és ezen keresztül a szorongás és a poszt-traumatikus stresszbetegség féken tartásában (Ruehle et al., 2012;

Papini et al., 2015). Szintén közismert az endokannabinoid jelpálya szerepe a kóros szinaptikus tanulási folyamatokban, amelyek alapjául szolgálnak olyan betegségeknek, mint a krónikus fájdalom és a függőség (Maldonado et al., 2006; Rani Sagar et al., 2012). Végül a szinaptikus depresszió hatékonyságának csökkenése kulcsfontosságú lehet a neuronhálózatok túlzott excitabilitásával jellemezhető idegrendszeri betegségekben, mint például epilepsziában és ischemiában, amelyekben már bizonyított az endokannabinoid rendszer alulműködése (Katona és Freund, 2008).

Ahhoz, hogy egy szinaptikus jelátviteli rendszer működését igazán megérthessük, ismernünk kell az adott jelpálya molekuláris alkotóelemeit és azok pontos előfordulási helyét a szinapszisokban és a neuronhálózatok adott sejttypusaiban. Doktori munkám kezdetén a szinaptikus endokannabinoid jelpálya létezése már ismert volt, de még nem volt világos, hogy pontosan melyik endokannabinoid és mely szintetizáló enzimek vesznek részt benne. Habár a CB₁ kannabinoid receptorok preszinaptikus jelenlétét az idegvégződéseken már 1999-ben sikerült elektronmikroszkóppal igazolni (Katona et al., 1999), de az endokannabinoid-szintetizáló enzimek pontos szinaptikus eloszlása még nem volt feltárva. Ezért az is kérdéses volt, hogy a szinaptikus endokannabinoid jelmolekulák vajon közvetlen retrográd úton vagy inkább közvetett preszinaptikus autokrin folyamat elemeként vesznek-e részt az ingerületátvivő anyagok felszabadulásának szabályozásában. Figyelembe véve az endokannabinoid rendszer kulcsszerepét a szinaptikus plaszticitás számos formájában, ezt az alapkérdést először a hippokampusz területén kíséreltük megválaszolni, amely a sejtszintű tanulási, illetve szinaptikus plaszticitási folyamatok egyik leggyakrabban vizsgált modellterülete. Kísérleti munkánk során először a hippokampális principális sejteket összekötő serkentő szinapszisokat tanulmányoztuk, majd a kapott eredményeket kiterjesztettük a GABAerg interneuronokra érkező serkentő szinapszisokra is, mivel kiderült, hogy a korábbi nézettel (McBain et al., 1999) ellentétben ezekben a szinapszisokban is tapasztalható a hosszú távú szinaptikus plaszticitás számos formája (Kullmann és Lamsa, 2007). Végül megvizsgáltunk egy második agyterületet, a középagyi ventrális tegmentális áréát is, amely az agyi jutalmazórendszerben és a függőségekben az egyik legfontosabb szerepet betöltő régió, hogy felderítsük vajon mennyire tekinthetőek általánosnak a szinaptikus endokannabinoid jelpálya szerveződési alapelvei.

1. Az endokannabinoid rendszer megismerésének rövid története

A kendert (*Cannabis sativa*) már az ókorban gyógynövényként használták, írásos bizonyítékok alapján a kínai gyógyítók körülbelül 4500 évvel ezelőtt ismerték és használták például fájdalomcsillapításra (Mechoulam, 1986). A hatásmechanizmusának megértéséhez szükséges első mérföldkövet a modern orvostudomány számára a kender pszichoaktív hatásáért nagyrészt felelős Δ^9 -tetrahydro-kannabinol (THC, Gaoni és Mechoulam, 1964) felfedezése jelentette. A következő mérföldkő jóval később annak a receptornak molekuláris azonosítása volt, amely szervezetünkben elsődleges közvetítője a THC hatásának (Devane et al., 1988; Matsuda et al., 1990). Ezt a G-fehérje kapcsolt receptorok családjába tartozó fehérjét egyes típusú kannabinoid receptornak nevezték el (CB₁ kannabinoid receptor, Matsuda et al., 1990), kicsivel később egy közvetlen rokonát, a CB₂ kannabinoid receptort is sikerült megklónozni (Munro et al., 1993). Ekkor merült fel az a fontos kérdés, hogy ha a szervezetünkben megtalálhatóak a kannabinoid receptorok, akkor vajon milyen molekulák lehetnek az endogén ligandjaik? Ezért az endokannabinoidok kutatásában a harmadik jelentős tudományos mérföldkövet az elsőként felfedezett endogén kannabinoid molekula, az anandamid felfedezése jelenti (N-arachidonil-etanolamin, Devane et al., 1992). Kicsivel később egy második endokannabinoidot, a 2-arachidonil-glicerint (2-AG) is sikerült azonosítani (Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1995; Stella et al., 1997). A 2-AG a központi idegrendszerben az anandamidnál egy nagyságrenddel nagyobb mennyiségben fordul elő (nmol/g, illetve pmol/g szöveti koncentrációban) (Stella et al., 1997), és farmakológiai szempontból mindkét kannabinoid receptoron teljes agonistaként viselkedik, miközben az anandamid parciális agonista (Gonsiorek et al., 2000). Ezzel párhuzamosan a 2-AG metabolizmusáról manapság már sokkal többet tudunk, miközben még mindig nem teljesen tisztázott részleteiben, hogy hogyan szintetizálják az idegsejtek az anandamidot, milyen fiziológiai folyamatok hatására keletkezik és mi a pontos hatásmechanizmusa (Piomelli, 2013). A következő mérföldkövet azoknak az enzimeknek, elsősorban szerin-hidrolázoknak a felfedezése jelentette, amelyek ezeknek a sejtmembránok hosszú szénláncú zsírsav alkotóiból keletkező lipidmolekuláknak a metabolizmusáért felelnek (Cravatt et al., 1996, Dinh et al., 2002; Bisogno et al., 2003; Okamoto et al., 2004; Simon and Cravatt, 2006 és 2008; részletesen lásd később). Ezek a mérföldkövek együtt

kulcsfontosságúnak bizonyultak az endokannabinoid jelpálya élettani és kórélettani jelentőségének feltárásához (összefoglalásként lásd Mechoulam et al., 2014).

2. Az endokannabinoid rendszer molekuláris és anatómiai felépítése

Az endokannabinoid rendszer működésében résztvevő legfontosabb molekuláris alkotóelemeket legalább három nagyobb csoportba lehet sorolni:

1. Kannabinoid receptorok: Elsősorban a G-protein kapcsolt receptorok családjába tartozó két klasszikus receptorfehérje, a CB₁, illetve a CB₂ kannabinoid receptor tartozik ide. Újabb eredmények alapján léteznek azonban más olyan receptorok is, amelyek kapcsolatba hozhatóak logikailag az endokannabinoid rendszerrel, mert a THC vagy az endokannabinoidok molekuláris célpontjaiként szolgálhatnak.

2. Endokannabinoidok: A legalaposabban vizsgált molekulák a 2-AG és az anandamid. Az elmúlt években azonban más lipidek és peptidek is felmerültek, mint potenciális endogén ligandjai vagy allosztérikus modulátorai a két kannabinoid receptornak.

3. Metabolikus enzimek: Biokémiai kísérletek alapján számos enzim ismert, amelyek potenciálisan részt vehetnek a 2-AG és az anandamid szintézisében és lebontásában. Némelyik enzim esetében bizonyított, hogy fontos alkotóeleme a szinaptikus endokannabinoid jelpályának, mások esetében még hiányzik a kísérleti bizonyíték és elképzelhető, hogy inkább más, a szinapszisoktól független élettani folyamat fontos résztvevői lehetnek.

A fenti három csoporton kívül, amelyeket a Bevezetésben részletesen is bemutatok (lásd alább) valószínűleg fontos alkotóelemei az endokannabinoid rendszernek az intracelluláris és intercelluláris transzporterek. Mivel az anandamid és a 2-AG alapvetően hidrofób molekulák, például a lipofilitásukat jelző logP értékük az anandamid esetében 5,1; a 2-AG esetében 5,39 (Maccarrone, 2008), ezért valószínű, hogy speciális karriermechanizmusok is szükségesek sejten belüli és sejtközötti mozgásukhoz. Habár az elmúlt években több lehetséges transzportmechanizmus is előtérbe került, de az ígéretes kísérleti eredmények ellenére még nincsen konszenzus az endokannabinoid rendszer kutatói között, hogy a szinaptikus endokannabinoid jelpályában milyen mechanizmusok lehetnek fontosak (Nicolussi és Gertsch, 2015). A legizgalmasabbak

lehetőségek közé tartozik az intercelluláris transzport megvalósításában az exoszómák feltételezett szerepe (Gabrielli et al., 2015), az intracelluláris folyamatokban pedig az FABP5 és FABP7 fehérjék, valamint a FAAH enzim egy rövid izoformája a FLAT lehetnek fontos szereplők (Kaczocha et al., 2009; Fu et al., 2011).

2.1 Kannabinoid receptorok a központi idegrendszerben

Szelektív receptor antagonistákat és genetikailag módosított állatmodelleket használó preklinikai és klinikai kísérletek eredményeire alapozva ma már általánosan elfogadott tény, hogy a fitokannabinoid THC pszichoaktív hatásának és az endokannabinoidok fiziológiai hatásainak közvetítésében a központi idegrendszerben a CB₁ kannabinoid receptor játssza a legfontosabb szerepet rágcsálókban és emberben egyaránt (Ledent et al., 1999; Zimmer et al., 1999; Huestis et al., 2001; Monory et al., 2007, Kano et al., 2009). A CB₁ receptor fehérje szekvenciája nagyon konzervatív, emlősfajok receptorai között például 97-99%-os azonosság áll fenn az aminosav sorrend alapján. Mai tudásunk szerint ez a receptor fordul elő a legnagyobb mennyiségben a központi idegrendszerben, sűrűsége vetekszik az anterográd szinaptikus transzmisszióban kulcsszerepet játszó ionotróp glutamát és GABA receptorokkal (Herkenham et al., 1990). Ez a tény összhangban áll azzal, hogy ez az általában preszinaptikusan lokalizált receptor a retrográd szinaptikus jelátviteli folyamatok alapvető molekuláris szereplője. A CB₁ receptorok a hét transzmembrán domént tartalmazó G-fehérje kapcsolt receptorok rodopszin-típusú A13-as alcsaládjába tartoznak. Elsősorban G_{i/o}-kapcsoltak, effektoraik az idegvégződéseken nagyrészt a feszültségfüggő kalcium csatornák, mint például a Cav2.2 N-típusú kalcium csatorna (Wilson et al., 2001; Szabó et al., 2014), amely általában a rövid távú szinaptikus depresszióban fontos, de a CB₁ tartós aktivációja az adenilát-cikláz gátlását is eredményezheti és ezzel a preszinaptikus cAMP szint csökkenéséhez vezet, ami pedig a hosszú távú szinaptikus depresszióban alapvető jelentőségű (Chevalleyre et al., 2007). Fontos megjegyezni, hogy legújabb eredmények alapján a neuronok szomatodendritikus régiójában is található kis mennyiségben CB₁ receptor, ahol élettani feladata a sejtek excitabilitásának szabályozása a HCN1 ioncsatornákon keresztül (Maroso et al., 2016).

A CB₁ receptorral 44%-os homológiát mutató CB₂ receptort szokták az immunrendszer kannabinoid receptorának nevezni és legnagyobb mennyiségben a lépben

fordul elő (Munro et al., 1993). Fő élettani szerepe, hogy gátolja az immunsejtek több típusának a vándorlását (összefoglalásként lásd Cabral et al., 2015). A központi idegrendszerben csak nagyon kis mennyiségben van jelen, de legújabb eredmények szerint például a nátrium-bikarbonát kotranszporter aktiválásával a hippokampális piramissejtek hosszú távú hiperpolarizációját szabályozhatja (Stempel et al., 2016).

A klasszikus kannabinoid receptorokon kívül több más olyan receptor is van, amelyeket egyes irodalmi adatok szerint a fitokannabinoidok vagy az endokannabinoidok képesek aktiválni. Ezek közül kiemelkedik a TRPV1 (1-es típusú tranziens receptor potenciál vanilloid típusú ioncsatorna), amelynek mind az anandamid, mind a 2-AG lehetséges endogén ligandja (Zygmunt et al., 1999, 2013). Érdekes módon a CB₁ receptorral ellentétben a TRPV1 elsősorban posztzinaptikusan fordul elő a központi idegrendszer szinapszisaiban (Lee et al., 2015; Puente et al., 2015), ahol intracelluláris aktiválása anandamiddal szerepet játszik a glutamáterg és GABAerg szinapszisok hosszú távú szinaptikus depressziójában, valamint a tónusos retrográd 2-AG jelpálya szabályozásában (Chavez et al., 2010; 2014; Grueter et al., 2010; Lee et al., 2015). Az endokannabinoidok molekuláris célpontjai potenciálisan lehetnek még más ligandvezérelt ioncsatornák, mint például az 5-HT₃ (három típusú 5-hidroxi-triptamin) receptorok, a glicinerg receptorok és a nikotinos acetilkolin receptorok, feszültség-függő ioncsatornák, mint például a T-típusú kalcium csatorna, és további metabotróp G-fehérje kapcsolt receptorok, mint például a GPR55, azonban endokannabinoid-mediálta szerepük a szinaptikus jelátviteli folyamatokban még nem tisztázott (összefoglalásként lásd Pertwee et al., 2010).

2.2 Az endokannabinoid molekulák és metabolizmusuk

Mindkét klasszikus endokannabinoid molekula, az anandamid és a 2-AG is lipidszármazék, egész pontosan egy esszenciális zsírsavnak, az arachidonsavnak a glicerinnel képzett észtere (2-AG), illetve az etanolaminnal képzett amidja (anandamid). Mindkét endokannabinoid az idegsejtek sejtmembránjában található prekursor foszfolipidekből keletkezik több enzimatis lépésben (lásd alább részleteiben). Az utóbbi időben más molekulákat is azonosítottak, amelyek kötődhetnek a kannabinoid receptorokhoz, illetve az endokannabinoidokkal kémiai rokon vegyületek (Fezza et al., 2014). Közülük jelentőségében kiemelkedik a szteroid hormonok korábban inertnek

gondolt általános előanyaga a pregnenolon, amely CB₁ receptor antagonistaként viselkedik (Vallee et al., 2014), valamint a lipoxin A₄, egy gyulladáscsökkentő hatású lipid, amelyről nemrég kiderült, hogy pozitív allosztérikus modulátora a CB₁ receptoroknak (Pamplona et al., 2012). A jövőben érdekes kutatási témát jelenthetnek a peptidkannabinoidok is, amelyek közül a hemoglobin hasítási termékéről a hemopresszínről feltételezik, hogy endogén negatív allosztérikus CB₁ modulátor lehet (Bauer et al., 2012).

2.2.1 A 2-AG szintézise és lebontása

A 2-AG, mint kannabinoid receptor ligand lehetséges szintézis-útvonalait először 1997-ben írták le (Stella et al., 1997, Bisogno et al., 1997). Habár többféle útvonalon is keletkezhet, kiindulási anyagai mindig a sejtmembránt alkotó foszfolipidek (Sugiura et al., 2006). Egyes feltételezések szerint elképzelhető, hogy létezhetnek 2-AG raktárak a szinapszisok plazmamembránjában. A napjainkban legelfogadottabb nézet szerint azonban a 2-AG nem raktározódik, mint például hagyományos módon az anterográd hírvivő molekulák a szinaptikus vezikulákban, hanem aktivitás-függően, úgynevezett „on-demand” módon keletkezik. Ez azt jelenti, hogy egy specifikus élettani jel szükséges a szintézisben részt vevő biokémiai kaszkád elindítására, amely a 2-AG szintéziséhez és felszabadulásához vezet (Alger és Kim, 2011; Hashimoto et al., 2013).

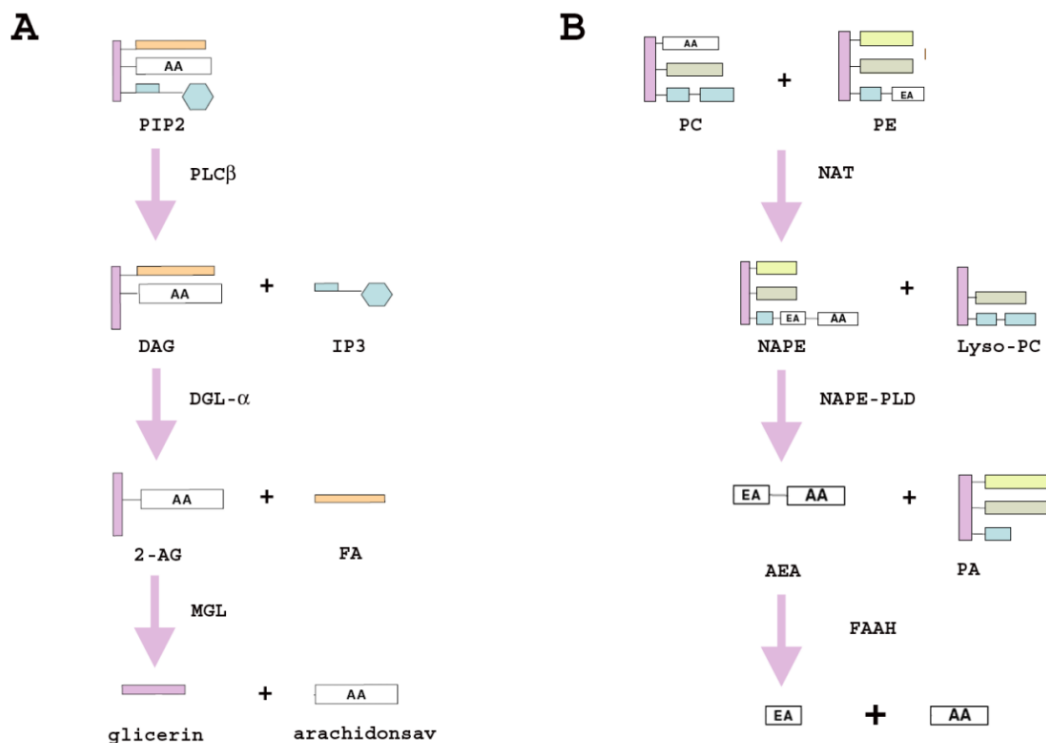
A legfontosabb szintézis-útvonalat a következőkben ismertetem (**1A. ábra**). Egy adott specifikus élettani szignált követően (részletesen lásd később) a 2-AG szintézisének első lépése a membránalkotó foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát (PIP₂) bontása a foszfolipáz C β (PLC β) enzim által (Stella et al., 1997; Hashimoto et al., 2005). A reakció termékeként 1,2-diacil-glicerin (DAG) és inozitol-1,4,5-triszfoszfát (IP₃) keletkezik a PIP₂-t alkotó glicerinváz sn-3 pozíciójában levő kötés hidrolizálásával. A 2-AG az így előállított, a szervezetben fontos másodlagos hírvivőként is szerepet játszó DAG-ból keletkezik a glicerinváz sn-1 pozíciójában levő zsírsav lehasításával, amelyet az sn-1-specifikus diacil-glicerin lipáz (DGL) enzim végez (Stella et al., 1997; Bisogno et al., 2003). Az sn-1-specifikus diacil glicerin lipáznak két izoformáját írták le, a DGL- α -át és a DGL- β -át. (Bisogno et al., 2003). A DGL- α enzim kódoló szekvenciája hosszabb és 1042 aminosavból áll, mely a DGL- β esetében pedig rövidebb és csupán 672 aminosav alkotja. Filogenetikailag közeli rokonok, mindkét enzim a szerin-hidrolázok csoportjába

tartozik, aminosav sorrendjük 33%-ban megegyezik (Bisogno et al., 2003). Mindkét enzim membránokban lokalizált, ami a négy transzmembrán régiójuknak köszönhető. Működésükhöz Ca^{2+} -ion és glutation szükséges (Bisogno et al., 2003). Bár mindkét izoforma jelen van a központi idegrendszerben, de a DGL- α és DGL- β génkiütött (KO) egerekkel végzett kísérletek feltárták, hogy a 2-AG szintéziséért az agyban elsősorban az α izoforma felelős (Gao et al., 2010; Tanimura et al. 2010, Yoshino et al., 2011). Ugyanakkor a DGL- β fontos szerepet játszik a 2-AG szintézisében más szövetekben, például a gyulladási folyamatokat szabályozza a peritoneális makrofágokban (Hsu et al., 2012).

Ismertek DAG független szintézis-útvonalak is. Az egyik ilyen alternatív útvonalban a foszfolipáz A1 (PLA₁) segítségével foszfatidil-inozitolból lizo-foszfatidil-inozitol (lyso-PI) keletkezik, amelyet a foszfolipáz C bont tovább 2-AG endokannabinoiddá (Tsutsumi et al., 1994). Ennek a homogenizált biokémiai preparátumokban leírt útvonalnak a jelentősége élő sejtekben és rendszerekben még nem tisztázott. A 2-AG ezen kívül sejtvonalakon elvégzett *in vitro* kísérletek alapján bizonyos sejttípusokban akár foszfatidsav enzimatisz hidrolízisével is keletkezhet (Bisogno et al., 1999), habár a lehetséges *in vivo* szerepe ennek az útvonalnak szintén nem ismert még. Végül fontos megjegyezni azt is, hogy elképzelhető, hogy a DGL- α és DGL- β enzimek szerepe a sejtekben nemcsak a 2-AG szintézise. Fontos jelentősége lehet annak is, hogy ezek az enzimek prekuzorként DAG-ot használnak, amely számos intracelluláris jelátviteli útvonalnak alapvető másodlagos hírvivő molekulája. A DGL- α és DGL- β ezért alkalmas lehet a DAG inaktiválásával ezeknek az útvonalaknak a leállításában (Leung et al., 2008; Katona és Freund, 2012).

A 2-AG jelpálya terminálása szintén többféle módon történhet. A 2-AG átalakulhat a glicerinváz acilálódásával vagy foszforilálódásával, illetve az arachidonsav rész oxidációjával is. Például ismert, hogy a COX-2 (ciklooxygenáz-2) enzim oxigenálhatja a 2-AG-t (Kozak et al., 2000) és ennek az inaktivációs mechanizmusnak fontos szinaptikus szerepe és jelentősége van (összefoglalásként lásd Hermanson et al., 2014). Leggyakrabban azonban a hidrolízisnek lehet szerepe, amely során a 2-AG arachidonsavra és glicerinre bomlik (**1A. ábra**). A hidrolízisben szerepet játszó enzimek lehetnek a MGL (monoacil-glicerin lipáz), ABHD6/ABHD12 (6-os illetve 12-es típusú

α/β hidroláz fehérjék) illetve a FAAH (zsírsav-amid hidroláz) (Blankman et al. 2007; Murataeva et al. 2013).



- 1. ábra:** A 2-AG (A) és az anandamid (B) szintézisének és lebontásának főbb útvonalai. (A) A 2-AG szintézise két egymást követő enzimatikus lépésből áll. A PLC β (foszfolipáz C β) enzim a membránalkotó foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát (PIP₂) bontásából állítja elő az 1,2-diacil-glicerint (DAG) és további termékként inozitol-1,4,5-triszfoszfát (IP₃) is keletkezik. A DAG-ot egy diacil-glicerin lipáz enzim (pl. DGL- α) alakítja át 2-arachidonil-glicerinné (2-AG) és zsírsavvá (FA). A 2-AG lebontását a monoacil-glicerin-lipáz (MGL) végzi, a reakciótermék a glicerin és az arachidonsav. (B) Az anandamid szintézisének első lépésében a foszfatidil-etanolamin (PE) lipidre a foszfatidil-kolin (PC) arachidonsavcsoportja kerül az N-acil-transzferáz (NAT) enzim segítségével. A folyamat során keletkezik az N-acil-etanolamin (NAPE) és a lizo-foszfatidil-kolin (Lyso-PC). Ezután az N-acil-foszfatidil-etanolamin foszfolipáz D (NAPE-PLD) enzim hasítja el a NAPE-t anandamiddá (AEA) és foszfátidsavvá (PA). Az anandamid bontását a zsírsavamid-hidroláz végzi és végtermékként etanolamin (EA) és arachidonsav (AA) keletkezik.

Az *in vivo* proteomikai kísérletek arra utalnak, hogy a fent említett emzimek közül az MGL a legfontosabb és az agyban található 2-AG körülbelül 85%-ának hidrolizisét ez az enzim végzi (Blankman et al. 2007). Az MGL szintén a szerin-hidrolázok családjába tartozik és szubsztrátként a kettős kötésekkkel is rendelkező monoacil-glicerineket preferálja. Az MGL fehérje 303 aminosavból áll és mind a rágcsálók, mind az ember idegrendszerében elsősorban preszinaptikusan található (Gulyás et al., 2004; Ludányi et al., 2011), ami ideális lokalizáció egy retrográd szinaptikus jelpálya lezárásához.

Érdekes, hogy az MGL nemcsak a CB₁ receptort tartalmazó idegvégződésekben fordul elő, hanem például a gyrus dentatusban asztrocitákban is megfigyelték, ahol szerepe lehet a szinapsziszból kicsorgó 2-AG nem-specifikus heteroszínaptikus hatásának kontrollálásában (Uchigasima et al., 2011).

2.2.2. Az anandamid szintézise és lebontása

Az anandamid (pontos kémiai nevén N-arachidonil-etanolamin) az endogén kannabinoidok közül elsőként felfedezett molekula (Devane et al., 1992). Szerkezete alapján a N-acil-etanolaminok (NAE) közé tartozik és az acilcsoportja egy arachidonsav.

A NAE lipidek és így az anandamid szintézise is a 2-AG-hoz hasonlóan egy membránalkotó foszfolipidból indul ki (**1B. ábra**). Jelen esetben ez a membránalkotó az N-acil-foszfátidil-etanolamin (NAPE). A NAPE-kat egy máig nem azonosított, Ca²⁺-függő (NAT) vagy Ca²⁺-független (iNAT) N-acil-transzferáz enzim hozza létre, az agyban inkább a Ca²⁺-függő forma fordul elő (Tsuboi et al., 2013). A NAPE lipideket a NAT enzimek általában a sejtmembránokban nagy mennyiségben előforduló foszfatidilkolinból az sn-1-es pozícióban található zsírsav-észter acil-csoportjának foszfatidil-etanolaminok amino-csoportjára történő áthelyezésével hozzák létre (Fezza et al. 2014). Az ezt követő szintézisutak meglehetősen szerteágazóak lehetnek (összefoglalásként lásd Liu et al., 2008). Jelen fejezetben csak a legfontosabbat ismertetem röviden a szinaptikus jelentősége miatt (Nyilas et al., 2008).

A keletkezett NAPE-molekulákat az N-acil-etanolamin foszfolipáz D enzim (NAPE-PLD) (Okamoto et al. 2004) bontja tovább foszfatidsavra és N-acil-etanolaminokra (NAE). A NAE-k az adott acil-csoportban különböznek egymástól. Az anandamidban (AEA) ez az acilcsoport az arachidonsav. A NAPE-PLD enzim az emlősöket tekintve nagyon konzervatív fehérje. Az egérben 396 aminosavból áll és szekvenciája 89-90%-ban megegyezik az emberben található NAPE-PLD fehérje aminosav sorrendjével (Okamoto et al., 2004). Működési mechanizmusát tekintve a NAPE-PLD enzim a metallohidroláz szupercsalád béta-laktamáz domént tartalmazó alcsaládjának a tagja. Működése cink és kalcium ion-függő. Kollégáimmal együtt 2008-ban kimutattuk (Nyilas et al., 2008), hogy a NAPE-PLD legnagyobb mennyiségben a gyrus dentatus szemcsesejtjeiben expresszálódik a központi idegrendszerben, de jelen van

alacsonyabb szinten például a CA3 piramiseltjeiben is. Elektronmikroszkópos vizsgálatokkal pedig bizonyítottuk, hogy a NAPE-PLD a serkentő idegvégződésben található intracelluláris membránciszternákhoz asszociáltan fordul elő (Nyilas et al., 2008). Ez arra utal, hogy a NAPE-PLD enzim részt vehet a szinaptikus transzmisszió szabályozásában, ugyanakkor a preszinaptikus előfordulása alapján nem várható, hogy a retrográd szinaptikus endokannabinoid jelpálya kiindulási enzime legyen. Azonban ezek az eredmények még nem zárják ki, hogy az anandamid részt vehet a retrográd szinaptikus jelátviteli folyamatokban, főleg mivel kiderült, hogy a NAPE-PLD génkiütött állatokban nem változik az anandamid szintje alapállapotban (Leung et al., 2006). Ez utóbbi váratlan megfigyelés arra utal, hogy alternatív anandamid szintézis-útvonalaknak is léteznek az agyban (Di Marzo, 2011). Ilyen lehet például az a szintézis-útvonal amelyben az α , β -hidroláz-4 (ABHD4) és glicerofoszfodiészteráz-1 (GDE1) enzimek több lépcsőben katalizálják a NAPE átalakulását NAE lipidekké (Simon és Cravatt, 2006; 2008).

Végül az anandamid valószínűleg legfontosabb lebontó enzime az idegrendszerben a zsírsavamid-hidroláz enzim (FAAH), amely a NAE-kat etanolaminra és megfelelő zsírsavszármazéokra hidrolizálja (Cravatt et al. 1996). Anatómiai megfigyelések szerint a FAAH hiányzik az idegvégződésekből és kizárólag szomatodendritikusan fordul elő (Gulyás et al., 2004).

3. A szinaptikus endokannabinoid jelpálya működése

Amikor a doktori munkámban bemutatott kutatásokat elkezdtük még nem volt ismert, hogy melyik endokannabinoid molekula játssza a főszerepet a szinaptikus endokannabinoid jelpályában, mint hírvivő anyag és az is részben ismeretlen volt, hogy milyen enzimek szabályozhatják a szinaptikus endokannabinoidok szintjét. Azóta a szakterület fejlődése elvezetett egy általánosan elfogadott működési modellhez, amely részben integrálja az Eredmények fejezetben bemutatott kísérleti megfigyeléseinket is. Ezért a következő bekezdésekben a kronológiai sorrendet némiképpen megtörve ezt a modellt fogom bemutatni, hogy az olvasó számára minél naprakészebb legyen a dolgozat és minél jobban tükrözze mai tudásunkat.

Az elmúlt tíz év kutatási eredményei egyértelműen arra utalnak, hogy az ismert endokannabinoid molekulák közül a 2-AG viselkedik „klasszikus” szinaptikus endokannabinoidként. Farmakológiai, valamint genetikai bizonyítékok alapján a CB₁

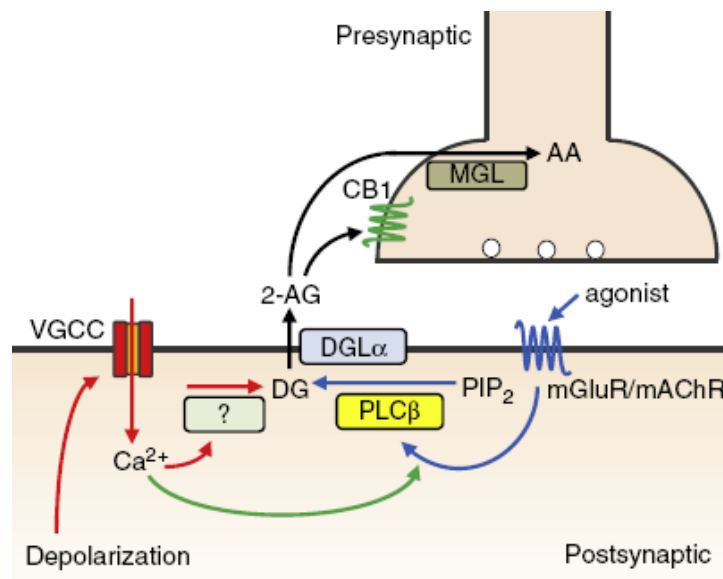
kannabinoid receptor-mediálta retrográd endokannabinoid hatásért is nagy valószínűséggel ez a molekula felelős (Ohno-Shosaku és Kano, 2014). A szinaptikus hírvivő szerepére az is alkalmassá teszi, hogy a CB₁ kannabinoid receptor elsődleges ligandja, amely a receptor aktivációja során teljes agonistaként viselkedik. Az egyik szintetizáló enzime, a DGL- α posztszinaptikusan fordul elő (lásd később az Eredmények fejezetben), molekuláris célpontja a CB₁ receptor, valamint lebontó enzime az MGL pedig preszinaptikusan az axonterminálisokon található (Katona et al., 1999; Dinh et al., 2002; Gulyás et al., 2004). Ez a szinaptikus molekuláris anatómiai szerveződés is összhangban van a 2-AG, mint retrográd szinaptikus jelmolekula modelljével. Farmakológiai eszközök, például specifikus enziminhibitorok segítségével kiderült, hogy a posztszinaptikus 2-AG szintetizáló DGL enzimek gátlása megszünteti az endokannabinoid-mediálta rövid távú és a hosszú távú szinaptikus depressziót (Edwards et al., 2006; Hashimoto et al., 2013). Ezzel összhangban a preszinaptikus 2-AG lebontó MGL enzim gátlása pedig erősíti és időben elnyújtja az endokannabinoid-mediálta szinaptikus depresszió több formáját (Melis et al., 2004; Hashimoto et al., 2007; Pan et al., 2009; Lee et al., 2015). Hasonlóképpen a DGL- α génkiütött állatokban hiányzik az endokannabinoid-mediálta szinaptikus plaszticitás minden formája (Gao et al. 2010; Tanimura et al. 2010; Yoshino et al. 2011), az MGL génkiütött állatokban pedig fokozottan működik (Pan et al., 2011). Ezért az endokannabinoid rendszer szinaptikus működését a 2-AG jelpályára fókuszálva mutatom be részletesen.

3.1 A 2-AG-közvetítette endokannabinoid jelátvitel

3.1.1 A 2-AG felszabadulást kiváltó élettani hatások

Az előző alfejezetekben bemutattam, hogy milyen enzimatikus lépésekben keletkezhet a sejtekben 2-AG, amely nem konvencionális módon tárolódik szinaptikus vezikulákban, hanem aktivitás-függő („on-demand”) módon szintetizálódik és mobilizálódik (Hashimoto et al., 2013). A következő fontos kérdés, hogy mik lehetnek azok a specifikus élettani hatások, amelyek a 2-AG felszabadulását egy adott sejtben és szinapszisban kiváltják? Mai tudásunk szerint, amely a kiterjedt elektrofiziológiai vizsgálatok eredményein alapul, koncepcionális szempontból két fő mechanizmus, az idegsejtek kellő mértékű depolarizációja és a plazmamembránban elhelyezkedő G_{q/11} típusú G-fehérjét tartalmazó G-fehérje kapcsolt metabotróp receptorok aktivációja,

valamint ezek kombinációja vezethet 2-AG felszabaduláshoz (2. ábra; Ohno-Shosaku és Kano, 2014):



2. ábra: A 2-AG felszabadulás mechanizmusai: **1. Ca-ER** A diacilglicerin (DG) keletkezését (ma még feltáratlan mechanizmus alapján) egyrészt a feszültség-függő kalcium csatornák (VGCC) depolarizáció hatására történő aktivációja miatti intracelluláris kalcium szint emelkedése indukálhatja (a folyamat piros nyilakkal jelölve). **2. Basal-RER** $G_{q/11}$ -fehérje kapcsolt receptor pl. mGluR1-es típusú metabotróp glutamát receptor vagy mAChR M1/M3 muszkarinikus acetilkolin receptor erős aktivációja, melynek következtében beindul a PLC β -enzimen (foszfolipáz C β) keresztül egy kaszkád, amely során a PIP₂-ből (foszfátidilinozitol biszfoszfát) DG keletkezik (a folyamat kék nyilakkal jelölve). **3. Ca-assisted RER** A gyenge $G_{q/11}$ -receptor aktiváció időben szinkronizált egy kis mértékű intracelluláris Ca^{2+} -ion koncentráció emelkedéssel. Ezek a jelek önmagukban nem lennének elegendők ahhoz, hogy beindítsák a 2-AG termelést, de a receptor aktiválásával egyidőben a PLC β enzimet a depolarizáció során keletkezett Ca^{2+} aktiválja és ez 2-AG termeléshez vezet. A 2-AG a posztzinaptikus sejtől kijutva a preszinaptikus CB₁ receptorhoz köt (lásd következő alfejezet). A 2-AG bontásáért nagyrészt a preszinaptikusan elhelyezkedő MGL felelős. A degradáció során arachidonsav (AA) keletkezik. Forrás: Ohno-Shosaku és Kano, 2014, módosítva.

1. CaER - Kalcium irányított endokannabinoid felszabadulás: Ebben a mechanizmusban a 2-AG a megnövekedett intracelluláris kalcium koncentráció hatására szintetizálódik. A kalcium szint növekedés a depolarizáció hatására megnyíló feszültség-függő kalcium csatornákon keresztül történik.

2. Basal-RER - Receptor irányított endokannabinoid felszabadulás: A metabotróp $G_{q/11}$ kapcsolt receptorok aktivációjának hatására történik meg az endokannabinoid felszabadulás. A metabotróp receptor aktiválásának hatására elinduló biokémiai kaszkádban keletkező DAG a 2-AG prekursoraként szolgál, a másik végtermék az IP₃ pedig az intracelluláris kalcium raktárakból szabadítja fel a szükséges kalcium ionokat.

3. Ca-assisted RER – kalcium-segített endokannabinoid felszabadulás: Az előző két folyamat kombinációja. Mai tudásunk szerint fiziológiai szempontból ez lehet a legrealisabb mechanizmus. Ennek egyik oka, hogy nem szükséges hozzá tartós depolarizáció. Már egy rövid akciós potenciál sorozat is elegendő kalcium koncentráció növekedést tud elérni, hogy a kis mennyiségben keletkező DAG-ból a DGL- α enzim 2-AG-t szintetizáljon. Másik oka, hogy amint a fenti ábrából is látszik, a metabotróp glutamát receptorok vagy a muszkarinikus acetilkolin receptorok serkentése aktiválja a PLC β enzim működését, amely szintén kalcium által szabályozott (Hashimoto et al., 2005). A PCL- β és DGL- α enzimek tehát koincidencia detektorként működhetnek, ami azt jelenti, hogy kis mértékű glutamát vagy acetilkolin jel és a posztszinaptikus depolarizáció időben együttes hatására nagyobb lesz az endokannabinoid felszabadulás mértéke, mintha a két hatás által külön-külön felszabadított 2-AG mennyiségét összeadnánk (Ohno-Shosaku és Kano, 2014).

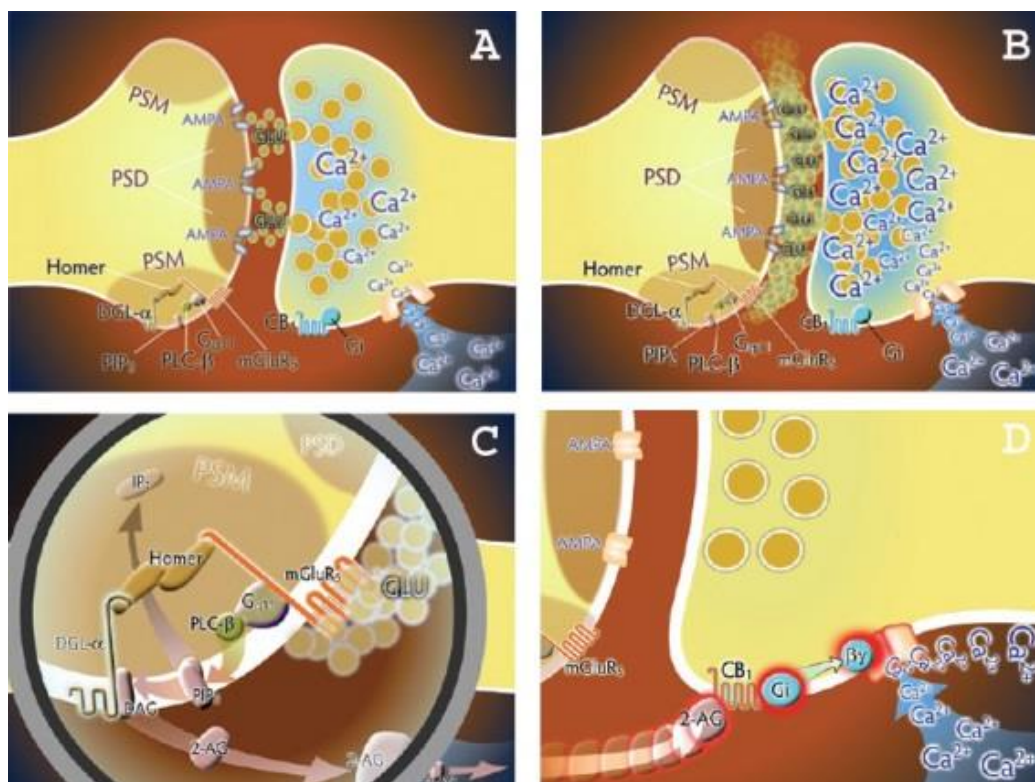
Az első megfigyelések a G_{q/11} –fehérjékkel kapcsolt GPCR receptorok közül az mGluR₁ és mGluR₅ metabotróp glutamát receptorokról írták le, hogy posztszinaptikus aktivációjuk a kisagyi Purkinje sejtekben és a hippocampális piramisokban 2-AG felszabadulást válthat ki (Maejima et al., 2001, Varma et al. 2001). Mai tudásunk szerint a DGL- α enzim valószínűleg minden klasszikus G_{q/11} –kapcsolt receptor által elindított másodlagos hírvívó útvonalban szerepet játszhat, mint a DAG jel féken tartója. Ezzel összhangban már legkevesebb 16 neurotranszmitterről és hormonról (ilyenek például az angiotenzin, noradrenalin, szerotonin, oxitocin, vazopresszin) sikerült kimutatni, hogy képes G_{q/11}-fehérje aktiváción keresztül a PLC β /DGL- α útvonalon a 2-AG szintézisének beindítására (összefoglalásként lásd Katona és Freund, 2012).

3.1.2 A periszinaptikus domén és a 2-AG jelátviteli szerepe a szinaptikus biztosíték modellben

Egy elektronmikroszkópos felvételen a serkentő szinapszisok többsége különböző neurokémiai markerek használata nélkül is jól felismerhető az úgynevezett posztszinaptikus denzitás (PSD) alapján. A PSD egy többszáz fehérjéből álló összetett struktúra, amely kulcsszerepet játszik az anterográd szinaptikus jelátvitelben (Sheng és

Hoogenraad, 2007). Kvantitatív neuroanatómiai vizsgálatok alapján, amelyek a 2-AG szintézis-útvonalának molekuláris alkotóelemeit vizsgálták, fény derült arra, hogy az mGluR₁/mGluR₅ receptorok, a G_{q/11} fehérjék és a PLC β enzim szubszinaptikus lokalizációja jellegzetes eloszlást mutat. Ezek a fehérjék intraszinaptikusan a PSD területéről hiányoznak, ezzel szemben szelektív bedúsulásuk tapasztalható a PSD szélén az úgynevezett periszinaptikus zónában (Baude et al., 1993; Lujan et al., 1996; Tanaka et al., 2000; Uchigashima et al., 2007; Fukaya et al. 2008). Ezzel párhuzamosan pedig saját kísérleti eredményeink feltárták, hogy a DGL- α a serkentő szinapszisok szélén szintén egy periszinaptikus gyűrűben koncentrálnak (részletesen lásd később az Eredmények fejezetben), amelyet mások is megerősítettek (Yoshida et al., 2006). A 2-AG szintézisében részt vevő makromolekuláris komplex periszinaptikus összetartására a Homer állványzatfehérjék szolgálnak (Brakeman et al., 1997; Jung et al., 2007; Tang és Alger, 2015). A 2-AG szintézisében szerepet játszó fehérjekomplex a periszinaptikus masina (PSM) elnevezést kapta, hogy elkülöníthető legyen a funkcionálisan eltérő feladatú PSD fehérjekomplextől (Katona és Freund, 2008).

Mi lehet a szinaptikus élettani feladata a PSM-nek? Ez a különleges periszinaptikus eloszlás arra enged következtetni, hogy ez a rendszer fordíthatja le az anterográd transzmisszió mértékét egy retrográd visszacsatolási jellé (**3. ábra**). Például a preszinaptikus sejt fokozott aktivitása esetén a felszabaduló glutamát nemcsak az intraszinaptikus AMPA és NMDA ionotróp receptorokat fogja aktiválni, hanem a szinapszis szélén „túlcsoportulva” a PSM területén található metabotróp glutamát receptorokon keresztül beindítja a 2-AG termelődéséért felelős kaszkádot. Ez a folyamat úgy működik, mint egy „szinaptikus biztosíték”, mert a serkentő szinapszis túlzott működése esetén a posztzinaptikus sejt a negatív visszacsatolás segítségével védheti magát. A PSM elemeinek hibás működése pedig összefüggésbe hozható olyan betegségekkel, amelyek során túlzott neuronhálózati aktivitás fordul elő, mint például epilepsziában (Kim et al., 1997; Wettschureck et al., 2006, Tang és Alger, 2015).



3. ábra: A periszinaptikus masina (PSM) működése és a szinaptikus biztosíték modell. (A) Az alapszintű serkentő aktivitás során az akciós potenciál hatására a preszinaptikus sejtől a beáramló kalciumionok hatására glutamát (GLU) ürül és a posztzinaptikus denzitás részét képező ionotróp glutamát receptorokhoz (ilyen például az ábrán látható AMPA receptor, de az itt nem ábrázolt NMDA receptor is) köt. (B) Megnövekedett preszinaptikus aktivitás és a sejtbe a feszültségfüggő kalcium csatornákon beáramló nagy mennyiségű kalcium ion hatására a preszinaptikus sejtől felszabaduló glutamát (GLU) a szinapszis szélén túlszaporodva eljut a periszinaptikus masina területén lévő metabotróp glutamát receptorokhoz (jelen esetben mGluR₅). (C) A PSM biokémiai kaszkádjában az első lépésben a glutamát kötődik az mGluR₅ receptorokhoz. A G_{q/11} szignálútvonalon aktiválódik a foszfolipáz Cβ (PLCβ) enzim, amely a foszfátidil-inozitol-biszfoszfátból (PIP₂) diacil-glicerint (DAG) és inozitol-triszfoszfátot (IP₃) állít elő. Az így keletkezett DAG-ot a diacil-gliceril lipáz-α enzim (DGL-α) 2-arachidonil-glicerinné (2-AG) hidrolizálja. Az mGluR₅ receptor és a DGL-α enzim is rendelkezik Homer kötőhellyel, ez az állványzatfehérje a PSM alkotóit egymással összekapcsolódva tartja. (D) Az előző ábrán bemutatott lépésekben keletkező 2-AG retrográd útvonalon haladva, a preszinaptikus sejtben található CB₁ receptorhoz kötődik. A G-fehérje kapcsolt CB₁ receptor aktiválása következtében a G-fehérje βγ alegységének hatására a feszültség-függő kalcium csatornák működése gátolódik. Ennek hatására több kalcium nem tud bejutni az idegvégződésbe és megszűnik a glutamát túlzott felszabadulása. Forrás: Katona és Freund, 2008, módosítva.

3.2. Endokannabinoidok által szabályozott szinaptikus plaszticitás a CB₁ receptor aktivációján keresztül

A posztzinaptikusan felszabaduló 2-AG a preszinaptikus CB₁ receptorokhoz kötődve általában olyan molekuláris folyamatokat indít el, amelyek a szinaptikus átvitel depresszióját okozzák. Ha a preszinaptikus sejtől származó ingerületátvivő anyag

felszabadulásának gátlása rövid távú, akkor rövid távú szinaptikus depresszióról (short-term depression, STD), ha pedig hosszú távú, akkor hosszú távú szinaptikus depresszióról (long-term depression, LTD) beszélünk. Egy szinapszis elcsendesítése időbeliségét tekintve lehet rövid távú vagy hosszú távú és a szinaptikus plaszticitásnak ezek a formái egyaránt előfordulhatnak serkentő és gátló szinapszisok esetében (összefoglalásként lásd Castillo et al., 2012). A szinapszis elcsendesítéséhez mindkét esetben szükséges a CB₁ receptor aktivációja, egymástól abban különböznek, hogy az aktiváció hatására milyen másodlagos jelátviteli kaszkádok indulnak be. A rövid távú hatásnál, amikor a receptorok csak rövid ideig aktiválódnak, valószínűleg a CB₁ receptor aktivációja a G-fehérje $\beta\gamma$ alegységének közvetítésével gátolja a feszültség-függő kalcium csatornák működését és így a kalcium ionok beáramlását az idegvégződésbe (Mackie és Hille, 1992; Herlitze et al., 1996). Először a hippokampális kolecisztokinin (CCK)-pozitív GABAerg interneuronok szinapszisaiban és a kisagyi szemcsesejtek parallel rostjainak glutamáterg szinapszisaiban fedezték fel a endokannabinoid-mediálta rövid távú szinaptikus depressziót (Kreitzer és Regehr, 2001 Ohno-Shosaku et al., 2001; Wilson és Nicoll, 2001). A posztzinaptikus sejt depolarizációjával kiváltott gátlás csökkenés (depolarization-induced suppression of excitation or inhibition, DSE; DSI) általában kevesebb mint egy percig tart. A hippokampális GABAerg terminálisokon specifikusan N-típusú feszültség-függő kalcium csatornák gátlása szükséges a DSI-hez (Wilson et al., 2001; Szabó et al., 2014). Ezzel szemben a kisagyi parallel rostokon az N, a P/Q és az R-típusú kalcium csatornák gátlása egyaránt hozzájárul a DSE-hez (Brown et al., 2004).

A hosszú távú endokannabinoid-LTD-t először a striatum és a nucleus accumbens serkentő szinapszisaiban írták le (Gerdeman et al., 2002; Robbe et al., 2002), majd a hippokampális gátló szinapszisokban is bizonyították (Chevalleyre és Castillo, 2003). A hosszú távú depresszióhoz a CB₁ receptor hosszabb idejű aktiválása szükséges, amely a G fehérjék $\alpha_{i/o}$ alegységén keresztül gátolja az adenilát-cikláz/protein-kináz A (AC-PKA) útvonalat (Chevalleyre et al., 2007). Ez a folyamat a vezikulaürülés hosszú távú gátlását eredményezi a szinaptikus aktív zónában található RIM-1 α fehérje feltételezett defoszforilációján keresztül, amelyért a calcineurin foszfatáz felelős hippokampális GABAerg szinapszisokban (Chevalleyre et al., 2007; Heifets et al., 2008). Meglepő módon sokáig nem sikerült a hippokampális serkentő szinapszisokban bizonyítani az endokannabinoid-LTD jelenségét (Rouach és Nicoll, 2003; Nosyreva és Huber, 2005;

Lante et al., 2006), de az Eredmények fejezetben bemutatott anatómiai kísérleteink feltárták a szükséges molekuláris apparátus jelenlétét és később élettani kísérletekben is igazoltuk létezését a glutamáterg szinapszisokban (részletesen lásd alább).

4. A dolgozatomban vizsgált központi idegrendszeri területek rövid bemutatása

Kísérleteink fő célja a szinaptikus endokannabinoid jelpálya szerveződésének feltárása volt. Ennek a kérdésnek a vizsgálatára két olyan agyterületet, az előagyi hippocampuszt és a középagyi ventrális tegmentális áréát (VTA) választottuk modellként, amelyekről közismert volt, hogy a kannabisz viselkedési hatásának közvetítésében kiemelt szerepet játszanak és az endokannabinoid rendszer élettani és kórélettani szerepének megértéséhez is segítséget nyújthatnak. A hippocampusz a szinaptikus plaszticitás vizsgálatának szempontjából kulcsfontosságú terület a hosszú távú szinaptikus potenciáció (LTP) felfedezése óta (Bliss és Lomo, 1973), és a tanulási folyamatok vizsgálatában is kiemelkedő szerepe van H.M. híres esete óta, amelyben kiderült, hogy a hippocampusz eltávolítása anterográdnál okoz (Scoville és Millner, 1957). Ezzel párhuzamosan a CB₁ receptorok mennyisége radioligand kötődési vizsgálatok alapján -a kisagy mellett- a hippocampuszban a legnagyobb a központi idegrendszerben (Herkenham et al., 1990), és napjainkra már általánosan elfogadott az is, hogy az alkalmi kannabiszhasználat akut tanulási problémákhoz vezet, rendszeres fogyasztása pedig krónikus zavarokat okoz a kognitív folyamatokban (összefoglalásként lásd Broyd et al., 2016).

A VTA-ban helyezkednek el az agyi jutalmazórendszerben és motivációs folyamatokban kulcsszerepet játszó dopamintermelő sejtek (Dahlstroem és Fuxe, 1964), és az elmúlt évtizedben az is kiderült, hogy a dopaminerg neuronok afferens szinapszisaink plaszticitása alapvetően fontos a kábítószerrel kiváltott addikció kialakulásában (Lüscher és Malenka, 2011). A drog-indukálta szinaptikus plaszticitás tovább tart az agyban, mint a kémiai anyag akut jelenléte és tartósan átrendezi a mezokortikolimbikus neuronhálózatok működését, ami végül a szenvedélybetegségek viselkedési tüneteiben fog tükröződni. Az endokannabinoid jelpálya számos szinaptikus plaszticitási folyamatban részt vesz a VTA dopaminerg neuronok afferens szinapszisaiban (Wang és Lupica, 2014). A kannabisz hatóanyaga a THC ugyanakkor jelentősen fokozza a dopamin felszabadulást a nucleus accumbensben (Tanda et al., 1997), a rendszeres kannabiszhasználat pedig dózistól és gyakoriságtól függően

hozzászokáshoz vezet (Budney et al., 1999; Tanda et al., 2000). Legújabb eredmények kimutatták azt is, hogy a kannabiszfüggők köztiagyában jóval kevesebb dopamin szabadul fel, mint a kontroll absztinens populációban (van de Giessen et al., 2016).

4.1 A hippocampusz

4.1.1. A hippocampusz általános anatómiai felépítése

A hippocampusz az agykéreg fejlődéstanilag legősibb agyterületéhez, az archikortexhez tartozik és a neocortex temporális lebenye alatt helyezkedik el. Makroszkópos felépítése legkönnyebben úgy írható le, ha két egymásba forduló „C” alakként képzeljük el. Az egyik C alakot az Ammon-szarv képezi, a másik pedig latinul a gyrus dentatus (magyar neve a ritkán használt fogas tekervény). Az Ammon-szarv rágcsálókban három fő régióból áll: CA1, CA2 és CA3 (ahol a „CA” rövidítés az Ammon-szarv latin nevének a „cornu ammonis”-nak a rövidítéséből adódik). A gyrus dentatussal határos hilus részét egyes szerzők CA4-nek nevezik, ennek a nomenklatúrának a használata az emberi hippocampusz esetén gyakoribb, a rágcsálók esetében ritka, mert a hilusban található GABAerg interneuronokat és glutamaterg mohasejteket afferens és efferens kapcsolataik elsősorban a gyrus dentatus szemcsesejtjeihez kötik (Amaral, 1978).

A hippocampusz finomabb szerkezete rétegzett, ami az anatómiai és élettani kísérletekben segíti a célzott vizsgálatokat, nagyrészt ezért is lett a szinaptikus plaszticitással kapcsolatos kutatások egyik fontos agyterülete. Az egyes rétegek jól elkülöníthetőek egymástól. Ennek oka, hogy a neocortextól eltérően a hippocampusz fő principális sejtípusainak sejttestjei egy sűrűn tömött sejtrétegben helyezkednek el. Ezek a principális sejtek glutamaterg projekciós sejtek, melyek ún. piramissejtek a stratum pyramidale-ban az Ammon-szarv területén, illetve ún. szemcsesejtek a gyrus dentatusban a stratum granulosum-ban. A rétegek további felosztása a principális sejtekre érkező serkentő bemenetek térbeni elkülönülésén és az ehhez alkalmazkodó karakterisztikus dendritarborizációs mintázatokon alapszik. Az Ammon-szarv rétegei a következők: alveus (egy fehérállomány, ami nagyrészt a hippocampusz efferens rostjait tartalmazza), stratum oriens (amelyben a piramissejtek bazális dendritjei fordulnak elő), stratum pyramidale (a sejttestek rétege), stratum lucidum (csak a CA3 régióban a proximális dendritekre érkező moharostokat tartalmazza), stratum radiatum (itt

arborizálnak a piramis sejtek elsődleges apikális és oblique dendritjei), stratum lacunosum-moleculare (itt találhatóak a terminális dendritágak, amelyeket az entorhinális kéregből eredő perforáns pálya rostjai innerválnak). A gyrus dentatus rétegei a következők: stratum moleculare (ide szintén a perforáns pálya érkezik a szemcsesejtek dendritfájára), stratum granulosum (szemcsesejtek sejtteste alkotja), hilus (itt interneuronok és mohasejtek találhatóak, amelyeken a szemcsesejtek moharostjai formálnak serkentő szinapszisokat).

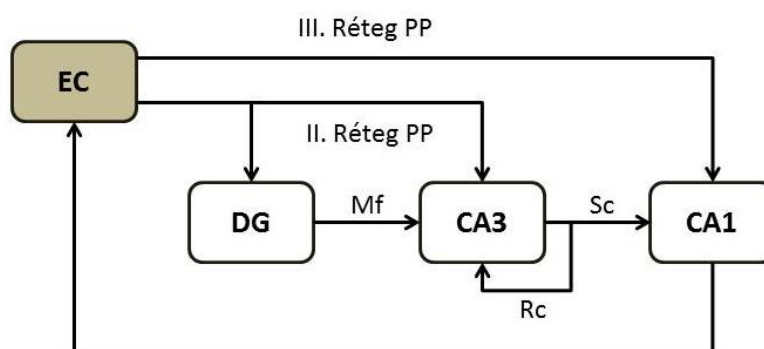
4.1.2 A hippocampusz főbb sejtípusai és kapcsolatrendszerük

Hippokampusz fő sejtípusai a glutamáterg és a GABAerg sejtek. Korábbi felosztásuk, mely elsődlegesen az axon arborizáció alapján történt (projekciós serkentő hatású sejtek és lokálisan arborizáló gátló hatású interneuronok) ma már részben idejét múlt (Freund és Buzsáki, 1996). Egyrészt a hiláris glutamáterg mohasejtek fontos szerepet játszanak a gyrus dentatus lokális mikroköreiben (Jinde et al., 2013), másrészt meglepően nagyszámú GABAerg sejtípusról derült ki, hogy távoli agyterületekre vetítenek (összefoglalásként lásd Jinno, 2009; Caputi et al., 2013) és elképzelhető, hogy a lokális GABAerg interneuronok sem minden esetben gátolják posztzinaptikus partnerüket (Szabadics et al., 2006).

Az elmúlt évtizedekben a hippocampális sejtípusok témakörében összegyűlt hatalmas ismeretanyag az interneten szabadon elérhető a hippocampome.org adatbázisban (Wheeler et al., 2015). Az alábbiakban csak a főbb hippocampális idegsejtípusokat mutatom be, elsősorban a dolgozatomban bemutatott kísérletekben szereplő sejtípusokra fókuszálva.

A hippocampusz glutamáterg sejtjei az Ammon-szarv piramis sejtjei, a gyrus dentatus szemcsesejtjei, valamint a hilusban található mohasejtek. A főbb régiókban megtalálható serkentő sejtek kapcsolatrendszere adja a hippocampusz jól definiált triszinaptikus-hurok alapszerkezetét (**4. ábra**). A gyrus dentatus az entorhinális kéreg második rétegéből kapja fő bemenetét a perforáns pályán keresztül, amely a szemcsesejtek dendritjein végződik. A gyrus dentatus szemcsesejtjeinek axonjai alkotják a moharostokat, melyek a CA3 piramis sejt proximalis dendritjein szinaptizálnak a stratum lucidum területén. A CA3 piramis sejt vetítenek az ellenoldali

hippokampuszba, szinaptizálnak más CA3 piramissejtekkel rekurrens kollaterálisokon keresztül és a CA1 piramissejtekkel a Schaffer-kollaterálisokon keresztül. Végül a CA1 réteg piramissejtjei az entorhinális kéreg felé továbbítanak információt. Természetesen ez az alapszerkezet sokkal összetettebb. Az entorhinális kéregből például érkezik közvetlen serkentő bemenet a CA3 és a CA1 piramissejtek disztális dendritjeire is a stratum lacunosum-moleculare területén, amelynek jól elkülöníthető élettani szerepe van az időzítésben eltérő memórianyomok asszociációjában (Suh et al., 2011).



4. ábra Sematikus ábra a triszinaptikus-hurok felépítéséről. A hippokampusz fő bemenetét az entorhinális kéreg (EC) második-harmadik rétegéből kiinduló perforans pálya (PP) adja, amely egyrészt a gyrus dentatus (DG) szemcsesejtjeinek dendritjein, másrészt a CA3 és CA1 réteg piramissejtjein szinaptizál. A szemcsesejt axonjai képezik a moharostokat (Mf), melyek a CA3 réteg piramissejtjeinek dendritjein végződnek. A CA3 piramissejtjei egyrészt más CA3 piramissejteket idegeznek be rekurrens kollaterálisokkal (Rc), másrészt a Schaffer-kollaterálisokat (Sc) alkotva a CA1 piramissejtjeire érkezik. Végül a CA1 piramissejtjei az entorhinális kéregben kapcsolódnak át és így biztosítják a feldolgozott információ visszajutását a kérgi területekre.

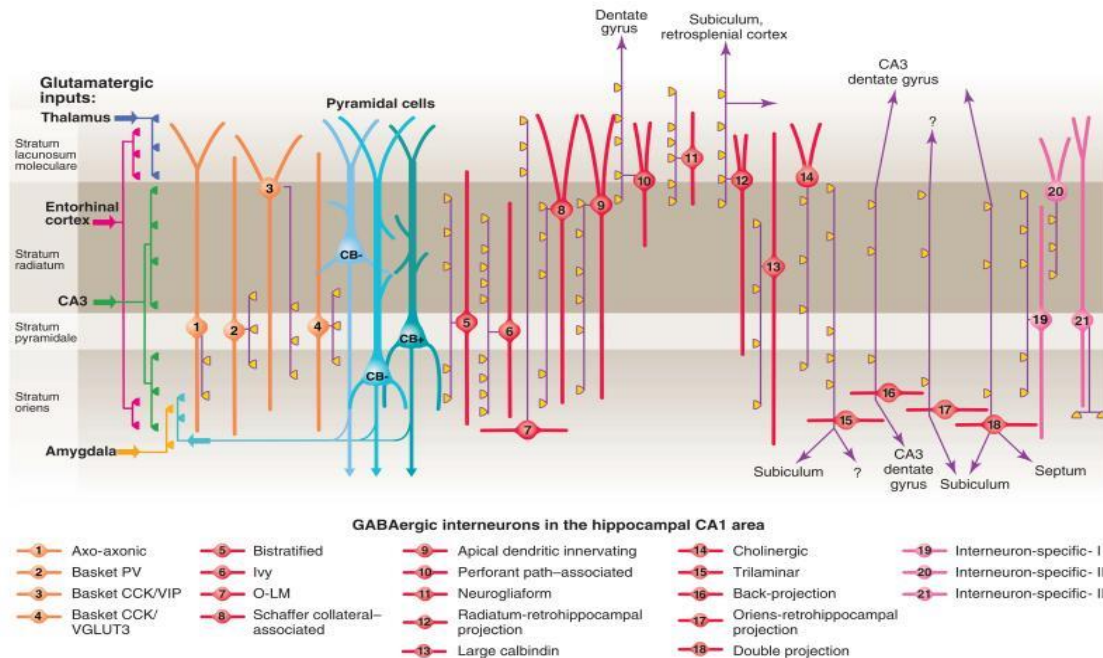
A hippokampusz és tágabb értelemben az agykéreg GABAerg interneuronjainak elképesztő molekuláris, anatómiai és élettani sokfélesége intenzív kutatások tárgya évtizedek óta (összefoglalásként lásd Freund és Buzsáki, 1996; DeFelipe et al., 2013). GABAerg interneuronoknak eredeti meghatározás szerint azokat az idegsejt típusokat nevezzük, amelyek (és nevük is erre utal) nyúlványai arra az agyterületre korlátozódnak, amelyben sejttestjük található, így a helyi neuronhálózatok szabályozásában vesznek részt. Legfőbb feladatuk a principális sejtek gátlása és működésük időbeli összehangolása. Ma már tudjuk, hogy vannak vetítő interneuronok is, melyek nyúlványai

más agyterületekre is vetítenek. Az első ilyen interneurontípus a mediális szeptumba vetítő interneuronok voltak (Tóth és Freund, 1992), ezekről a sejtekről később meglepő módon kiderült, hogy lokálisan a hippocampusz területén szelektíven más interneuronokat innerválnak (Gulyás et al., 2003). Míg a központi idegrendszerben a principális sejtek nagy része serkentő hatású és glutamát a legfőbb ingerületátvivő anyaga, addig az interneuronok nagy része gamma-amino-vajsavat (GABA) használ, amellyel általában hiperpolarizálja és ezzel gátolja az általa beidegzett sejtet. Bár kivételek ebből a szempontból is léteznek, például egyes kosársejtek tartalmazzák a vGluT3 vezikuláris glutamát transzportert, ami arra utal, hogy ma még nem ismert körülmények között de ezek a sejtek is szabadíthatnak fel glutamátot (Somogyi et al., 2004). Bár a GABA a legelterjedtebb gátló ingerületátvivő anyag, de egyes interneurontípusok neuropeptideket is használnak (pl. kolecisztokinin, szomatosztatin stb.) másodlagos modulátorokként (összefoglalóként lásd Freund és Kali, 2008, www.scholarpedia.org).

A hippocampális interneuronoknak a ma legáltalánosabban elfogadott felosztása szerint legalább 21 típusa ismert (**5. ábra**; Klausberger és Somogyi, 2008). Ezek a felosztások elsősorban az egyes interneuronok kimeneti tulajdonságain alapulnak azaz azon, hogy milyen más sejteket innerválnak és azokat a szomatodendritikus régió melyik doménjében. Ez alapján a célelem-specificitás alapján négy főbb populáció létezik, (periszomatikus, dendritikus, interneuron-specifikus, vetítő). Neurokémiai markerek segítségével (peptid neuromodulátorok, receptorok ill. kalcium-kötő fehérje tartalom alapján) szintén több populáció azonosítható, ezek a markerek ráadásul immunhisztokémiai reakciókban segítik az egyes interneuron típusok vizualizációját.

A hippocampusz CA1 régiójában található interneuronok legfőbb neurokémiai markereit a következő oldalon található **1. táblázat** mutatja be. Az elmúlt évek forradalmi előrelépései az egyedi sejtekből kinyerhető teljes mRNS transzkriptómok vizsgálatában hamarosan várhatóan tovább finomítják a mai képet, például az Allen Intézet a látókéreg GABAerg interneuronjait teljes génexpressziós profiljuk alapján 23 típusba sorolja (Tasic et al., 2016). Sejtélettani tulajdonságok alapján (például tüzelési mintázat, bemenő ellenállás), vagy akár in vivo időbeli aktivitásmintázat alapján (a lokális EEG ritmusokkal hogyan asszociált időben a tüzelése az adott sejtnek) szintén lehet osztályozni az

interneuronokat. Valószínűleg a legteljesebb képet a teljes kombinált molekuláris, morfológiai és fiziológiai karakterizáció együttes alkalmazása fogja eredményezni.



5. ábra: GABAerg gátlósejtek a hippocampusz CA1 területén. Az ábrán a CA1 régió eddig ismert interneuronjai és ezeknek a piramis sejtekkel való kapcsolatrendszere látható. Az ábra bal szélén láthatóak a hippocampusz rétegei, valamint négy hippocampuszba érkező serkentő bemenet. A kékekkel jelölt sejtek a piramis sejtek, melyek a lilával jelölt interneuron axonokon levő citromsárga terminálisok innerválnak. Az ábra jól mutatja az interneuronok és azok boutonjainak térbeli elhelyezkedési sokféleségét. Rövidítések: PV, parvalbumin; CCK, cholecystokinin; VIP, vasoactive intestinal polipeptid; VGLUT3, vezikuláris glutamát transzporter 3-as receptor; O-LM, oriens-lacunosum moleculare. Forrás: Klausberger és Somogyi, 2008.

A szinaptikus endokannabinoid jelpálya molekuláris szerveződését vizsgáló kísérleteinkben (részletesen lásd az Eredmények fejezetben) két fő GABAerg interneuron típusra koncentráltunk, amelyeket az elérhető neurokémiai markerek és a dendritjeik túskeborítotttsága (tűskétlen vagy tűskék dendritjeik vannak) alapján választottunk ki. Ez a neurokémiai markerekkel jelölhető két interneuron populáció, a parvalbumint, illetve szomatosztatint tartalmazó interneuronok. A parvalbumin egy kis molekulatömegű (9-11 kDa) kalcium-kötő fehérje. A hippocampuszban a parvalbumin-tartalmú interneuronokból van a legtöbb (Freund and Kali, 2008), ráadásul a parvalbumin-immunpozitív sejtek között (célelem-eloszlást tekintve) előfordulhat

periszomatikus kosársejt, periszomatikus axo-axonikus sejt és dendritikus kétrétegű (bistratified) sejt is. Vitatott, hogy esetleg az O-LM (oriens-lacunosum-moleculare) sejtekben is lehet kis mennyiségben parvalbumin (Klausberger et al., 2003), de az elektron mikroszkópos mintavételezés során a stratum radiatumra korlátoztuk az analizisünket, az O-LM sejteknek azonban nincsen dendritjük ebben a rétegben. Az in vitro körülmények között tapasztalt élettani tulajdonságok alapján mindhárom sejtípus alapvetően gyors tüzelésű és kis bemeneti ellenállással rendelkező sejt. Érdekes módon in vivo tüzelési mintázatuk eltérő. Például a periszomatikus parvalbumin-pozitív kosársejtek az állatok REM fázisú alvásakor megfigyelhető theta hullámok leszálló ágán tüzelnek, az axo-axonikus sejtek pedig közvetlen az theta hullámok csúcsa után (Klausberger et al., 2003). Ezzel szemben a kétrétegű és az O-LM sejtek elsősorban az egyedi szinuszhullámok alján tüzelnek theta aktivitás alatt altatott állatban (Klausberger et al., 2003; 2004), ami eltérő neuronhálózati funkcióra utal.

1. táblázat: A CA1 régióban előforduló interneuronok fő neurokémiai markerei. A táblázat tartalmazza az adott neurokémiai marker rövidítését és nevét. Forrás: Bezaire és Soltész, 2013.

<i>Neurokémiai marker rövidítése</i>	<i>Név</i>
CB	Calbindin
CB ₁ R	Cannabinoid receptor 1
CCK	Cholecystokinin
CR	Calretinin
COUP-TFII	COUP transcription factor 2
M2R	muscarinic acetylcholine receptor 2
mGluR1 α	metabotropic glutamate receptor 1 α
mGluR8	metabotropic glutamate receptor type8
<i>Neurokémiai marker rövidítése</i>	<i>Név</i>
nNOS	neuronal nitric oxide synthase
NPY	neuropeptide Y
PV	Parvalbumin
SOM	Somatostatin
VIP	vasoactive intestinal polypeptide

A szomatostatin egy peptidhormon, amely az endokrin rendszer szabályozása mellett a neuronális kommunikációban is szerepet játszik G-fehérje kapcsolt receptorain

keresztül. A stratum oriensben nagy mennyiségben találhatóak szomatosztatin-pozitív interneuronok (Somogyi et al., 1984; Katona et al., 1999). Ezek célelem-eloszlásukat tekintve O-LM vagy kétrétegű sejtek (Maccaferri et al., 2000), esetleg hippokampo-szeptális interneuronok (Gulyás et al., 2003). A szomatosztatin az interneuronok idegvégződéseiben koncentrálnak, felszabadulása gátolja a szomszédos serkentő terminálisokat (Boehm és Betz, 1997). Jellemző rájuk a nagyon sűrű glutamáterg bemenet is, amely dendritjeikből kinyúló tüskeszerű nyúlványaikra érkezik. Ezeknek a serkentő szinapszisoknak a szélén nagy koncentrációban található mGluR1 α receptor (Baude et al., 1993), amely vizualizálása segíti az O-LM sejtek dendritfájának megjelenítését.

5. A ventrális tegmentális área általános anatómiai felépítése és kapcsolatrendszere

A ventralis tegmentális área (VTA) a középgagy része és a dopaminerg sejtek révén fontos részét képezi a katekolaminerg felszálló rendszereknek. Ezeknek a felszálló pályákat alkotó sejteknek a sejttestei kis magcsoportokba tömörülnek a fejlődéstörténetileg ősi agyterületeken, ugyanakkor az ingerületátvivő anyagaikat térfogati transzmisszióval juttatják el a fogadó idegsejtekhez, így sokszor egyszerre több terület működését is befolyásolják (összefoglalásként lásd Vizi et al., 2004). Az agyban viszonylag kevés dopaminerg sejt található, amelyek mindössze néhány és viszonylag kicsi agyterületre korlátozódnak. Ezek közül a sejtcsoportok közül az úgynevezett A10-es sejtcsoport található a VTA-ban, illetve a közvetlen közelében szintén jelentős a substantia nigra pars compacta részén koncentrálnak A9-es dopaminerg sejtcsoport (Oades és Halliday, 1987). A VTA sejtjeinek többsége (~70%) dopaminerg, de kisebb részben tartalmaz GABAerg (~30%) és glutamáterg (~2-3 %) neuronokat is. A VTA-ban található dopaminerg sejtek rostjaikkal nagyrészt a nucleus accumbens vagy másnéven ventrális striatum területére (mesolimbikus útvonal), másrészt a prefrontális kéregbe (mezokortikális útvonal) vetítenek. A VTA-val szomszédos substantia nigra területén található dopaminerg sejtek pedig a nucleus accumbens felett található dorzális striatumba küldik axonjaikat (nigrostriális útvonal). Ezeken a célterületeken a dopamin hatását a G-fehérje kapcsolt receptorok családjába tartozó dopamin receptorok közvetítik, amelyeknek 5 típusát ismerjük, de a legtöbbet az 1-es (D₁) és a 2-es (D₂) típusú dopamin receptorokról tudunk. Ezek a receptorok elsősorban a hozzájuk kapcsolódó G-fehérje α alegységének típusában különböznek, például a D₁ receptorok G_{s α} vagy G_{o1f}, míg a D₂ receptorok G_{i α} alegység

tartalmú G fehérjét aktiválnak. Fontos kiemelni, hogy a nucleus accumbens és a striatum területén található speciális tüskés neuronok (ún. medium spiny neuronok), amelyek a dopaminerg innerváció egyik legfontosabb célelemét jelentik szintén két csoportra oszthatóak. Ezek a sejtek D₁ vagy D₂ dopamin receptor-tartalmúak és mindkét agyterületen eltérő efferens extrastriatalis kapcsolatrendszerben vesznek részt (Calabresi et al., 2014), valamint eltérő szerepük van az addikció kialakulásában (Yager et al., 2015).

Habár a dopaminerg sejteket morfológiai és élettani szerepük alapján évtizedekig homogén csoportként kezelték, az elmúlt néhány évben kiderült, hogy kapcsolatrendszerük és az egyes viselkedési feladatokban például a jutalmazással vagy a büntetéssel kapcsolatos attraktív vagy averzív viselkedésben játszott szerepük alapján több altípusra oszthatóak mind a VTA, mind a substantia nigra területén (Lammel et al., 2008; Henny et al., 2012; összefoglalásként lásd Roeper, 2013). A dopaminerg sejtek nem várt heterogenitása az afferens szinaptikus bemeneteik specificitásában és plaszticitásában is megmutatkozik. Például a kokain által kiváltott szinaptikus plaszticitás kizárólag azokban a dopaminerg neuronokban volt megfigyelhető, amelyek a nucleus accumbens shell régiójába vetítettek, ezzel szemben a negatív, averzív ingerek által kiváltott szinaptikus plaszticitás a mediális prefrontális kéregbe vetítő dopaminerg sejtekben volt tapasztalható (Lammel et al., 2011). A jutalom közvetítésében úgy tűnik a laterodorzális tegmentumból érkező serkentő bemeneteknek van szerepe, az averzióért felelős input pedig a laterális habenulából érkezett (Lammel et al., 2012). Ezek az új eredmények szemléletváltást hoztak a dopaminerg sejtek afferenciájával kapcsolatban és várható, hogy az eltérő dopaminerg sejtek különböző szinaptikus plaszticitási folyamatokat fognak használni adott viselkedési feladatokban (összefoglalásként lásd Pignatelli és Bonci, 2015). Ennek felderítése nélkülözhetetlen lesz például annak megértésében, hogy az egyes függőséget kiváltó kémiai szerek, mint például a THC hogyan és mikor fognak fokozott dopaminfelszabadulást okozni a dopaminerg sejtekre érkező szinaptikus bemenetek hatékonyságának megváltoztatásával, ami pedig aláhúzza a megfelelően részletes molekuláris anatómiai vizsgálatok szükségességét az endokannabinoid jelátvitel szerveződéséről a dopaminerg sejtek afferens szinapszisaiban.

III. CÉLKITŰZÉSEK

A szinaptikus endokannabinoid rendszer általános működési elvének megértéséhez részletes ismeretek szükségesek a jelpálya molekuláris alkotóelemeinek pontos celluláris és szubcelluláris eloszlásáról. Ezért kutatómunkám során első fő célul tűztük ki, hogy:

- I. Feltárjuk a 2-AG egyik szintetizáló enzimének a DGL- α -nak és a 2-AG molekuláris célpontjának a CB₁ kannabinoid receptornak precíz celluláris és szubcelluláris lokalizációját a hippocampusz principális sejtjeiben.

Vizsgálataink során a következő specifikus kérdésekre kerestük a választ:

1. Megtalálható-e a hippocampális glutamaterg sejt típusokban a DGL- α mRNS és az enzimfehérje?
2. Azokban a principális sejtben, amelyekben megtalálható a DGL- α enzim, vajon milyen az enzimfehérje szubcelluláris lokalizációja, milyen szinapsztípusokban található meg?
3. Milyen típusú glutamaterg sejtben található meg a CB₁ receptor és mi a precíz szubcelluláris lokalizációja?
4. A DGL- α enzim és a CB₁ receptor megtalálható-e egymás közelében, a 2-AG jelpálya két alkotóeleme kolokalizál-e egy adott serkentő szinapszisban?

Régóta ismert volt, hogy az endokannabinoidok a szinaptikus plaszticitás sok formájában, mint például a hosszú távú szinaptikus depresszió alapvető szerepet játszanak a központi idegrendszer legtöbb vizsgált sejt típusában. Meglepő módon néhány korábbi tanulmány azt sugallta, hogy a hippocampális interneuronokra érkező serkentő szinapszisokban nincsen endokannabinoid-LTD. Ezért kutatómunkám során második fő célként tűztük ki annak vizsgálatát, hogy:

- II. A hippocampális interneuronokra érkező serkentő szinapszisokban vajon megtalálhatóak-e az endokannabinoid szignálrendszer elemei, amelyek molekuláris platformot jelenthetnek endokannabinoid-LTD jelenségéhez a GABAerg interneuronok afferens glutamaterg szinapszisaiban?

Vizsgálataink során a következő specifikus kérdésekre kerestük a választ:

5. A hippocampusz GABAerg gátlósejtjeiben a DGL- α -t kódoló gén be van-e kapcsolva avagy ezek az interneuronok termelik-e a DGL- α mRNS-t?
6. A parvalbumint és szomatosztatint tartalmazó interneurontípusokban megfigyelhető-e a DGL- α enzimfehérje jelenléte?
7. A fent említett neurokémiai markerekkel jelölhető interneurontípusokban milyen a DGL- α enzim szubcelluláris lokalizációja?

A ventrális tegmentális área (VTA) az agyi jutalmazó- és motivációs rendszerek egyik központi területe és közismert, hogy a VTA dopaminerg neuronjainak fokozott működése fontos szerepet játszik a különböző függőségek kialakulásában. A kannabisz önmagában is függőséget okoz és az endokannabinoid rendszer szükséges a függőséget okozó drogok addikciót kiváltó hatásához. Ezért kutatómunkám során harmadik fő célul tűztük ki, hogy:

- III. Felderítsük az endokannabinoid jelpálya molekuláris és anatómiai szerveződését a VTA területén és teszteljük a hipotézis, hogy a szinaptikus 2-AG jelpálya hippocampuszban feltárt szerkezete általánosan kiterjeszthető a központi idegrendszer más agyterületeire is

Vizsgálataink során az alábbi specifikus kérdésekre kerestük a választ:

8. Termelik-e a VTA területén található neuronok a DGL- α gén mRNS-ét?
9. Megtalálható-e a dopaminerg sejtekben a 2-AG-t termelő DGL- α enzimfehérje?
10. Milyen a DGL- α enzim pontos szubcelluláris lokalizációs eloszlási mintázata különös tekintettel a dopamintermelő sejtekre?
11. Megtalálható-e a CB₁ kannabinoid receptor is a VTA területén?
12. Milyen a CB₁ receptor szubcelluláris eloszlása a VTA különböző típusú GABAerg és glutamáterg szinapszisaiban?
13. A DGL- α enzim és a CB₁ receptor kolokalizál-e a szinapszisokban?

IV. MÓDSZEREK

1. Mintaelőkészítés a molekuláris biológiai és az anatómiai kísérletekhez

A doktori disszertációban bemutatott kísérleteinket az MTA KOKI Állatkísérleti Etikai Bizottsága és a Budapest Fővárosi Állat-és Élelmiszerügyi és Élelmiszer Ellenőrző Állomás állatkísérleti engedélyével az „Állatok védelméről és kíméletéről” szóló 1998. évi XXVIII. törvény (243/1998) 32.§ alapján végeztük. A kísérleteket a 3R (replacement, reduction, refinement) alapelv szellemében terveztük.

A hippokampusz glutamaterg sejtjeiben a DGL- α és CB₁ receptorok kimutatásához szükséges in situ hibridizációs és az immunhisztokémiai kísérleteket 12 példány C57BL/6H (61 \pm 13 napos hím) egéren végeztük. A CB₁ receptor ellen készült antitest specificitását 3-3 példány CD1 törzsbe tartozó vad típusú és CB₁ génkiütött (KO) 57 napos egéren ellenőriztük, amelyeket Catherine Ledent professzorasszony bocsátott rendelkezésünkre (Ledent et al. 1999). A DGL- α antitestek specificitását pedig egy független, itt nem részletezett tanulmányban kollégáim igazolták, a kísérletekhez a vad típusú és DGL- α KO egerek testvérpárjait Kenji Sakimura professzortól kaptuk (Ludányi et al., 2011).

A hippokampusz GABAerg sejtjeiben a DGL- α sejt-típus-specifikus vizualizálásához szükséges in situ hibridizációs, immunhisztokémiai és kombinált in situ hibridizáció/immunhisztokémiai kísérleteket 13 példány vad típusú C57BL/6H hím egéren végeztük. Az egerek 60-80 naposak voltak, a felhasznált állatok száma az alábbi volt az egyes kísérletekben: n=3 az egyszeres in situ hibridizációs kísérletben, n=4 a kombinált in situ hibridizáció/immunhisztokémia kísérletben és n=6 az egyszeres és kétszeres immunhisztokémiai kísérletekben.

A VTA sejtjeiben a DGL- α és a CB₁ expressziójának és lokalizációjának vizsgálatához szükséges in situ hibridizációs és immunhisztokémiai kísérleteket 8 példány vad típusú C57BL/6H (50 \pm 13 napos hím) egéren végeztük. A munka keretében a CB₁ receptor eloszlási mintázatának és a CB₁ receptor ellen készült antitest specificitásának validálását 3-3 példány (C57BL/6J, (186 \pm 15)napos hím) egéren végeztük, amelyeket Andreas Zimmer professzortól kaptunk (Zimmer et al. 1999).

Az *in situ* hibridizációs és immunhisztokémiai anatómiai vizsgálatokhoz szükséges perfúzió előtt a kísérleti egereket pentobarbitalt (9,72 mg/ml) tartalmazó 0,2 ml Equithesin keverékeltató intraperitoneális beadásával altattuk. Az érrendszer mély narkózisban történő, fiziológiás sóoldattal (0,9% NaCl, 2 perc) való átmosását követően a szövetek fixálása céljából a szíven keresztül 4%-os paraformaldehid-tartalmú 0,1 M-os foszfát-pufferrel (PB, pH=7,4) perfundáltuk 20 percen keresztül (100 ml/egér). A VTA kísérletek esetében a fixáló 0,05 %-os glutáraldehidet (EMS) is tartalmazott és a fixálás 30 percig történt. Perfúzió után a koponyából kivett agyat blokkokra vágtuk és a szövetekből Leica VTS-1000 vibratómmal (Vibratome, St. Louis, MO, USA) 0,1 M PB-ben *in situ* hibridizációhoz 40 µm, immunhisztokémiához 50 µm vastag koronális irányú metszeteket vágunk.

2. In situ hibridizáció

2.1. Az *in situ* hibridizációs próbák előállítása

Az *in situ* hibridizációhoz szükséges ribopróbákat egér (C56BL/6H) hippokampális kéregből készített teljes cDNS mintákból nyertük. Az izofluránnal (Florane, Abbott, USA) altatott állatokat dekapitáltuk, majd a megfelelő agyterület szárazjég feletti gyors izolálását követően a fixálatlan szövetekből jégen történő ultrahangos homogenizálás (UH-50 homogenizátorral, SMT, Japán) után RNAqueous 4PCR-kittel (Ambion, Austin, USA) teljes RNS mintákat izoláltunk. Ezután történt a teljes RNS-ből (1 µg) a teljes cDNS minta átírása RevertAid H Minus M-MuLV reverz transzkriptáz enzim (3 µl, Fermentas, Vilnius, Litvánia) segítségével. A reakcióelegy 0,1 % DEPC-cel (dietyl-pirokarbonáttal) kezelt desztillált vizet (30 µl), M-MuLV RT puffert (9µl), oligo-dT primert (10 pmol/ µl, 2 µl), RNáz inhibitor (1 µl RNasin; Promega, Madison, WI, USA) valamint dNTP mixet (1,5 µl; Fermentas) tartalmazott. A reverz transzkripció menete a következő volt: 42°C 1 óra, 95 °C 5 perc, 4 °C 5 perc. A mintákat -70°C-on tároltuk. A kromoszómális DNS cDNS-mintákban való előfordulásának kizárásához reverz transzkriptáz nélküli kontroll reakciót végeztünk (RT-negatív kontroll).

Az *in situ* hibridizációs próbák előállítása a következő módon történt. A DGL-α enzim kódoló régiója alapján a két, egymással nem átfedő szekvenciájú DNS szakasz átírása teljes cDNS mintából csupaszvégű terméket előállító Pfu enzimmal végzett PCR-

segítségével történt, amelyhez a próbákat a Primer3 szoftverrel terveztük meg (Rozen and Skaletsky, 2000). A primerek hosszúsága és szekvenciája a következő volt (az adott nukleotid számozása a nyílt leolvasási keret elejétől kezdődik): Probe1: 598 bp hosszú 1184-1782 szakasz (forward primer 5'- TCA TGG AGG GGC TCA ATA AG, reverse primer 5'- CTA GCG TGC CGA GAT GAC CA); Probe2: 1169 bp hosszú 1967-3135 szakasz (forward primer 5'- TCA GTA TCC GGG GAA CAC TG, reverse primer 5'- AGG GCG ATG GTC AAA TCA CT). A kapott amplikonok a pBluescript II SK⁻ vector SmaI helyére lettek beillesztve T4 DNS Ligáz enzim (Fermentas) segítségével. Ezután következett az adott DGL- α szekvenciát tartalmazó plazmidok transzformációja baktériumokba (E.coli DH5 α kompetens törzs). Az adott fragmentet tartalmazó baktériumklónokat kék-fehér szelekcióval választottuk ki, majd a fehér klónokból mintát vettünk és folyadék-minikultúra segítségével felszaporítottuk. A baktériumokból a plazmid kinyerése és tisztítása után ellenőriztük, hogy az adott plazmid a megfelelő fragmentet tartalmazza-e. Ezt egyrészt restrikciós endonukleázokkal való emésztéssel, majd a kapott termékek méretének agaróz gélen történő ellenőrzésével tettük. Másrészt a kapott klónokból készült tisztított plazmidot szekvenáltattuk, és a kapott szekvenciát az esetleges mutációk kimutatása érdekében az internetes NCBI Blast adatbázisban talált szekvenciákkal vetettük össze. Ha az adott klónban a fragment szekvenciája hibátlannak bizonyult, akkor folyadékminikultúrákból úgynevezett maxikultúrát készítettünk és azt kitisztítva (Qiagen Plasmid Purification Maxi Kit, Qiagen, Hilden, Németország) nagyobb mennyiségben hozzájutottunk a ribopróbákat kódoló plazmidokhoz.

Az in situ hibridizációs próba készítéséhez a vektorokat az 1-es ribopróba esetén BamHI (antisense próba-értelmes szál) és Eco32I (sense próba-értelmetlen szál) restrikciós endonukleáz enzimekkel linearizáltuk. A vektorokat a 2-es ribopróba esetén EcoRI (antisense próba) és BamHI (sense próba) enzimekkel linearizáltuk. Preparatív gél segítségével tisztítottuk a linearizált DNS-t, majd tisztítás után in vitro transzkripciót végeztünk T3 és T7 RNS polimeráz enzimek segítségével (Roche Molecular Digoxigenin KIT, Mannheim, Németország). Az in vitro transzkripciót 37°C-on két óráig végeztük. A keletkezett digoxigenin-jelölt ribopróbákat DNáz-zal kezeltük, majd tisztítás (RNeasy MinElute Cleanup Kit, Qiagen, Németország) után koncentrációjukat és integritásukat spektrofotometria és gélelektroforézis segítségével ellenőriztük.

2.2 Az in situ hibridizáció

Az in situ hibridizációhoz felhasznált metszetek vastagsága 40 μm volt. Az in situ hibridizációhoz használt oldatok közvetlenül az RNáz enzimet inaktíváló DEPC-cel lettek kezelve és utána autoklávozva, vagy olyan vízzel készültek, amelyet előzetesen szintén DEPC kezelésnek vetettünk alá. Így próbáltuk a mintákban levő RNS ribonukleáz enzim általi lebontását elkerülni. A szabadon úszó agymetszetek inkubációja steril műanyag kultúraedényekben történt. A metszeteket először DEPC-es PB-vel (pH=7,4) alaposan átmostuk. Az interneuronokban található alacsony mennyiségű DGL- α enzim kimutatásának érdekében a metszeteket posztfixáltuk 4 órán keresztül, DEPC-es vízzel készült 4% PFA-t (paraformaldehidet) tartalmazó PB pufferben. A metszeteket ezután 3 x 20 percre mostuk a penetráció elősegítését szolgáló 0,1 %-os Tween-20-t tartalmazó foszfát pufferben (PBT) (pH=7,4), majd következett a hibridizációs lépés. A ribopróbákat tartalmazó hibridizációs oldatban az agymetszeteket állandó hőmérsékletet és keverést biztosító hibridizációs szövetkamrában inkubáltuk. A hibridizációs oldat összetétele a következő volt: 50% formamid, 5x SSC, 1% SDS, 50 $\mu\text{g/ml}$ élesztő tRNS, és 50 $\mu\text{g/ml}$ heparin DEPC-kezelt desztillált vízben oldva. A ribopróbával történő hibridizációt szövetkamrában általában egy éjszakán át végeztük 65°C-on. Azonban ahhoz, hogy a hippokampusz interneuronjaiban is ki tudjuk mutatni az alacsonyabb mennyiségű DGL- α enzim jelenlétét, optimalizációs kísérletek után kiderült, hogy a ribopróba hibridizációt alacsonyabb hőmérsékleten (60°C-on) és hosszabb inkubációs idővel (24 óra) szükséges elvégezni. A hibridizációs lépés után a nem-specifikusan kötődött ribopróbákat lemostuk. A mosás oldatai: 1. mosóoldat (50% formamid, 5 x SSC, 1% SDS in DEPC-kezelt vízben oldva) 30 percre, majd ezt a 2. mosóoldattal való mosás követte (50% formamid, 2 x SSC in DEPC-kezelt vízben oldva) 2x45 percre. A mosás hőmérséklete megegyezett a hibridizáció hőmérsékletével és szintén a hibridizációs kamrában folyamatos kevertetés mellett történt. Az inkubációs lépések után a metszeteket 0,1 % Tween-20-at tartalmazó 0,05 M Trisz-pufferelt sóoldatban (TBST, pH=7,6) mostuk, majd ebben az oldatban oldott normál kecske szérumot tartalmazó blokkolóban (TBSTN) inkubáltuk egy órán át. Az alkalikus-foszfátáz enzimmel konjugált kecske anti-digoxigenin Fab fragment antitestet TBSTN-ben oldottuk fel, majd ebben az oldatban inkubáltuk a metszeteket egy éjszakán át 4°C-on. Másnap az inkubációt követő TBST mosási lépés után a reakciót 5-bromo-4-kloro-3-indolil-foszfát (BCIP) és nitrokék-tetrazóniumklorid (NBT)

kromogének elegyével hívtuk elő. A kromogén puffer összetétele mM-os koncentrációban kifejezve a következő volt: NaCl, 100; Tris-Cl, 100, pH: 9.5; MgCl₂, 50; (-)tetramisole hydrochloride, 2; és 0.1% Tween-20. A reakció előhívása sötétben történt, a keletkezett lila csapadék mennyiségének és minőségének kis nagyítású szövettani mikroszkóppal történő időnkénti ellenőrzése mellett. A hívási lépés átlagosan 4-6 órát vett igénybe, az interneuronok esetében pedig legalább 12 órát. A reakció leállítása és alapos 0,1 M-os (pH=7,4) PB-vel történt mosás után a metszeteket tárgylemezre helyeztük és a kombinált in situ hibridizációs-immunhisztokémiai kísérletek kivételével minden további esetben Vectashield fedőanyagba beágyazva fedőlemezrel fedtük le. A kombinált festési eljárás esetében a nem-vizes bázisú Vectamount fedőanyagot használtunk az immunfestéshez használt színes csapadékok kimosódásának elkerülésére. Az elkészült in situ hibridizációs reakciók kiértékelését ZEISS Axioplan 2 mikroszkóppal végeztük, a hippokampusz és a VTA metszetekről Olympus DP70 digitális kamerával készítettünk fénymikroszkópos képeket.

3. Immunhisztokémia

Immunhisztokémiai kísérleteinkben 50 µm vastag előagyi metszeteket használtunk. A metszeteket a metszés után alaposan átmostuk 0,1 M-os (pH=7,4) PB pufferben. Az antitestek penetrációjának esélyét tömény szacharóz oldatban (30%) való mosás, majd négyszer ismételt folyékony nitrogén feletti gyorsfagyasztás és gyors felolvasztás változtatott lépéseivel növeltük meg, amely olyan apró töréseket eredményez a plazmamembránban, amelyek elegendően nagyok ahhoz, hogy az antitestek IgG molekulái átférjenek rajta, de a kémiai detergensnek használatához képest jobb ultrastruktúrális megőrzöttséget eredményez.

Immunhisztokémiai kísérleteinket három alapvető módszerrel: egyszeres peroxidáz alapú immunjelöléssel, egyszeres immunarany jelöléssel, illetve kombinált, kétszeres peroxidáz-immunarany jelöléssel végeztük az adott célfehérjével kapcsolatos anatómiai kérdéseink függvényében. A peroxidáz enzim alapú immunjelölés esetében először blokkoltuk az endogén szöveti peroxidáz aktivitást a metszetekhez adott 1%-os H₂O₂ oldattal 10 percig. A metszeteket ezután alaposan átmostuk 0,1M-os (pH=7,4) PB-pufferoldattal. A következő reakciólépések már minden esetben 0,05 M-os trisz-pufferelt (TBS) oldatban (pH=7,4) történtek. A metszeteket 5%-os normál kecske szérummal

(NGS) blokkoltuk 1 órán keresztül, majd a megfelelő elsődleges antitestekkel inkubáltuk 4°C-on 48 órán keresztül. A következő elsődleges antitesteket használtuk kísérleteinkben az Eredmények fejezeteinek sorrendjében: 1. fejezet: poliklonális nyúl anti-DGL- α IgG (1:1000-1:3000, ~0,3-1 $\mu\text{g/ml}$, „INT” antitest, Katona et al., 2006); poliklonális nyúl anti-DGL- α IgG (1:1000-1:3000, ~0,3-1 $\mu\text{g/ml}$, „L26” antitest, Katona et al., 2006); tengerimalac anti-CB₁ IgG (~1 $\mu\text{g/ml}$, Fukudome et al., 2004). Az antitestek specifikusságára az immunjelölés hiányából lehet következtetni a CB₁ KO egerek hippocampusában, DGL- α antitestek esetében a két független epitóp ellen termeltetett antitest teljesen ugyanazt az immunjelölési mintázatot adta. 2. fejezet: poliklonális nyúl anti-DGL- α IgG (1:3000, 1 $\mu\text{g/ml}$, „INT” antitest, Katona et al., 2006); monoklonális egér anti-parvalbumin IgG (1:5000, Swant); monoklonális patkány anti-szomatostatin IgG (Millipore; 1:200); monoklonális egér anti-mGluR_{1a} IgG (Dr. Görcs Tamás ajándéka, 1:30, Kiss et al., 1996). Az antitestek specifikusságának ellenőrzése DGL- α KO egerekben (amelyek az első kísérletsorozat idején még nem álltak rendelkezésre) lett megerősítve egy független tanulmányban (Ludányi et al., 2011). Az interneuronok neurokémiai markereit vizualizáló monoklonális antitestek specifitását számos független laboratórium korábban megerősítette. A kísérleti körülményeink között pedig az antitestek és az immunfestés az irodalomból már jól ismert tüskétlen parvalbumintartalmú interneuronokat és a somatostatin/mGluR_{1a}-pozitív, filopodiális tüskékkel rendelkező interneuron populációkat vizualizálta (Ouimet et al., 2003). 3. fejezet: poliklonális nyúl anti-DGL- α IgG (0,3 $\mu\text{g/ml}$, „INT” antitest, Katona et al., 2006); poliklonális tengerimalac anti-DGL- α IgG (1 $\mu\text{g/ml}$, „C-42” antitest, Yoshida et al., 2006), amely a DGL- α fehérje C-terminusának utolsó 42 aminosavját ismeri fel; tengerimalac anti-CB₁ IgG (~1 $\mu\text{g/ml}$, Fukudome et al., 2004); monoklonális egér anti-tirozinhidroxiláz (TH) IgG (1:8000, Immunostar). A CB₁ antitest és immunfestés specifikusságát CB₁ KO egerekben ellenőriztük (Zimmer et al., 1999). A DGL- α elleni független epitópok ellen készült antitestekkel végzett immunfestések megegyező immunjelölési mintázatot eredményeztek. A kereskedelmi forgalomban kapható TH antitest pedig jól felismerhetően a katekolaminerg neuronokat jelölte a középagy és az agytörzs területén.

Az elsődleges antitesttel való inkubáció és az alapos mosások utáni következő lépésben másodlagos ellenanyagokkal inkubáltuk a metszeteket. Az immunfestés céljától

és előhívási módjától függően biotinilált szekundereket (Vector Laboratories, Burlingame, USA) vagy arany-konjugált szekundereket használtunk (Aurion, Wageningen, Hollandia). A kombinált immunarany-immunperoxidáz reakciónál pedig a két különböző fajban készült primer antitesteket egyszerre inkubáltuk a metszeteken, majd a másodlagos antitestektől kezdve szétváltak a két reakció lépései, előbb az immunarany eljárás következett, majd alapos mosási lépések után az immunperoxidáz immunfestést hívtuk elő.

Az immunperoxidáz reakcióhoz használt biotinilált szekunder antitestek a következők voltak: 1. fejezet: biotinilált kecske anti-nyúl IgG (1:300); biotinilált kecske anti-tengerimalac IgG (1:300). 2. fejezet: biotinilált ló anti-egér IgG (1:500). 3. fejezet: biotinilált kecske anti-nyúl IgG (1:300); biotinilált kecske anti-tengerimalac IgG (1:300); biotinilált ló anti-egér IgG (1:300). A metszeteket a TBS-ben oldott megfelelő biotinilált másodlagos ellenanyagokkal két órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd TBS pufferes mosások után avidin-biotinilált tormaperoxidáz enzim komplex segítségével erősítettük tovább az immunjelet (1:500, Elite-ABC, Vector Laboratories, 1,5 óra, TBS-ben oldva). Végül a tormaperoxidáz szubsztrátjait 0,01 %-os hidrogénperoxidot és 3,3'-diaminobenzidint (DAB, TB-ben oldva, pH=7,6) adva a metszetekhez a keletkező barna csapadék segítségével tettük láthatóvá általunk vizsgált fehérje pontos lokalizációs helyét az idegsejtekben és nyúlványaikban.

Az immunarany jelölési eljárás során a hippokampális és középagyi metszeteket az elsődleges ellenanyaggal történő inkubálás után először alaposan átmostuk TBS, majd 0,1 M-os PB pufferekben. Ezután a blokkolási lépésben 0,8 %-os szarvasmarha szérum albumint (bovine serum albumin, BSA) és halbőr-zselatint (cold water fish skin gelatin, CWFS) tartalmazó másodlagos blokkoló oldatban tartottuk őket 30 percig. A másodlagos antitestet ebben a blokkoló oldatban oldottuk fel és adtuk a metszetekhez, majd ebben történt az inkubálás 4 fokon egy éjszakán át. A kolloidális immunarany jelöléshez használt, 0,8 nm átmérőjű arany szemcsével konjugált szekunder antitestek (valamennyi esetben 1:50-ben hígítva) a következők voltak: 1. fejezet: kecske anti-nyúl IgG (DGL- α felismerésére), illetve kecske anti-tengerimalac IgG (CB₁ megjelenítésére). 2. fejezet: kecske anti-nyúl IgG. 3. fejezet: kecske anti-nyúl IgG; kecske anti-tengerimalac IgG. A másodlagos ellenanyagok után két mosási lépés következett TBS pufferben, majd 1%

glutáraldehidet tartalmazó TBS oldatban 10 percig tartó utófixálás után alapos többszöri mosási lépéseket végeztünk (2 x TBS puffer, 3 x PB puffer). Végül a koloidális aranyzemcsék ezüst intenzifikálását az Aurion R-GENT SE-EM Kit segítségével végeztük el a kit leírásában található protokollt követve.

4. In situ hibridizációval kombinált immunhisztokémia

A kombinált in situ hibridizáció-immunhisztokémiai jelölés esetén a metszeteken először az in situ hibridizáció protokollját végeztük el, mert ez a reakció a célpont mRNS molekulák gyors lebomlása miatt sokkal érzékenyebb. A DGL- α enzimet kódoló mRNS jelenlétét a korábbi alfejezetben leírt kísérleti lépésekben teszteltük. Az utolsó lépésben a ribopróbába beépített digoxigenin-címke elsődleges ellenanyagához kötött alkalikus foszfatáz enzim által katalizált színreakció jelezte egy adott sejtben a DGL- α mRNS lokalizációját. A színreakció leállítása után alapos mosás következett 0,1 M PB pufferben. Ezután az adott interneurontípus (parvalbumin-pozitív sejtek és szomatosztatin-pozitív sejtek) beazonosítása érdekében az adott interneuron neurokémiai markerét felismerő antitestekkel egy második immunreakciót végeztünk el a hippocampusz metszeteken. A metszeteket alaposan átmostuk PB-vel, majd ezután a többi reakciólépés 0,05 M-os TBS pufferoldatban (pH=7,4) történt. A metszeteket 5%-os normál kecske szérummal blokkoltuk 1 órán keresztül, majd az adott neurokémiai markert felismerő elsődleges antitesttel inkubáltuk 4°C-on 48 órán keresztül. Az alábbi primer antitesteket használtuk: monoklonális egér anti-parvalbumin IgG (1:2000, Swant), illetve monoklonális patkány anti-somatostatin IgG (Millipore; 1:200). A immunreakciók sikerességét alátámasztotta, hogy a kapott immunfestésben látott interneuronok hippocampális rétegek közötti eloszlása (részletesen lásd az Eredmények fejezetben) megegyezett a szakirodalomból jól ismert jellegzetes eloszlási mintázatokkal (Freund and Buzsáki, 1996). Az immunreakció folyamatának a specifikusságát pedig az igazolta, hogy az elsődleges antitestet nem tartalmazó kontroll kísérleti reakcióban készült hippocampusz metszeteken nem voltak immunjelölt sejtek megfigyelhetőek. Az elsődleges ellenanyagok inkubációját több mosási lépés követte TBS pufferben, majd a metszeteket a szekunder antitestekkel inkubáltuk szobahőmérsékleten 2 órán keresztül. A másodlagos ellenanyagok az alábbiak voltak: biotinizált ló anti-egér IgG (1:300), illetve biotinizált ló anti-patkány IgG (1:500, Vector). Ezután ismét mosások TBS pufferben, majd az avidin-biotinizált tormaperoxidáz

enzim komplex inkubációja következett (1:500, Elite-ABC, 1,5 órán át). Végül újabb intenzív mosási lépések után a színreakció előhívását a Vector NovaRED Peroxidase Substrate Kit-tel végeztük, amelynek eredményeként a peroxidáz reakció végterméke egy vörösesbarna színű csapadék lett. Mivel ez a csapadék vízben oldódik, ezért a metszetek lefedésére egy nem-vizes fázisú lefedő médiumot (VectaMount, Vector) használtunk.

5. Elektronmikroszkópia

Az elektronmikroszkópos vizsgálatokra szánt immunperoxidáz és immunarany eljárással készített hippokampusz és VTA metszeteket epoxi műgyantába (Durcupan, ACM, Fluka, Svájc) ágyasztuk be. Az immunjel előhívását követően a metszeteket 0,1 M PB-ben oldott 0,5-1%-os ozmium tetroxiddal (O_3O_4) kezeltük 15-20 percig, ezután felszálló alkoholsorban, majd acetonitrillel dehidráltuk, végül egy frissen elkészített folyékony epoxi műgyantakeverékbe (Durcupan, ACM, Fluka, Svájc) helyeztük. A dehidráálás során a metszetek egy 20 perces 70%-os etanolban oldott 1%-os uranil-acetáttal való kezelésen is átestek. A metszeteket egy éjszakán keresztül tartottuk Durcupanban szobahőmérsékleten, majd tárgylemezre helyeztük és fedőlemezzel lefedtük. Ezután a metszetekbe penetrált Durcupan-t 56°C -on polimerizáltattuk 48 órán keresztül. Beágyazás után fénymikroszkópban kiválasztottuk az elektronmikroszkóppal később általunk vizsgálni kívánt célterületeket és azokat egy ultramikrotómos metszésre optimalizált alakú Durcupan-blokkba átágyasztuk. Az átágyazott metszetekből Leica Reichert ultramikrotómmal 60 nm vékony sorozatmetszeteket készítettünk. Az elektronmikroszkópos analízisre alkalmas ultravékony metszeteinket Formvar hárttyával borított rézgridekre vettük fel, ólom-citráttal kontrasztoltuk és végül a mintákat egy Hitachi 7100 elektronmikroszkópban (Tokyo, Japan) kielemeztük.

6. DGL- α enzim eloszlásának kvantitatív analízise

Ahhoz, hogy megállapítsuk a DGL- α enzim szinapszisokhoz viszonyított sejten belüli elhelyezkedését a piramissejtek tüskéiben, mennyiségi analízist végeztünk három állatból származó, összesen 300 immunarany-jelölt dendrittüske vizsgálata alapján. Az elektronmikroszkópos analízishez a minták a hippokampusz CA1 régiójának stratum radiatum rétegéből származtak. Mivel az antitestek szövetbeli penetrációjának hatékonysága a metszet belseje felé csökken, ezért mindig a felső 5-10 μm -ről származó

ultramikrotómos metszetekből végeztük az analízist. Annak érdekében, hogy össze tudjuk hasonlítani a DGL- α eloszlását a plazmamembrán mentén a dendrittüskék fejében a metabotróp glutamát receptor 5-ös altípusának (mGluR₅) korábban már publikált eloszlásával, Lujan és kollégáinak módszerét követtük (Lujan et al., 1996, 1997). Először lemértük a dendrittüskékben található és a DGL- α enzim pozícióját jelző aranyszemcsék távolságát az adott tüskére érkező serkentő szinapszis posztszinaptikus denzitásának széléhez viszonyítva. Az ezüst-intenzifikált aranyszemcsék mérete változó, ezért a szemcse közepének a távolságát a szinapszis szélétől (0. pozíció) mértük a plazmamembrán mentén haladva, majd a kapott távolságértékeket 60 nm-es egységekre bontva ábrázoltuk. A három állatból származó mintákból mért adatokat Kruskal-Wallis nem-parametrikus statisztikai eljárással hasonlítottuk össze és az adatokat a tapasztalati szórással (standard deviation, SD) együtt ábrázoltuk. Mivel a három állatból származó minták szignifikánsan nem különböztek egymástól, ezért az adatokat összevontuk és úgy ábrázoltuk, hogy az adott egységben levő aranyszemcsék százalékát az összes aranyszemcséhez viszonyítottuk. Az intraszinaptikus régiót szintén 60 nm-es binekre bontottuk és a szinapszis szélét jelző 0. pozícióhoz képesti negatív értékekkel jelöltük. Mivel a szinapszisok általában a dendrittüskék fejének közepén helyezkednek el és mivel a PSD jelenlétét használtuk a szinapszis azonosítására, ezért a véletlenszerűen elmetszett dendrittüske profilokban a szinapszis és a környékén lévő membránszakaszok felülreprezentáltak lesznek. Ennek kiküszöbölésére egy független kontroll elemzésben lemértük 100-100 véletlenszerűen kiválasztott dendrittüske teljes membránszakaszának hosszúságát három állatban. Ezzel a méréssel kiszámoltuk, hogy egy adott 60 nm-es bin egység mekkora valószínűséggel található meg a mintánkban és valóban kiderült, hogy a szinapszis közeli membránszakasz egységek felülreprezentáltak. Ezért egy második analízisben az aranyszemcsék adott binekre jellemző előfordulási gyakoriságának értékeit normalizáltuk az adott membránszakasz binjének az előfordulási valószínűségi értékére.

Ahhoz, hogy megállapítsuk a DGL- α enzim szinapszishoz viszonyított sejten belüli elhelyezkedését a GABAerg interneuronokban a tüskétlen dendritágakra, illetve a hosszúkás filopodiális tüskékre érkező aszimmetrikus szinapszisok esetében szintén Lujan és kollégái módszerét követve mennyiségi analízist végeztünk a kettős jelölt metszeteken a fent leírt módon. Az immunarany jelet a parvalbumin-tartalmú interneuronok esetében a CA1 régió stratum radiatum rétegében, az mGluR1a-tartalmú

interneuronok esetében pedig a CA1 régió stratum oriens rétegében kerestük. Két állatból vettük a mintákat. Mivel a keresett interneuron profilok ritkák, a DGL- α szintje interneuronokban nagyon alacsony és az aranyszemcsék célelem jelölési valószínűsége kettős festésekben szuboptimális, ezért 25-25 aranyszemcsét számoltunk le, amelyek 214 dendritág, illetve 182 filopodiális tüske profilokból származtak. Az analízishez az elektronmikroszkópos felvételek 50,000 X-es nagyításban készültek. A távolságmérések elemzésére az Analysis és Statistica szoftvereket használtuk (Olympus, Tokyo, Japán).

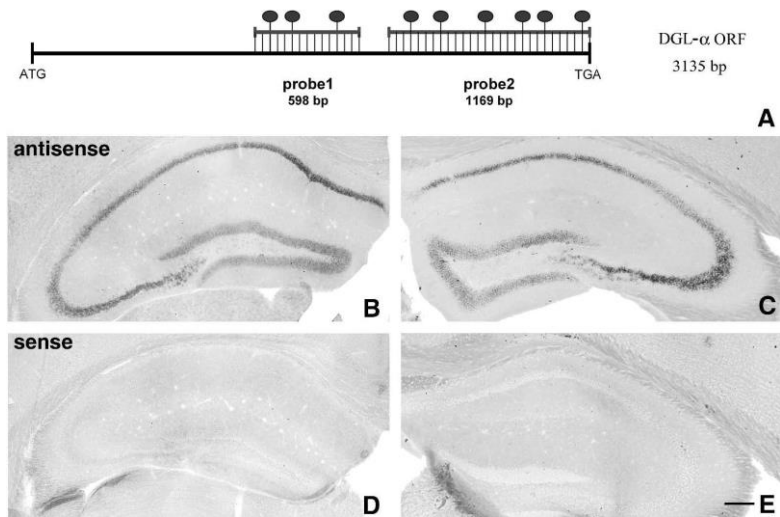
V. EREDMÉNYEK

1. Az endokannabinoid rendszer vizsgálata a hippokampusz serkentő sejtjeiben

1.1 A DGL- α enzim expressziója és fehérje szintű eloszlása a hippokampuszban

Az idegrendszerben a 2-AG a legnagyobb mennyiségben előforduló endokannabinoid. A kutatási programunk kezdetekor a sok potenciális jelölt között a DGL- α szerin-hidroláz is felmerült, mint az egyik lehetséges 2-AG szintetizáló enzim (Bisogno et al., 2003). Ezért első lépésként kíváncsiak voltunk, hogy vajon a DGL- α enzimet kódoló *dagla* gén az idegrendszerben milyen sejtokban van bekapcsolva. A DGL- α expressziójának megállapítására szabadon úszó hippokampusz metszeteken in situ hibridizációs technikát alkalmaztunk. A hibridizációs reakciót a DGL- α mRNS celluláris lokalizációjának vizsgálatára két, egymással nem átfedő, 598 bázispár, illetve 1169 bázispár hosszúságú szakasza ellen tervezett digoxigeninnel jelölt ribopróbával végeztük és nem-radioaktív, alkalikus foszfatáz-alapú színreakcióval tettük láthatóvá (**6A. ábra**). A két független ribopróba az egér előagy és ezen belül a hippokampusz területén teljes mértékben megegyező eloszlási mintázatot mutatott (**6B,C. ábra**). Ezzel szemben a komplementer szekvencia ellen tervezett negatív kontroll próbával (sense ribopróba) végzett in situ hibridizáció nem adott jelölést, bizonyítva az eljárás specifikusságát (**6D,E. ábra**).

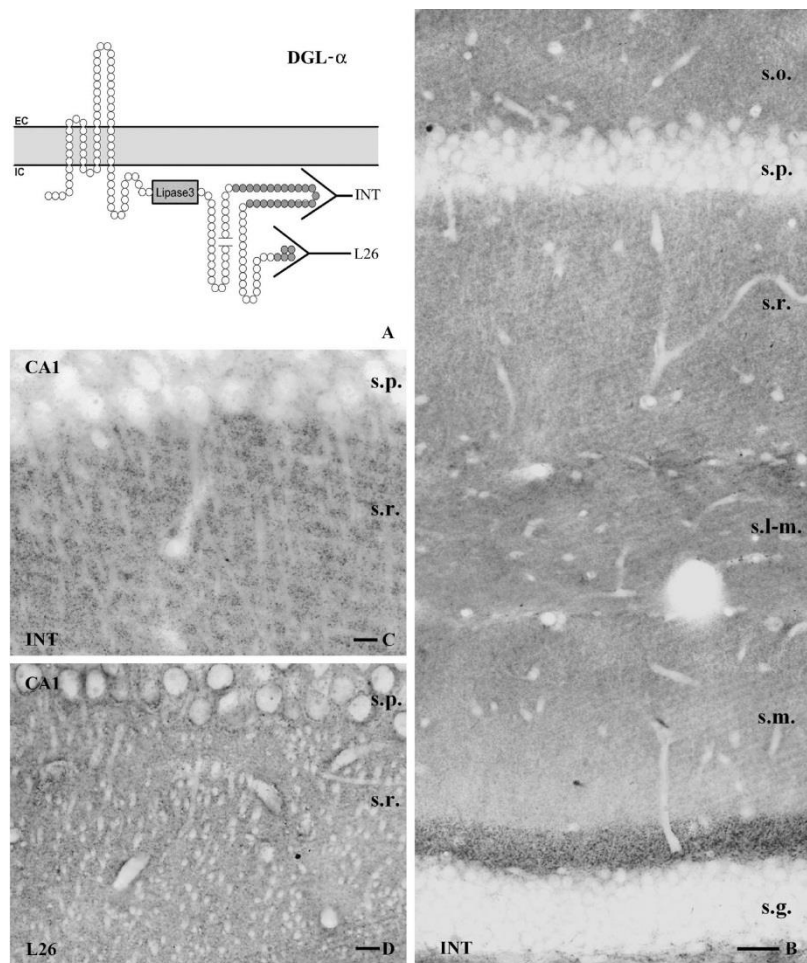
A legerősebb DGL- α expresszió a hippokampuszban volt megfigyelhető, ahol a principális sejtek sejttestjei jelölődtek (**6B,C. ábra**). A piramissejtek sejttestjei a CA1 és CA3 régióban mindig erőteljesebb színreakciót mutattak a gyrus dentatus szemcsesejtjeinél. A hilusban is megfigyelhető volt néhány gyengébben jelölt sejt, amelyek feltételezéseink szerint mohasejtek lehetnek, mivel a GABAerg interneuronok és a gliasejtek más rétegekben és régiókban ebben az első kísérletben nem bizonyultak DGL- α pozitívnak. Itt kell azonban megjegyezni azt, hogy az in situ hibridizációs jel erősségét nagyon sokféle tényező befolyásolja például a hibridizációs hőmérséklet, illetve a hibridizáció időtartama. A kísérletek során úgy választottuk meg a fent említett paramétereket, hogy a háttérjelölődés mértéke minél kisebb legyen, ami viszont lecsökkentette a jelölés érzékenységét. A kísérletek alapján azt azonban mindenképpen kijelenthetjük, hogy a DGL- α mRNS expressziós szintje a serkentő glutamáterg principális sejtokban nagyon magas.



6. ábra: A hippocampusban a DGL- α mRNA-t a principális sejtek termelik a legnagyobb mértékben. (A) A két antisense ribopróba kötési helyének sematikus ábrája az egér DGL- α enzim mRNA szekvenciáján. A DGL- α enzim mRNA nyitott leolvasási keretének (Open Reading Frame-ORF) hosszúsága 3135 bázispár. Az ATG a leolvasás kezdetét jelző ún. start kodont, a TGA pedig a leolvasás végét jelentő ún. stop kodont jelöli. A digoxigeninnel jelölt ribopróbák hossza az 1. ribopróba esetén (probe1): 598 bázispár, a 2. ribopróba esetén (probe2) 1169 bázispár. Az ábrán látható, hogy a ribopróbák között nincsenek egymással átfedő szakaszok. (B, C) A két antisense (pozitív) ribopróbával végzett in situ hibridizációt követően a hippocampusról készült fénymikroszkópos felvételeken jól látszik a principális sejtek erőteljes jelölődése. A B ábrán látható festés az 1-es ribopróbával, míg a C ábrán látható a 2-es ribopróbával készült. Az enzim mRNA-ének expressziós szintje nagyon erős a hippocampus CA1 és CA3 piramisisejtjeiben, valamivel gyengébben jelöltek a gyrus dentatus szemcsesejtjei. Fontos megjegyezni, hogy mindkét ribopróbával végzett kísérlet ugyanazt a festési mintázatot eredményezte. (D, E) Az in situ hibridizációs reakció specificitását jól mutatja, hogy a kontroll (sense) próbával végzett festés nem adott jelölést. Skála: 200 μ m (B-E).

1.2 A DGL- α enzim posztszinaptikusan helyezkedik el a principális sejtek dendrittüskéire érkező serkentő szinapszisokban

A következő kísérletekben célul tűztük ki, hogy feltárjuk a DGL- α enzimfehérje pontos szubcelluláris eloszlását a hippocampális principális sejtekben. Mivel ekkor még nem állt rendelkezésre DGL- α knockout egér az immunfestések validálására, ezért két, független epitópok ellen termeltett antitesttel (ab-INT és ab-L26) végeztük az immunfestést, az immunreakciót pedig DAB csapadékkal tettük láthatóvá. A DGL- α enzim négy transzmembrán régióval rendelkező fehérje (Bisogno et al., 2003). Az antitestek az enzim C-terminálisának két, egymással nem átfedő, intracellulárisan elhelyezkedő része ellen készültek. Az ab-INT antitest a DGL- α enzim egy hosszabb intramolekuláris részét, míg az L26 antitest az enzim utolsó 26 aminosavból álló részét ismerte fel (7A. ábra).



7. ábra: A DGL- α fehérje eloszlása az egér hippocampusban. **(A)** A DGL- α enzim sematikus szerkezete. A rajzon jól látható, hogy az enzim négy transzmembrán régiót tartalmaz. Az enzim N-terminálisa és a hosszú C-terminálisa is a sejtben belül (intracell-IC) helyezkedik el és az utóbbi egy, az enzimaktivásért felelős lipáz3 (Lipase3) régiót tartalmaz. Az Y alakú rajzok a C-terminális két, egymással nem átfedő szakaszát felismerő antitesteket reprezentálják. Az INT antitest epitópja 118 aminosav hosszúságú, az L26 antitest a C-terminális utolsó 26 aminosavjához kötődik. **(B)** A DGL- α immunfestés térbeli elhelyezkedése jól mutatja a hippocampusz serkentő pályákkal összefüggésben álló réteges szerkezetét. A legerősebb jelölés a gyrus dentatus régió molekuláris rétegének (s.m.) belső harmadában figyelhető meg. A jelölés sűrűsége a stratum radiatum (s.r.) és oriensben (s.o.) is erőteljes, míg a stratum lacunosum moleculare (s.l-m.) sokkal gyengébb jelölődést mutat. A piramis sejtek sejttestjeinek rétege (s.p.) és a szemcsesejtek rétege gyengén jelölt. **(C,D)** Az L26-os antitesttel készült immunfestés hasonló szemcsés jelölési mintázatot mutat, mint az INT-antitesttel készült, csak gyengébb az immunjel erőssége. Nagyobb nagyításon jól látható az immunfestés hiánya a piramis sejtek dendritágaiban és a szemcsés jelölés a dendritek között, ami a fehérje szelektív felhalmozódására utal egy szubcelluláris kompartmentumban. Skála: 50 μ m (B,C); 20 μ m (D,E).

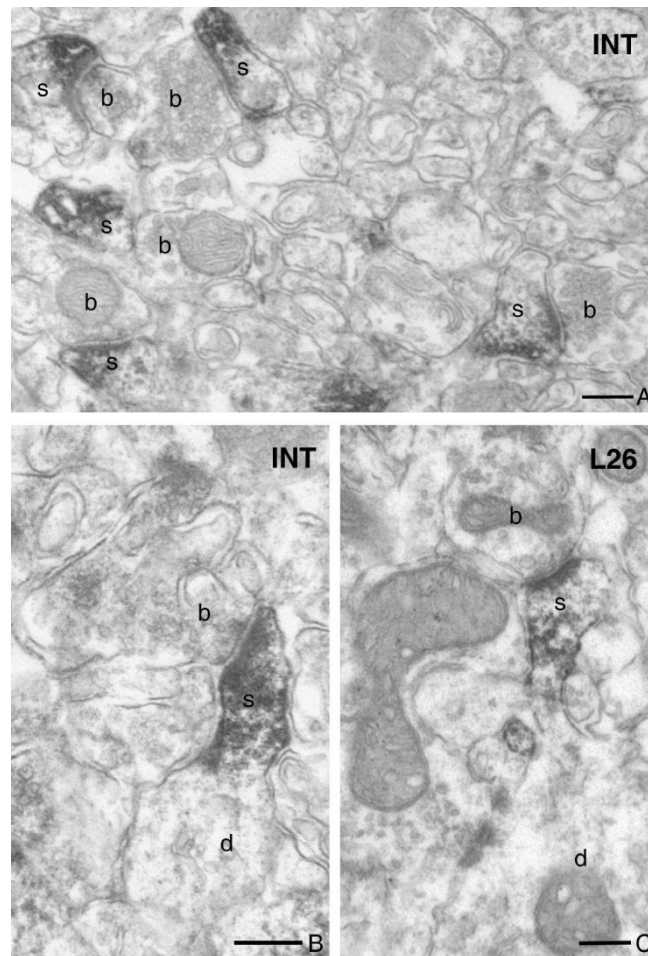
A két antitesttel kapott immunjelölés mintázata nagyon hasonló volt, bár az ab-INT antitesttel végzett immunreakció erősebb jelölési intenzitást eredményezett **(7B-D. ábra)**. Az immunfestés kis nagyításon a hippocampusz rétegzett szerkezetének megfelelő mintázatot adott. Ez a mintázat tükrözi a glutamaterg rostok eloszlását és összhangban van az in situ hibridizációs eredményekkel, amelyek feltárták a DGL- α magas expressziós szintjét a principális sejtekben. Különösen erős volt a DGL- α immunjel a stratum oriens

és stratum radiatum rétegekben és a stratum moleculare belső harmadában a mohasejtek terminációs zónájában.

Az immunfestés karakterisztikus mintázata nagyobb nagyításban vált láthatóvá (**7C,D. ábra**). A DGL- α -immunreaktivitás jól láthatóan gyenge volt vagy teljesen hiányzott a sejtestekből és a főbb dendritágakból. Ezzel szemben a dendritek közötti neuropilben jellegzetes sűrű, szemcsés immunjelet lehetett megfigyelni. A DGL- α -immunreaktivitás hasonló mintázatot mutatott a szomszédos agykérgi területeken is. Ez a különleges kompartmentalizált immunfestési mintázat, amely ráadásul makroszkóposan követte a glutamáterg pályák lefutását arra utalt, hogy a DGL- α feltehetően szelektíven koncentrálódik a serkentő szinapszisok környékén. Mivel az DGL- α mRNS-t a glutamáterg sejtekben figyeltük meg, ezért a szinapszisok mellett található asztrocita végtalpak valószínűleg kizárhatóak magyarázatként, ugyanakkor a fénymikroszkópos felbontás nem volt elegendő annak a kérdésnek az eldöntésére, hogy a DGL- α preszinaptikus vagy posztszinaptikus enzim.

Mivel a kísérletek idején már ismert volt, hogy a DGL- α a 2-AG endokannabinoidot szintetizálhatja, ugyanakkor vita volt arról, hogy az endokannabinoidok közvetlen retrográd szinaptikus hírvivők vagy pedig közvetett módon az idegvégződéseken autokrin módon szabályozzák a neurotranszmitter felszabadulást, ezért következő célunk az volt, hogy megállapítsuk DGL- α pontos sejten belüli lokalizációját elektronmikroszkópos analízis segítségével (**8. ábra**). Ez a kísérlet egy nagyon érdekes megfigyelést eredményezett. Már az első felvételeken jól látszott, hogy a DGL- α pozícióját jelző DAB csapadék kizárólag a principális sejtek dendrittüskéiben található a hippocampusz CA1 stratum oriens rétegéből vett mintákban (**8A. ábra**). Habár a diffúzibilis DAB csapadék a nanoskálájú eloszlási vizsgálatokra nem alkalmas, de a főbb szubcelluláris mikrodomének elkülönítését lehetővé teszi. Azokon a nagy nagyítású elektronmikroszkópos felvételeken, amelyeken a metszés síkjában egy dendritág, a belőle kinyúló tüskenyak és tüskefej egyaránt benne volt, jól látszott, hogy a DAB jel a dendritágakra nem terjed ki, hanem az enzim a tüskék fejében posztszinaptikusan koncentrálódik (**8B,C. ábra**). A DGL- α enzimet tartalmazó tüskéken DGL- α immunnegatív aszimmetrikus szinapszist formáló axonterminálisok végződtek.

Ez a megfigyelés arra utalt, hogy a DGL- α lehet a szinaptikus endokannabinoid kiindulási pontja és az általa termelt 2-AG retrográd úton éri el a preszinaptikus CB₁ receptorokat.



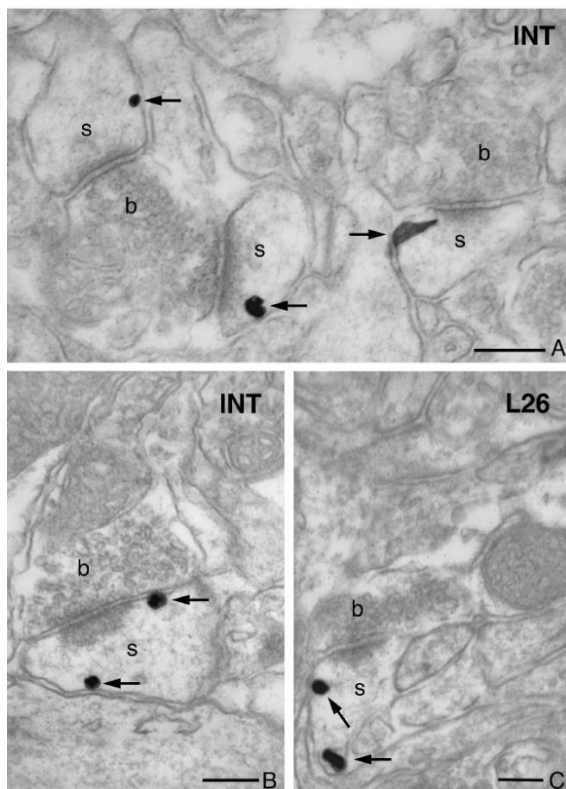
8. ábra A DGL- α immunjel a hippocampusból vett mintákban a dendrittüskék fejében koncentrálódik. **(A-C)**. A DGL- α immunfestésről készített nagy nagyítású elektronmikroszkópos felvételeken jól látszik, hogy az immunperoxidáz-reakció végterméke, a DAB által láthatóvá tett DGL- α poszt-szinaptikusan helyezkedik el a dendrittüskék fejében (spine, s). Ezek a dendrittüskék jelöletlen idegvégződésektől (bouton, b) kaptak aszimmetrikus szinapszisokat. **(B-C)**. A tangenciális tüskemetszetekről készült felvételeken a tüskefej mellett a tüskenyak és a hozzátartozó dendrit (d) is jól látható. Ezek az ábrákon megfigyelhető, hogy a DGL- α immunjel a tüskék fejében koncentrálódik. Ezek a tüskék is kapnak aszimmetrikus szinapszisokat olyan idegvégződésektől (b), amelyek az immunjelet nem tartalmazzák. A két különböző antitest jelölési mintázata nagyon hasonló, megerősítve ezzel az immunfestések specificitását. Skála: 0,2 μ m (A-C).

DGL- α -immunreaktivitást a poszt-szinaptikus dendrittüskékben mind a két független antitest segítségével megfigyeltünk. Ugyanakkor számos optimalizálási lépés ellenére mégsem láttunk az összes tüskében jelölést. Elektronmikroszkópos vizsgálataink alapján a stratum oriensből, illetve a stratum radiatum-ból véletlenszerűen vett minták mindegyikében az immunjelölt tüskék aránya mindkét antitest esetében valamivel 50% felett volt. Elképzelhető, hogy egyes tüskék nem tartalmaznak DGL- α enzimet, de az is

lehet, hogy a DGL- α -negatív tüskékben az enzim koncentrációja az adott antitesttel a kimutatási határ alatt volt.

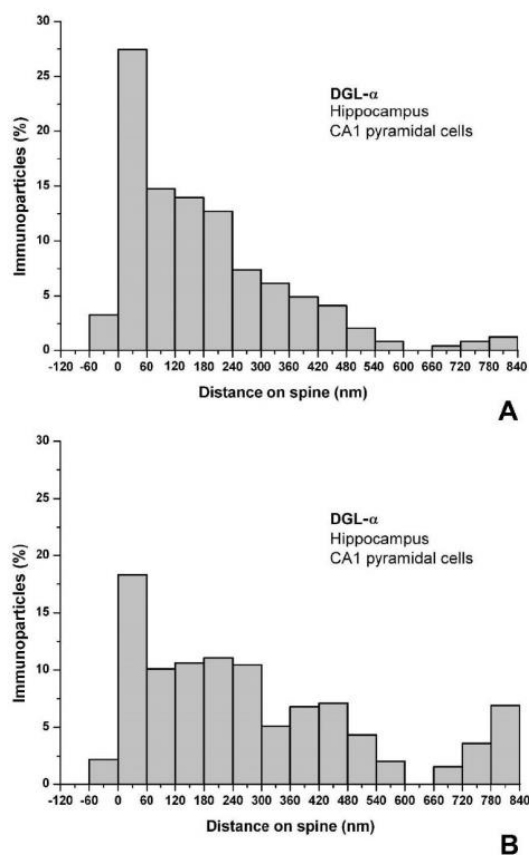
1.3 A DGL- α enzim periszinaptikus elhelyezkedése a principális sejtek dendrittüskéiben levő posztszinaptikus denzitás körül

A dendrittüskék kis méretük ellenére meglepően összetett szerkezetűek. A tüskefejen belül a mikrodomének különböznek molekuláris felépítésükben és funkcionális jelentőségükben például a szinaptikus átvitelben és plaszticitásban játszott szerepükben (összefoglalásként lásd Rácz és Weinberg, 2013). Annak megállapítására, hogy az enzim az adott dendrittüskén belül pontosan hol helyezkedik el, beágyazás előtti immunarany technikát alkalmaztunk. Az immunarany technika is megerősítette azt a megfigyelést, hogy a DGL- α enzim kizárólag a dendrittüskék fejében található (9. ábra). Az arany szemcsék a tüskefejen mindig belülről kapcsolódtak a plazmamembránhoz. Ez a mintázat összhangban van azzal, hogy a DGL- α enzim egy transzmembrán fehérje és C-terminális része, amelyen az antitestek epitópjai találhatóak mindig intracellulárisan, a plazmamembránon belül helyezkedik el (9A. ábra).



9. ábra A DGL- α enzim szubcelluláris lokalizációja. (A-C) Az immunarany jelölés a DGL- α jelenlétét mutatja. Mindhárom elektronmikroszkópos felvételen jól láthatóak a dendrittüskékben (s) posztszinaptikusan elhelyezkedő arany szemcsék (nyilak) és az immunjelet tartalmazó tüskékkel aszimmetrikus szinapszist formáló idegvégződés (b) is. A felvételek a hippocampusz CA1 stratum radiatum rétegéből vett mintákon készültek. Az arany szemcsék a plazmamembránhoz belülről kapcsolódnak, utalva ezzel az enzim transzmembrán pozíciójára és a C-terminális sejten belüli elhelyezkedésére. Skála: 200 μ m (A-C).

A DGL- α enzim szubcelluláris elhelyezkedésének kvantitatív jellemzésére megmértük a dendrittüskékben található arany szemcsék távolságát az adott tüskére érkező serkentő szinapszistól, pontosabban a posztzinaptikus denzitás szélétől a CA1 stratum radiatum területéről véletlenszerűen választott mintákban (**10. ábra**).



10. ábra A DGL- α enzim eloszlása a túskefejekben. (**A,B**) Az arany szemcsék térbeli elhelyezkedése megmutatja a DGL- α enzim pozícióját a CA1 piramis sejtek túskefejeiben a stratum radiatum rétegében. Az arany szemcsé szinapszis szélétől (0. hely) való távolságának mérését a plazmamembrán mentén végeztük el és a távolságadatokat 60 nm-es egységekre osztottuk fel. A diagram az adott membrán szakaszban levő immunarany szemcsék előfordulási gyakoriságát ábrázolja, az adott mintában a túskefékben talált összes arany szemcsé számához viszonyítva (**A**) és a membrán szakaszok előfordulási valószínűségére normalizálva (**B**). A negatív értékek az intraszinaptikus régiót jelentik. Jól látszik, hogy a DGL- α legnagyobb mennyiségben a szinapszist körülvevő periszinaptikus gyűrűben fordul elő és ritkán található intraszinaptikusan.

Mivel a serkentő szinapszisokban a 2-AG szintézisét az mGluR₅ receptor indítja be, ezért méréseink során ugyanazokat a kiértékelési elveket használtuk (**részletesen lásd 10. ábra aláírása**), amelyek a mGluR₅ receptor túskefékben levő elhelyezkedésének vizsgálatában Lujan és munkatársai (Lujan et al. 1996, 1997). Ez az analízis nagyon érdekes eredményre vezetett. Kiderült, hogy az arany szemcsék legnagyobb sűrűségben a szinapszis szélétől számított első 60 nm-es egységben voltak megtalálhatóak. Az arany szemcsék mennyisége a szinapszis szélétől távolodva egyre csökkent, a DGL- α enzim nagy része a szinapszis szélétől számított 300 nm-en belül volt. Nagyon kevés arany szemcsét találtunk a szinapszison belül. Ez a periszinaptikus eloszlási mintázat tökéletesen megegyezik az mGluR₅ szubcelluláris eloszlási mintázatával (Lujan et al. 1996, 1997). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a retrográd szinaptikus

endokannabinoid jelpálya megindításáért felelős, a 2-AG szintézisében kulcsszerepet játszó molekuláris alkotóelemek a szinapszis körül lévő periszinaptikus gyűrűben fordulnak elő és felvetődik a lehetősége, hogy ezek a fehérjék egy makromolekuláris komplex, az ún. perszinaptikus masina (PSM) részeiként összehangoltan működhetnek.

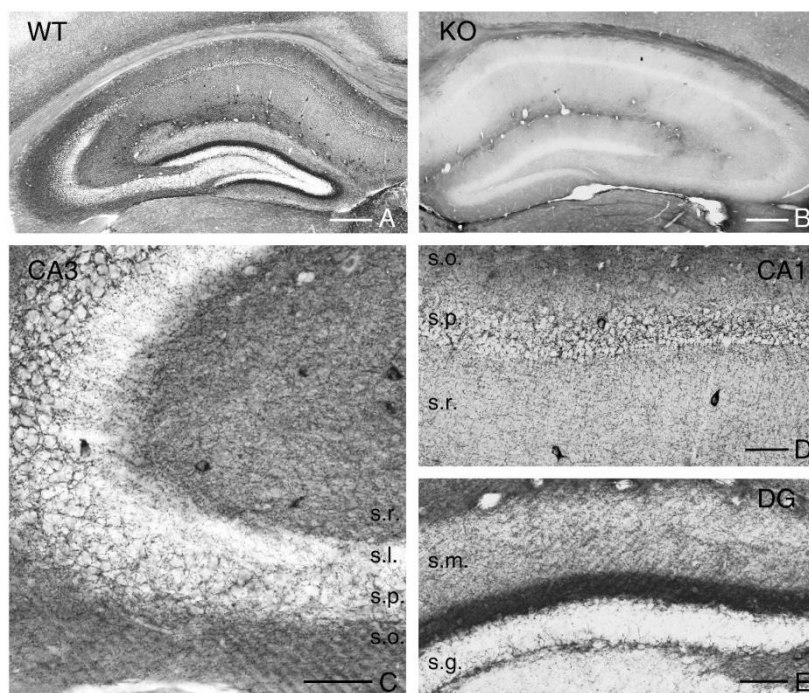
1.4 A CB₁ receptor preszinaptikus elhelyezkedése a principális sejtekre érkező a glutamáterg axonterminálisokban

Mivel a 2-AG legfőbb szintetizáló enzime a DGL- α , ezért logikus volt azt feltételezni, hogy az enzimet tartalmazó dendrittűskékre érkező serkentő szinapszisokban vagy ezek környékén megtalálható a CB₁ receptor is, mint a 2-AG fő receptora. Azonban számos korábbi tanulmány, amelyben az első generációs CB₁ ellen készült antitesteket használták, kizárólag a GABAerg idegvégződéseken tapasztalta a receptor jelenlétét (például lásd Katona et al., 1999). Ezért a következő kísérleteinkben egy olyan poliklonális antitestet teszteltünk, hogy alkalmas-e alacsonyabb kópiaszámban előforduló CB₁ receptorok felismerésére más idegvégződéseken is, amely a receptor C-terminálisának egy jóval hosszabb szakaszát ismerte fel és ráadásul tengerimalacban készült, amelyben gyakran könnyebb magasabb titert elérni (Fukudome et al., 2004).

Első lépésben CB₁ KO egereken teszteltük az új antitest specificitását. A CB₁ pontos lokalizációjának megállapítására immunfestést végeztünk és az immunreakciót DAB csapadékkal tettük láthatóvá (**11. ábra**). Vad típusú egerekben a tengerimalacban készült elsődleges CB₁ ellenanyag az általunk használt minden eddigi antitest között a legerősebb és legkarakterisztikusabb festési mintázatot mutatta, amelynek az eloszlása jól követte a serkentő pályák térbeli elrendeződését (**11A. ábra**). Ha a vad típusú és a KO állatokból készült metszeteken végzett immunfestést összehasonlítjuk, jól látható, hogy a KO állatban hiányzik ez a rétegzett CB₁-immunreaktivitási mintázat (**11A,B. ábra**), amely alátámasztja a CB₁ antitest specificitását.

A legerősebb jelölés a gyrus dentatus belső molekuláris rétegében volt látható (**11A,E. ábra**). Itt végződnek a glutamáterg mohasejtek axonjai és a supramammiláris pálya vGluT₂-pozitív axonterminálisai (Halasy et al., 2004). Szintén erős CB₁-immunreaktivitást tapasztaltunk a hippocampusz CA1 és CA3 régiójának stratum radiatum és stratum oriens rétegeiben, ahol a nagy GABAerg rostok mellett a neuropilben

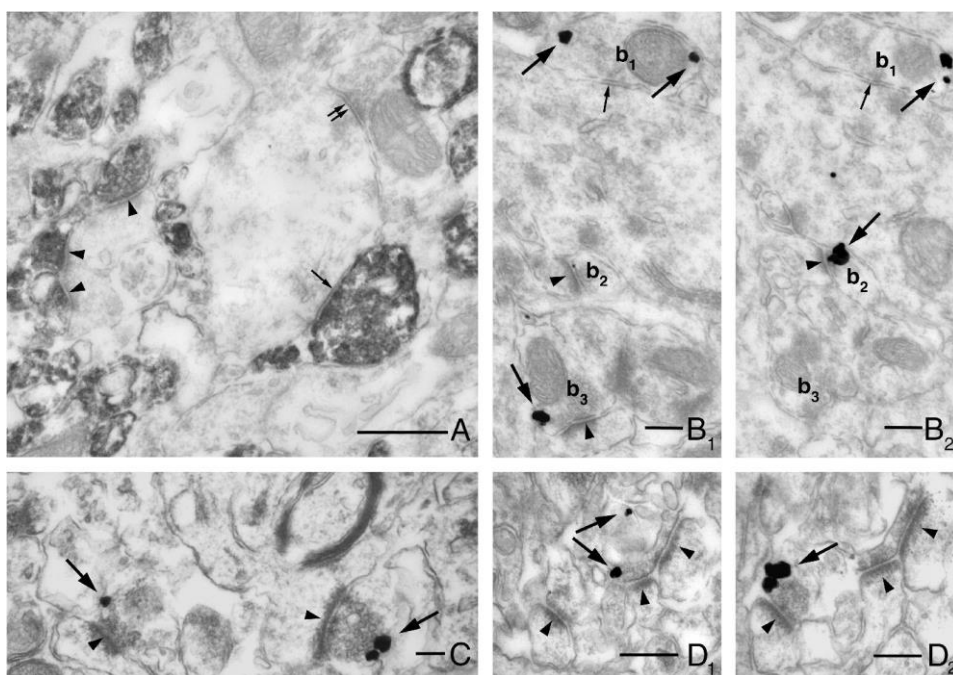
sűrű szemcsés mintázat volt megfigyelhető (11A,D. ábra). Szembetűnő volt ennek a szemcsés immunjelnek a hiánya a CA3 régió stratum lucidum rétegében (11C. ábra). Nagyobb nagyításban néhány CB₁-immunpozitív GABAerg interneuron sejtestje is látható volt, amelyeknek jellegzetes kosár-szerű axonfelhője a CA3 és CA1 régiók piramisrétegében arborizált (11C, D. ábra).



11. ábra A peroxidáz-alapú immunhisztokémiai reakcióról készült fénymikroszkópos felvételek erős CB₁-immunjelölést mutatnak a vad típusú egér hippocampusában, míg ez a jelölési mintázat a KO állatból származó mintában teljesen hiányzik. (A) A CB₁-immunjel vad típusú állatban (WT) megfigyelt eloszlása jól követi a hippocampusz serkentő pályáinak térbeli elrendeződését. (B) A CB₁-génkiütött állatban (KO) hiányzik az immunjel, ami megerősíti az általunk használt antitest specificitását. (C) A CA3 régióról készült nagyobb nagyítású felvételen jól látszik az erős neuropil jelölés a stratum radiatum (s.r.) és stratum oriens (s.o.) rétegekben és ez erős kontrasztot képez a stratum lucidum (s.l.) réteggel (s.l.), ahol a gyrus dentatus szemcsesejtjeinek terminálisai végződnek. Ezen a nagyításon jól megfigyelhető a piramisrétegben arborizáló (s.p.) néhány CB₁-pozitív interneuron is. (D) A CA1 régióról készült nagyobb nagyítású felvételen gyengébb neuropil jelölés látható néhány, CB₁-pozitív interneuronnal együtt. (E) A gyrus dentatusban (DG) a legerősebb jelölés a molekuláris réteg (s.m.) belső egyharmadában figyelhető meg, ahova elsősorban a hiláris mohasejtek és a supramammiláris pálya axonjai vetítenek. Skála: 300 μm (A-B); 50 μm (C); 75 μm (D, E).

A serkentő pályák lefutását követő fénymikroszkópos mintázat felvetette a lehetőséget, hogy a CB₁ receptorok a glutamáterg idegvégződéseken is jelen vannak, ezért a hippocampuszmintákon elektromikroszkópos vizsgálatot is végeztünk (12. ábra). A gyrus dentatus molekuláris rétegének belső harmadából származó mintákon jól látható volt az aszimmetrikus szinapszist képező axonterminálisokban nagy mennyiségben felhalmozódó DAB csapadék. A serkentő szinapszisok mellett megfigyelhetőek

szimmetrikus szinapszist képző, gátló terminálisok is (**12A. ábra**). Hogy megállapítsuk a CB₁ pontos szubcelluláris lokalizációját immunarany jelölést is végeztünk, amelyben az arany szemcsék túlnyomó többsége (~90%) plazmamembrán belső felületéhez kapcsolódott (**12B. ábra**). A CA3 és CA1 régiókban is sok glutamaterg és GABAerg idegvégződésen találtunk preszinaptikus CB₁ receptorokat (**12C,D. ábra**).

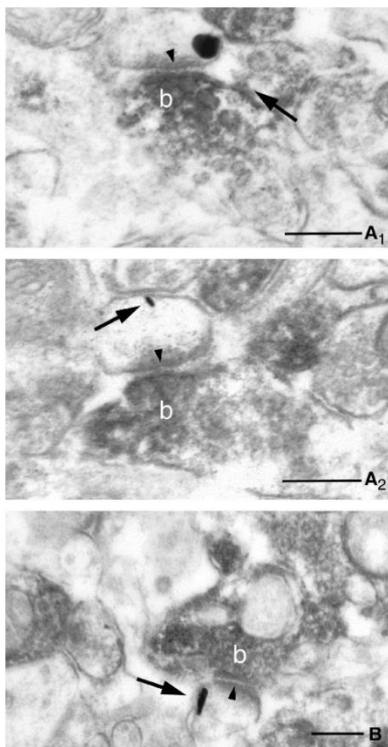


12. ábra A CB₁ receptor preszinaptikus elhelyezkedése a hippocampusz glutamaterg és GABAerg axonterminálisain. (A) Erős CB₁-immunpozitív jelölés figyelhető meg a gyrus dentatus molekuláris rétegének belső harmadából származó minták elektronmikroszkópos felvételén. Az ábrán két típusú, CB₁ receptort tartalmazó axonterminális is jól megfigyelhető. Serkentő axonterminálisok, amelyek aszimmetrikus szinapszist képeznek (nyílhegyek jelölik) és egy gátló, szimmetrikus szinapszist képző axonterminális (nyíl jelölik). Az ábrán látható még egy CB₁-immunnegatív gátló terminális is (kettős nyíl jelöli). (B-D) A nagy érzékenységű immunarany jelölés jól mutatja, hogy a CB₁ receptor az axonterminálisokban (b, b1-b3) preszinaptikusan helyezkedik el. Az arany szemcsék membránkötött és sejten belüli helyzete az antitest C-terminális építőjének helyzetével összhangban van. Az elektronmikroszkópos felvételek a CA3 molekuláris rétegéből (B1, B2- sorozatmetszetek), a CA3 stratum oriens rétegéből (C) és a CA1 stratum radiatum rétegéből vett mintákon (D) készültek. A vastag nyilak az immunarany szemcséket jelölik, a nyílfejek a serkentő szinapszisokra, míg a vékony nyilak a gátló szinapszisokra mutatnak. Skála: A, 0,5 µm; B-D, 0,2 µm.

1.5 A posztzinaptikus DGL- α enzim és a preszinaptikus CB₁ receptor együttes előfordulása a serkentő szinapszisokban

Mivel sem a DGL- α -, sem a CB₁-immunfestés nem jelölte az összes glutamaterg szinapszist az elektronmikroszkópos mintákban, ezért az egyszeres immunjelölésből nem volt megállapítható, hogy a 2-AG jelpálya molekuláris szerveződése homoszinaptikus vagy heteroszínaptikus jelátviteli folyamatokat támogat-e. Ezért kettős immunjelölést

alkalmaztunk, amelyben a DGL- α enzimet immunarany technikával tettük láthatóvá, a CB₁ receptor lokalizációját pedig immunperoxidáz technikával vizsgáltuk. A hippokampusz mindhárom fő régiójában elvégzett elektronmikroszkópos analízis bizonyította, hogy megtalálható ugyanabban a serkentő szinapszisban a DGL- α enzim posztszinaptikusan, a CB₁ receptor pedig preszinaptikusan (**13. ábra**).



13. ábra Posztszinaptikus DGL- α enzim és preszinaptikus CB₁ receptor együttes előfordulása glutamaterg serkentő szinapszisokban. (A-C) Nagy nagyítású elektronmikroszkópos felvételeken jól megfigyelhető, hogy a 2-AG endokannabinoidot szintetizáló DGL- α enzim és a CB₁ kannabinoid receptor ugyanabban a serkentő szinapszisban, de a szinapszis két ellentétes oldalán találhatóak meg. A túskefejekre érkező aszimmetrikus szinapszisokat formáló serkentő axonterminálisokat nyílfejek jelölik. A nyilakkal jelölt arany szemcse a posztszinaptikus DGL- α enzim sejten belüli elhelyezkedését, míg a denz DAB-csapadék a boutonokban (b) a CB₁ receptor preszinaptikus jelenlétét mutatja. Skála: 0,2 μ m (A-B).

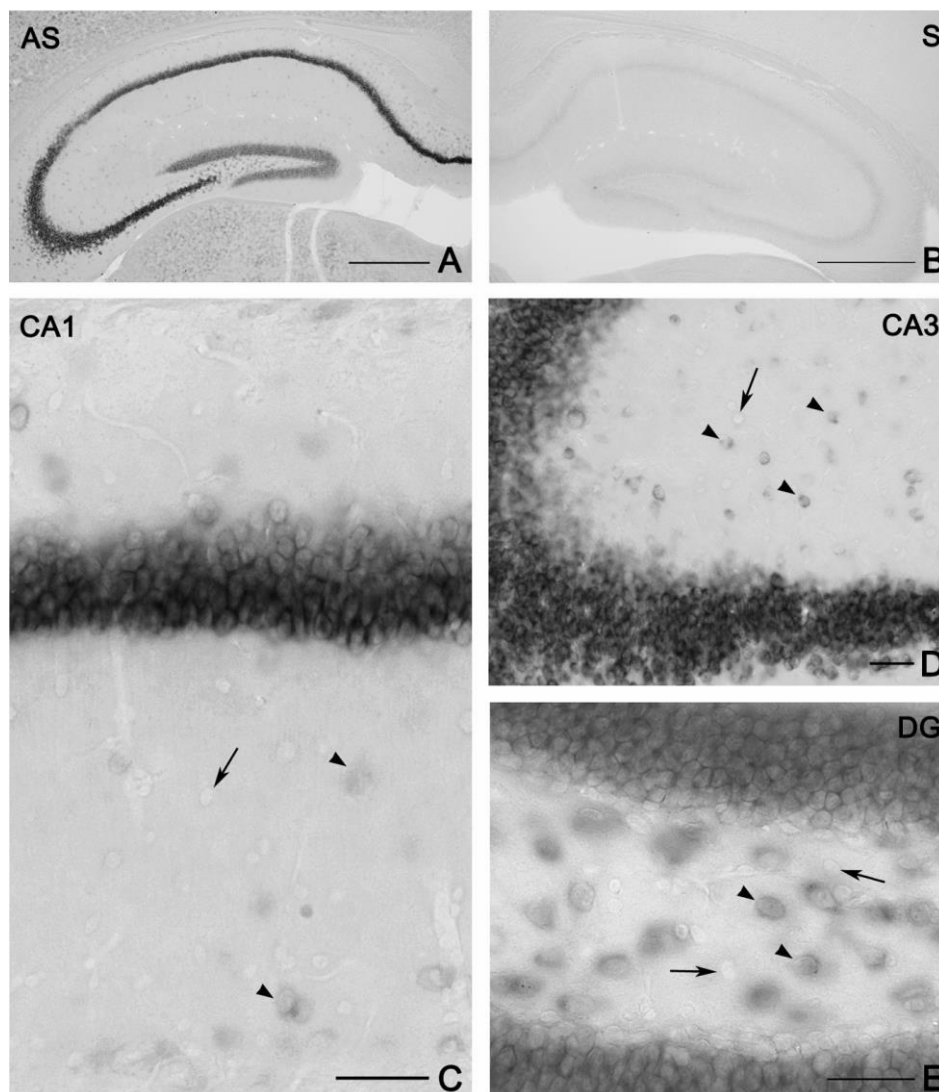
2. Az endokannabinoid rendszer vizsgálata a hippokampusz GABAerg sejtjeiben

2.1 A DGL- α enzim eloszlása a hippokampusz gátló interneuronjaiban

Az előző fejezetben bemutatott kísérletekben csak a principális sejtekre érkező glutamaterg szinapszisokban vizsgáltuk céltartan a 2-AG jelpálya molekuláris alkotóelemeit. Ennek egyik oka az volt, hogy az in situ hibridizációs kísérleteinkben nem tapasztaltunk olyan jelölési mintázatot, amely a DGL- α jelenlétére utalt volna hippokampális GABAerg interneuronokban. Ugyanakkor tisztában voltunk vele, hogy az mRNS jel hiánya a gátlósejtben a detekciós érzékenységünk limitációját is jelentheti és nem lehet kizárni, hogy a DGL- α enzim alacsonyabb mennyiségben ugyan, de az interneuronokban is megtalálható. Ez két szempontból lényeges kérdés. Egyrészt fontos tisztázni, hogy vajon a 2-AG jelpálya szelektíven a hippokampális neuronhálózatoknak csak bizonyos celluláris elemeiben játszik-e szerepet a szinaptikus plaszticitásban vagy

pedig az általunk leírt molekuláris szerveződés egy általános tulajdonsága a glutamáterg szinapszisoknak? Másrészt az alacsonyabb mRNS szint utalhat arra is, hogy a neuronhálózatok sejttípus-specifikus módon optimalizálják a 2-AG jelpálya indukciós küszöbét és hatékonyságát a jelmolekulák mennyiségének szabályozásával.

Ezért, hogy megvizsgáljuk, vajon a glutamáterg sejtek mellett a hippocampusz GABAerg sejtjei is tartalmazhatnak-e DGL- α enzimet, a következő kísérleteinkben több eljárást is kipróbáltunk az in situ hibridizációs technika detekciós érzékenységének növelésére. Számos kísérleti paraméter, például a hibridizációs lépés hőmérsékletének csökkentése, az időtartamának növelése, az alkalmazott ribopróbák koncentrációjának emelése, a mosási lépések rövidítése és a színreakció idejének elnyújtása jelentősen javíthatja a in situ hibridizációs jelölés érzékenységét. Ezeknek a paramétereknek a megváltoztatásával sikerült kimutatnunk, hogy a hippocampuszban a GABAerg interneuronok is termelnek alacsony mennyiségben DGL- α enzimet (**14. ábra**). A módosított in situ hibridizációs kísérletekben az alábbi fénymikroszkópos megfigyeléseket tettük. Korábbi eredményeinkkel megegyezően a DGL- α mRNS expressziós szintje a CA1 és a CA3 régió principális sejtjeiben, valamint a subiculumban volt a legmagasabb (**14A,C,D. ábra**). Valamivel kisebb volt a jelölés intenzitása a CA2 réteg piramisesejtjeiben és a gyrus dentatus szemcsesejtjeiben (**14A,E. ábra**). A hilusban is találhatóak erősebben jelölődött sejtek, amik a nagy méretű sejttestjeik, elhelyezkedésük és jelölődési intenzitásuk alapján elsősorban valószínűleg mohasejtek. (**14E. ábra**). A reakció érzékenységének növelésével ugyanakkor több, gyengén jelölt, valószínűsíthetően GABAerg interneuron is láthatóvá vált. Ezek az elszórtan elhelyezkedő, halványan DGL- α -pozitív sejtek legnagyobb mennyiségben a CA3 stratum radiatum rétegében fordultak elő (**14D. ábra**), de megfigyeltük ezeket a sejteket a CA1 és CA3 régió stratum oriens rétegében is, illetve a stratum lacunosum-moleculare réteg határán egyaránt (**14C,D. ábra**). Valószínűleg a gyrus dentatus hilusában a mohasejtek mellett DGL- α -pozitív interneuronok is találhatóak (**14E. ábra**). Ugyanakkor fontos megjegyezni, hogy mind a hilus területén, mind a cornu ammonis területén számos olyan sejt volt megfigyelhető, amelyek még így sem bizonyultak DGL- α -pozitívnak. A reakciókörülmények specifikusságát tesztelő ellenőrző kísérletekben a negatív kontroll próbával (sense próba) nem tapasztaltunk háttérjelölődést (**14B. ábra**). A fenti kísérletek



14. ábra A DGL- α enzim mRNS expressziós szintjének különbsége a hippocampusz glutamáterg principális sejtjeiben és a GABAerg interneuronjaiban. **(A)** Az antisense (pozitív) DGL- α ellen tervezett ribopróbával végzett in situ hibridizáció hippocampuszról készült kis nagyítású fénymikroszkópos felvétele. Az antisense próba jól láthatóan erőteljes jelölést mutat a principális sejtek rétegében, utalva arra, hogy ezek a sejtek nagy mennyiségben tartalmazzák az enzimet. A szemcsesejtek és a CA2 régió piramissejtjei némileg gyengébb jelölődést mutatnak. Ebben a nagyításban is jól látszanak a gyengébben jelölt, principális rétegen kívül elszórtan elhelyezkedő DGL- α -pozitív sejtek. **(B)** A módszer kontrolljaként használt sense ribopróba nem eredményezett jelölt sejteket, bizonyítva ezzel az in situ hibridizációs eljárás specifikusságát. **(C)** A hippocampusz CA1 régiójáról készült nagyobb nagyítású felvételen gyengébben jelölt, valószínűsíthetően GABAerg sejtek figyelhetők meg (nyílhegyekkel jelölve) a stratum oriens és stratum radiatum rétegekben, valamint a strata radiatum-lacunosum moleculare rétegek határán. Bizonyos sejtek nem jelölődtek (nyíllal jelölve), amelyet eredményezhet a kimutatási határnál alacsonyabb DGL- α expressziós szint, de az is lehetséges, hogy ezek a sejtek egyáltalán nem tartalmazzák az enzimet. **(D)** Sok DGL- α pozitív interneuron (nyílfejjel jelölve) figyelhető meg a CA3 régió stratum radiatum rétegében is, de itt is megfigyelhetők jelöletlen sejtek (nyíllal jelölve). **(E)** A hilusban található jelölt sejtek lehetnek GABAerg interneuronok, illetve glutamáterg mohasejtek is. A nyílhegyek a DGL- α pozitív sejteket, míg a nyilak a DGL- α negatív sejteket jelölik. Skála: 500 μ m (A-B); 50 μ m (C-E).

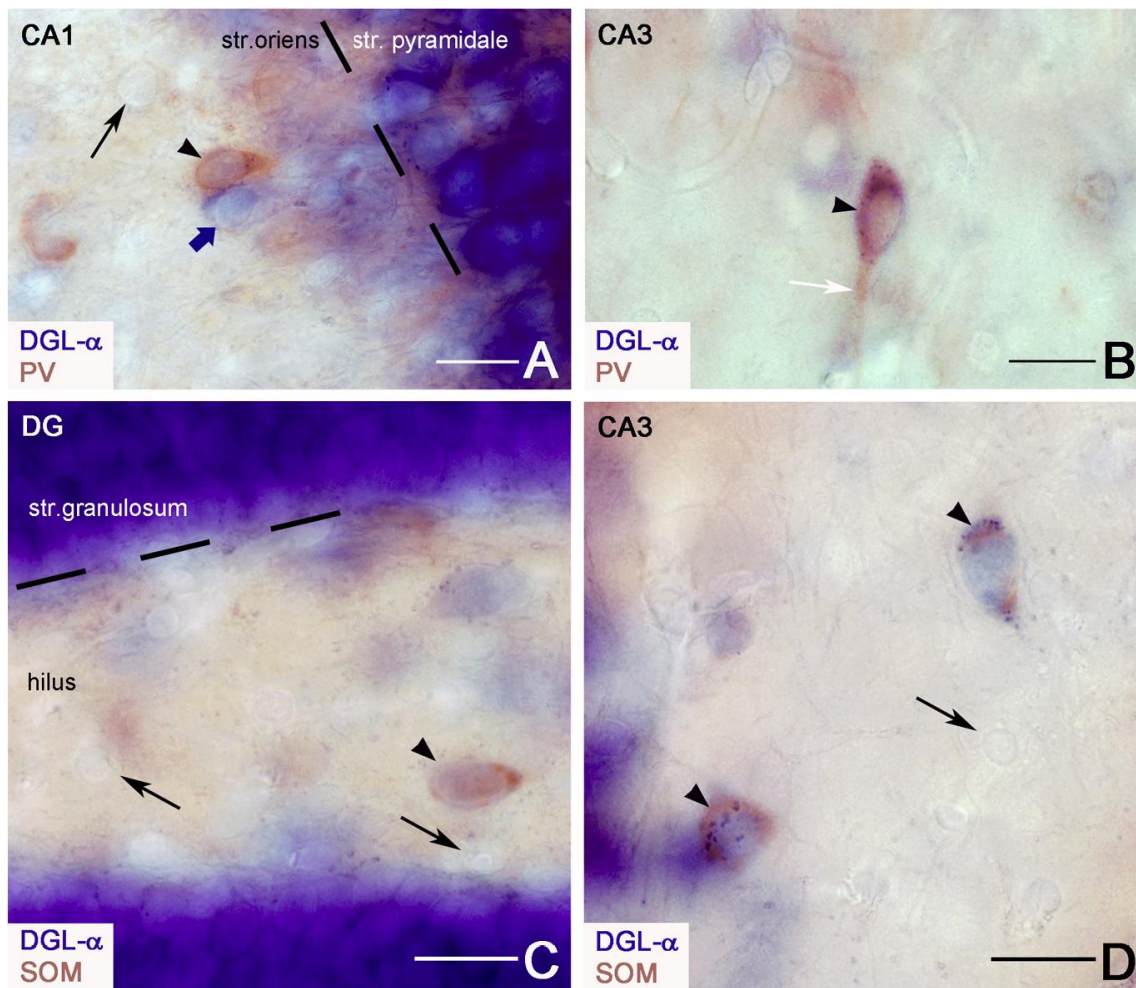
alapján tehát levonható az a következtetés, hogy a principális sejteken kívül más sejtek is tartalmazzák a DGL- α enzim mRNS-ét, de sokkal kisebb koncentrációban, valamint felhívják a figyelmet, hogy adott reakciókörülmények között a jelölődés hiánya nem feltétlenül jelenti a vizsgált célelemnek a valós hiányát.

2.2 A DGL- α mRNS expressziója hippocampális parvalbumin-pozitív és szomatosztatin-pozitív GABAerg interneuronokban

Az elszórtan elhelyezkedő DGL- α -pozitív sejtek a kapott eloszlási mintázat alapján feltételezhetően GABAerg interneuronok, de fontos volt közvetlen bizonyítékokkal is alátámasztani ezt a feltételezést. Ezért a következő kísérletekben az in situ hibridizációs technikát immunfestéssel kombináltuk, amely egyben lehetőséget adott arra is, hogy néhány sejtet beazonosítsunk, hogy milyen interneurontípusba tartoznak.

A GABAerg interneuronoknak sokféle típusa van és az osztályozásukra használható neurokémiai markerek száma is magas. Korábbi kísérleteinkben igazoltuk, hogy a DGL- α a fősejtek dendrittüskéire érkező serkentő szinapszisokban található. Ezért ebből kiindulva két interneuron populációt választottunk ki a további vizsgálatokhoz. Az egyik interneuron típust azért vizsgáltuk, mert nincsenek dendrittüskéi, de ennek ellenére mégis ennek a sejtípusnak a dendritfájára érkezik a hippocampusz interneuronjai közül az egyik legtöbb serkentő bemenet (Gulyás et al., 1999). Ezeknek az interneuronoknak a neurokémiai markere a parvalbumin. A másik kiválasztott populáció is nagy mennyiségű serkentő szinapszist kap, ráadásul ezek a bemenetek a sejtek dendritjeiből kinyúló tüskeszerű nyúlványaikra érkeznek. Ez a tüskés sejtpopuláció nagy mennyiségben termel szomatosztatint (Maccaferri et al. 2000; Klausberger és Somogyi, 2008). A parvalbumin-immunreaktív sejtek sejttestjei nagyrészt a principális sejtek rétegében voltak megfigyelhetőek, de kisebb számban előfordultak a stratum oriens és stratum radiatum rétegekben is (**15A,B. ábra**). Szomatosztatin-immunreaktív sejteket a gyrus dentatus hilusában, valamint a CA3 stratum lucidum és CA3/CA1 régiók stratum oriens rétegeiben találtunk a korábbi irodalmi adatokkal összhangban (Freund és Buzsáki, 1996) (**15C,D. ábra**). Figyelemre méltó módon a hippocampusz teljes területén magas volt a DGL- α -t tartalmazó interneuronok aránya. Két állatban a CA1 régió területén vizsgált 58 parvalbumin-pozitív sejttest minden esetben expresszált DGL- α mRNS-t. A vizsgált 59 szomatosztatin-immunreaktív interneuronból pedig 58 esetében érte el DGL- α

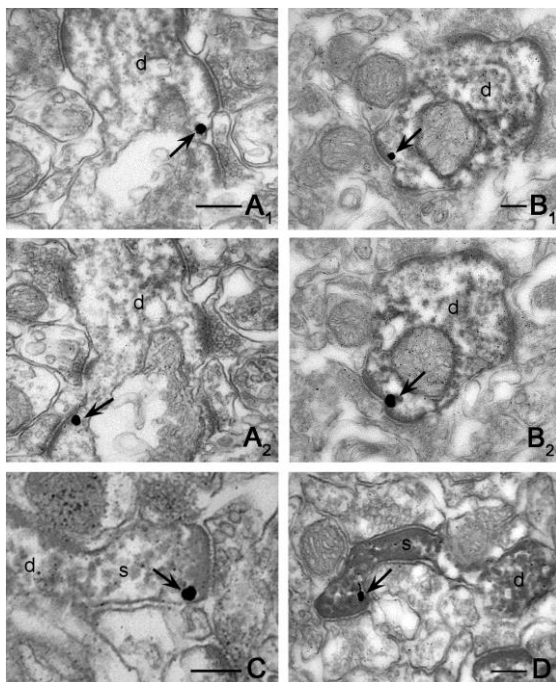
expresszióját igazoló in situ hibridizációs jelölés a detekciós küszöböt. A kontroll reakciókban, amelyek során nem adtunk a metszetekhez antitestet vagy hibridizációs ribopróbát, értelemszerűen nem láttunk kolokalizációt sem. Bár az interneuron típusok nagyon heterogének, de ezek a kísérletek igazolták, hogy legalább a fenti két neurokémiai markerrel jelölhető GABAerg sejt típusokban termelődik DGL- α mRNS-e.



15. ábra A hippocampusz parvalbumin-pozitív és szomatosztatin-pozitív sejtjei termelik a DGL- α enzimet kódoló mRNS-t. (A-E) Két festési eljárás, az in situ hibridizáció és az immunhisztokémia kombinálásával kimutatható, hogy az általunk kiválasztott neurokémiai markereket tartalmazó interneuronok expresszálják a DGL- α enzimet. Az immunperoxidáz reakció vörösesbarna végterméke (NovaRED) az adott markerre pozitív interneuronokat, a kék alkalikus foszfatáz reakció végterméke pedig a DGL- α -pozitív sejteket jelöli. A nyílfejek a kolokalizált sejteket mutatják, nyilakkal pedig azokat a sejteket jelöltük amelyek kettős negatívak mind az adott interneuron markerre, mind a DGL- α -ra. (A-B) A neurokémiai marker a parvalbumin (PV) volt. A nagyobb nagyítású felvételek a CA1 piramis és az oriens réteg határáról (A) illetve a CA3 oriens rétegeből származnak. Bár itt csak a hippocampusz egy kis részlete látszik, szinte az összes interneuron kolokalizált DGL- α -val. (C-D) A neurokémiai marker a szomatosztatin (SOM) volt. A nagyobb nagyítású felvételek a CA1 oriens rétegeből (C), illetve a CA3 oriens rétegeből származnak. Skála: 20 μ m (A-D).

2.3 A DGL- α enzim periszinaptikusan helyezkedik el az interneuronok afferens serkentő szinapszisaiban

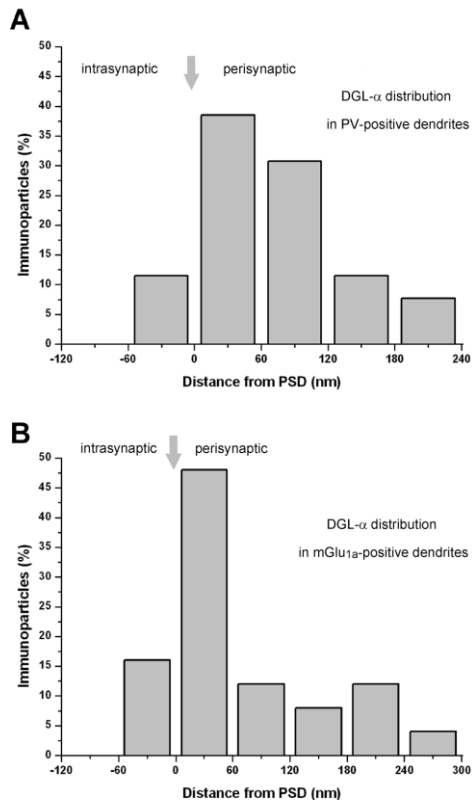
Annak érdekében, hogy megállapíthassuk a DGL- α enzimfehérje jelenlétét és pontos szubcelluláris lokalizációját az adott interneuron típusokban, kettős immunjelölést alkalmaztunk. Az adott interneuron marker elleni antitest beazonosítására az immunreakciót DAB csapadékkal tettük láthatóvá. A DGL- α enzim elleni antitest esetében immunarany technikát alkalmaztunk. Mivel a szomatosztatin csak a sejttesteket és az axonfelhőt jelöli, ezért helyette egy másik markert, a szomatodendritikusan előforduló az mGluR_{1a}-t választottuk. Ez a receptor szintén megtalálható ebben az tüskéket tartalmazó interneuron populációban. A szomatosztatinnal ellentétben ez egy transzmembrán fehérje, így immunjele a plazmamembránok mentén várható és nagy mennyiségben megtalálható a tüskékben is (Baude et al., 1993). Mindkét interneuron típus esetében jól látható, hogy a DGL- α enzim helyét jelölő aranyszemcse a plazmamembrán mentén intracellulárisan helyezkedik el, jól mutatva az antitest epitópjának sejten belüli elhelyezkedését (**16. ábra**). A hippocampális piramisisejteknel megfigyeltekhez hasonlóan az enzim az interneuronokban is általában periszinaptikusan helyezkedett el (**16. ábra**). Az elektronenz DAB csapadék igazolta, hogy a vizsgált dendritek a CA1 régió stratum radiatum rétegében a parvalbumin-pozitív interneuronokhoz tartoztak. Ezek az idegsejtek nagy sűrűségben kapnak glutamáterg serkentő bemeneteket a tüskétlen dendritágaikra, amelyek a jellegzetes aszimmetrikus szinapszisokról könnyen felismerhetők voltak (**16A. ábra**). Az mGluR_{1a}-pozitív, fénymikroszkóppal is jól láthatóan sok tüskével rendelkező dendritok pedig a CA1 régió oriens rétegében voltak nagy számban megfigyelhetők (**16C,D. ábra**).



16. ábra A DGL- α enzim poszt-szinaptikus elhelyezkedése az interneuron dendritekre és tüskékre érkező serkentő szinapszisok mentén. (A-B) Nagy felbontású elektronmikroszkópos felvételek amelyek a DGL- α enzim és a

parvalbumin kolokalizációját mutatják. Az immunarany jel a DGL- α enzim helyét jelöli (nyilakkal jelölve) az adott dendritben (d). Jól látható az enzim sejten belüli és membránhoz kötött elhelyezkedése. Megfigyelhető, hogy az arany szemcse periszinaptikusan helyezkedik el. Az immunperoxidáz reakció fekete csapadéka (DAB) a parvalbumin-tartalmú interneuronokat jelöli. A minták, amelyeken az immunfestések készültek, a hippocampusz CA1 régiójának radiatum rétegéből származnak (A1 és A2, valamint B1 és B2 sorozatmetszetek). (C-D) A nagy felbontású elektronmikroszkópos képek a DGL- α enzim és az mGluR_{1a} kolokalizációját mutatják a tüskékkel rendelkező interneuron populációban. A DGL- α enzim az adott dendritágból(d) kinyúló dendrittüskében(s) is megtalálható volt. Az immunperoxidáz reakció fekete csapadéka (DAB) az mGluR_{1a}-tartalmú interneuron profilokat jelöli. Az arany szemcsék elhelyezkedése jól mutatja, hogy az enzim a dendrittüskékben, a sejten belül membránhoz kötött és periszinaptikusan helyezkedik el. A minták, amelyeken az immunfestések készültek, a hippocampusz CA1 régiójának oriens rétegéből származnak. Skála: 200 nm (A-D).

Annak érdekében, hogy minél pontosabban leírjuk a DGL- α enzim szubcelluláris lokalizációját először az immunarany technikával jelölt metszeteken lemértük az arany szemcséknek a serkentő szinapszis poszt-szinaptikus denzitásának széléhez viszonyított távolságát (**17. ábra**). A mérések és a kiértékelések során az előző fejezetben bemutatott, principális sejteknél hasonlóan elvégzett eljárást vettük alapul. Az arany szemcsék távolságát a szinapszis szélétől (0. pozíció) mértük a plazmamembrán mentén haladva és a mért távolságokat 60 nm-es egységekre bontva ábrázoltuk. Az ábrázolt mennyiség az adott egységben levő arany szemcsék százaléka az összes arany szemcséhez viszonyítva. Az eredmények megegyeztek a principális sejteken végzett mérések eredményével. Az arany szemcsék az interneurokra érkező afferens szinapszisokban is leggyakrabban a szinapszis szélétől számított 60 nm-es membránszakaszon koncentráálódtak és az arany szemcsék sűrűsége a szinapszis szélétől távolodva egyre csökkent. Mindkét interneuron típus esetében az arany szemcsék 60%-a az első 120 nm-es periszinaptikus régióban volt megtalálható (**17. ábra**).



17. ábra A DGL- α enzim előfordulása az interneuron denritekre és tüskékre érkező serkentő szinapszisokat körülvevő periszinaptikus gyűrűben (**A-B**) A DGL- α enzimet jelölő arany szemcsék térbeli eloszlása a parvalbumint (**A**), illetve szomatostatint (**B**)

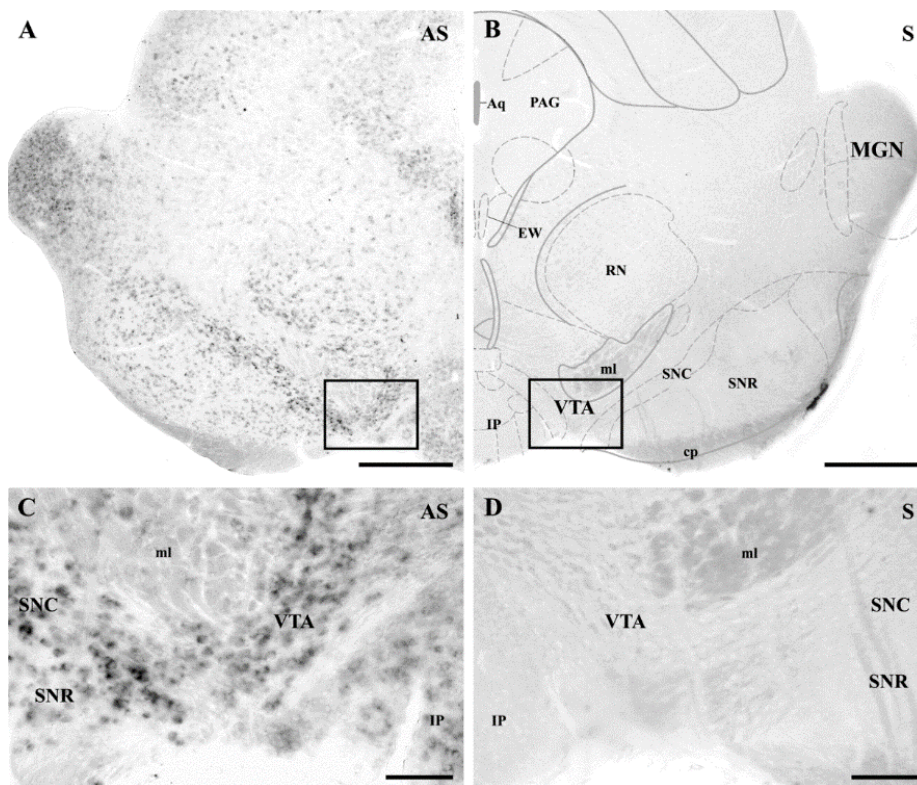
tartalmazó interneuronokra érkező serkentő szinapszisok mentén. Összességében az elektronmikroszkópos analízisek azt mutatják, hogy a parvalbumin-tartalmú tüske nélküli interneuronokra, valamint a mGluR_{1a}/szomatostatint tartalmazó tüskés interneuronokra érkező serkentő szinapszisok posztszinaptikus denzitása körül egy periszinaptikus gyűrűben koncentráldódik a DGL- α . Az arany szemcsé távolságát a posztszinaptikus denzitás szélétől („0” pozíció az X-tengelyen, nyíljal jelölve) mértük a plazmamembrán mentén haladva. A mért távolságot a „0” pozíciótól kezdve 60 nm-es egységekre osztottuk fel. A posztszinaptikus denzitás szélétől mérve a negatív értékek az intraszinaptikus régió felé eső távolságot, míg a pozitív értékek a plazmamembrán mentén az ellentétes irányban elhelyezkedő arany szemcsék távolságát adják meg. A diagramon az adott egységben mért arany szemcsék mennyiségének százalékát ábrázoltuk az adott profilban talált összes arany szemcsé mennyiségéhez viszonyítva (n=25-25; két állat). A minták a hippocampusz CA1 régiójának radiátum rétegéből (**A**), és oriens rétegéből (**B**) származnak. A mérések hasonló eredményt adtak mindkét interneuron típus esetében. Az enzim leginkább a szinapszis mentén egy periszinaptikus gyűrűben koncentráldott, intraszinaptikusan ritkán fordult elő.

3. Az endokannabinoid rendszer vizsgálata a ventral tegmental área (VTA) serkentő és gátló szinapszisaiban

3.1 A DGL- α enzim mRNS expressziója és fehérje szintű kimutatása a VTA-ben

A 2-AG a középagyban a legnagyobb mennyiségben előforduló endokannabinoid molekula (Bisogno et al., 1999). Mi arra voltunk kíváncsiak, hogy a középagy területék közül a VTA-ben, ahol a függőségben is kulcsszerepet játszó dopaminerg sejtek nagy része található milyen a 2-AG-t szintetizáló DGL- α enzim előfordulási mintázata. Másodsorban azt is szeretnénk volna felderíteni, hogy vajon a hippocampusz területén megfigyelt szerveződési alapelvek kiterjeszthetőek-e egy másik agyterületre is. Az enzim expressziójának és fehérje szintű eloszlásának a megállapítására egerből származó

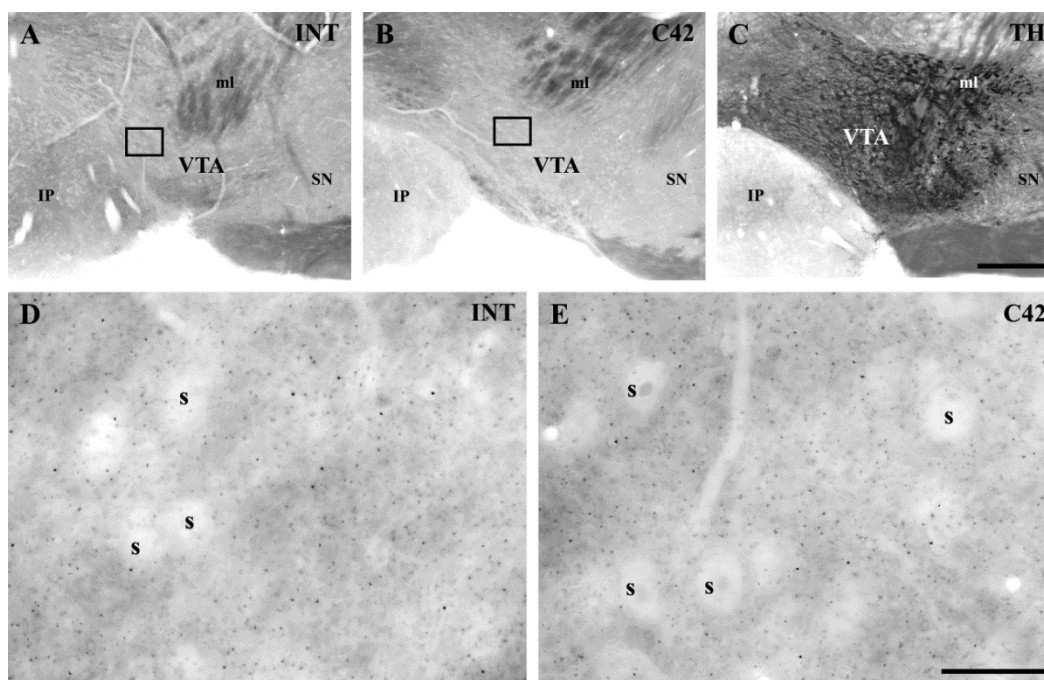
agytörzs metszeteken szabadon úszó *in situ* hibridizációs és immunhisztokémiai technikákat alkalmaztunk. Az *in situ* hibridizációs kísérlet főbb paraméterei megegyeznek az első fejezetben részletesen leírtakkal. Az *in situ* hibridizációs kísérlet viszonylag gyengébb erősségű, de a középgagyból készült metszeteken nagy területre kiterjedő jelölést eredményezett (**18. ábra**). Jól láthatóan azokon a területeken volt legsűrűbb a jelölés (VTA, substantia nigra pars compacta), ahol a dopaminerg sejtek sejtestjei legnagyobb sűrűségben találhatóak meg. A VTA erősségében nem egységes, de sűrű jelölődést mutatott (**18C. ábra**). DGL- α termelő sejtek a középgagy más területein is előfordultak, de általában gyengébben jelölődtek (**18A,C. ábra**).



18. ábra A VTA-ben található idegsejtek nagy része termel DGL- α mRNS-t. (**A,B**) A DGL- α enzim mRNS-hez kötődő antisense (AS) ribopróbával végzett *in situ* hibridizációs reakció után a középgagy sok idegsejtje mutatott jelölődést. Jól megfigyelhető az enzim magasabb expressziós szintje a ventrális középgagy területén (substantia nigra pars compacta, SNC), ventral tegmental area, VTA), ahol a dopamintermelő sejtek találhatóak. A negatív kontrollként alkalmazott sense (S) ribopróba nem adott jelölést, igazolva ezzel a reakció specifikusságát (B). (**C,D**) Az A,B ábrákon bekeretezett területekről készült nagy nagyítású felvételeken jól látszik, hogy a sejtek többsége DGL- α - pozitív.. Rövidítések: Aq, aqueduct; cp, cerebral peduncle, bazális régió; EW, Edinger-Westphal mag; IP, interpeduncular nuclei; MGN, medial geniculate nucleus; ml, lemniscus medialis; PAG, periaqueductal gray nucleus; RN, red nucleus. Skála: 500 μ m (A, B); 100 μ m (C, D).

3.2 A DGL- α enzim posztzinaptikusan helyezkedik el a GABAerg és glutamáterg szinapszisok közelében

Annak érdekében, hogy megállapítsuk a VTA területén a DGL- α pontos celluláris és szubcelluláris elhelyezkedését immunhisztokémiai festéseket végeztünk. Két független, az enzimfehérje eltérő epitópjait felismerő antitestet használtunk (**19A,B,D,E. ábra**). Az egyik antitest megegyezik az előző két fejezetben ismertetett kísérletekben használt „INT” antitesttel, a másik pedig az enzimfehérje C-terminusának utolsó 42 aminosavjához kötődik (Yoshida et al., 2006). VTA önmagában viszonylag nehezen körülhatárolható agyterület, ezért a szomszédos metszeteken tirozin-hidroxiláz (TH) ellen immunperoxidáz reakciót hajtottunk végre (**19C. ábra**). A TH a dopamin szintézisének nélkülözhetetlen enzime, ezért ez a reakciót a dopaminerg sejteket tartalmazó területek feltérképezésére alkalmas.



19. ábra A DGL- α fehérje elhelyezkedése egér VTA-ban (**A,B**). A kísérleteket a DGL- α enzim két különböző, egymással nem átfedő szakasza ellen termeltetett antitesttel végeztük. Az egyik az „INT” antitest, melynek neve arra utal, hogy az antitest az enzim egy nagyobb intracelluláris szakaszát ismeri fel (**A,D**). A másik antitest (C42) a fehérje C-terminusának utolsó 42 aminosavját ismeri fel (**B,E**). A VTA agyterület elhelyezkedését a szomszédos metszeteken tirozin-hidroxiláz (TH) festéssel tettük láthatóvá (**C**). A kisebb nagyítású metszeteken a bekeretezett részekről készültek a nagyobb nagyítású felvételek (**D, E**). A jellegzetes pöttyös festési mintázat csak nagyobb nagyításon volt jól látható. Jól látható, hogy a sejtestek (s) nem jelölődtek. Az, hogy mindkét antitest hasonló festési mintázatot mutatott, utal a reakció specificitására is. Rövidítések: IP, interpeduncularis nuclei; ml, lemniscus medialis; SN, substantia nigra; VTA, ventral tegmental area. Skála: 200 μ m (A, C); 20 μ m (D, E).

Az immunreakciókat DAB csapadékkal tettük láthatóvá. A hippokampuszban megfigyelt mintázathoz hasonlóan a DGL- α enzim esetében mindkét antitesttel végzett immunfestés itt is (kisebb nagyításban ugyan halvány) sűrű szemcsés immunjelölést eredményezett (**19A,B. ábra**), amely azonban nagyobb nagyításban jól kivehető (**19D,E. ábra**). A hippokampuszhoz hasonlóan ezért feltételeztük, hogy a VTA-ban is kompartmentalizált a DGL- α szubcelluláris eloszlása.

A dopaminerg sejtek tüskékkel nem rendelkeznek, ezért serkentő bemeneteik a dendritágakra érkezők. Amint korábban (lásd Eredmények 2. fejezet) kimutattuk, a tüskétlen parvalbumin-immunreaktív hippokampális interneuronok esetében a DGL- α enzim és így az immunjel is a plazmamembránhoz kötött, periszinaptikusan helyezkedett el. Ahhoz, hogy megállapítsuk az enzim sejten belüli lokalizációját, az immunfestések után elektronmikroszkópos analízist végeztünk az adott VTA mintákon (**20A-C. ábra**). Az elektronmikroszkópos elemzéseket ebben a kutatási projektben Dr. Mátyás Ferenc kollégám végezte, és itt azért mutatom be a kapott eredményeket, mert koncepcionálisan szervesen összefüggenek a dolgozat többi részében bemutatott saját eredményeimmel.

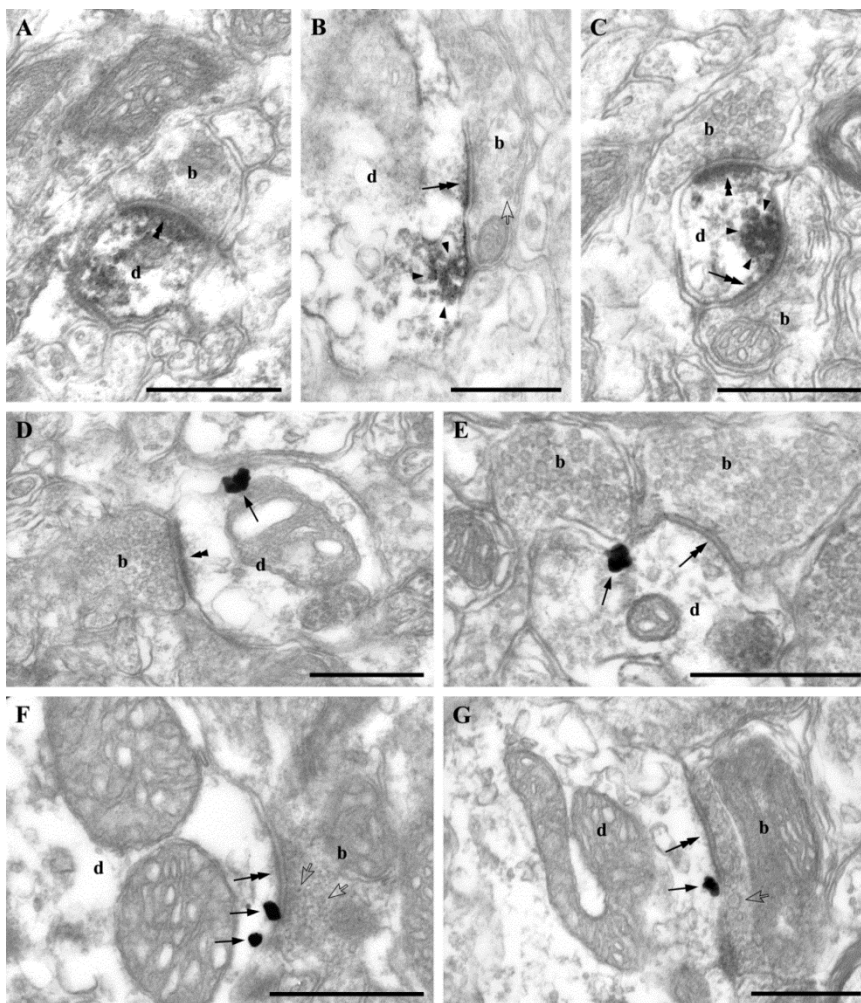
A DGL- α sejten belüli eloszlásával kapcsolatban az elektronmikroszkópos vizsgálat az előző fejezetekben ismertetett hippokampális festési mintázathoz hasonló eredményt mutatott. Érdekes módon a DGL- α membránkötöttségével összhangban még a DAB csapadék is (ami pedig könnyen diffundál) a sejtmembrán közelében és a szimmetrikus, illetve aszimmetrikus szinapszisok szomszédságában volt megtalálható. Mivel az ezüst intenzifikálással kombinált beágyazás előtti immunarany technika pontosabban megmutatja az antigén sejten belüli pontosabb elhelyezkedését, a mintákat immunarany módszerrel is megvizsgáltuk (**20D-G. ábra**). Az arany szemcsék a plazmamembrán belső felszínén helyezkedtek el, az epitóp jószolt helyzetével összhangban.

Azok a szinapszisok, amelyek közelében posztszinaptikus DGL- α enzimet figyeltünk meg, morfológiai jellemzőik alapján három fő típusba voltak oszthatóak:

I. Kicsi, vagy közepes méretű axonterminálisok, bennük sok kicsi és kerek vezikulával szinaptizáltak vékonyabb dendritágakon, a posztszinaptikus denzitás pedig kifejezetten erős volt (**20A,C,D,F. ábra**). Ezeket a szinapszisokat feltételezhetően a VTA kérgi és kéreg alatti glutamáterg serkentő afferensei formálják (Sesack and Pickel, 1992; Carr and Sesack, 2000; Omelchenko and Sesack, 2007).

II. Jellemzően nagy axonterminálisok formálják, bennük sok kicsi, kör alakú, illetve gyakran ovális vezikula fordul elő, de gyakran találhatóak bennük peptid tartalmú, sötétmagvú (dense core) vezikulák is. Általában vastag dendritágakon szinaptizálnak. A posztszinaptikus denzitás szabálytalan alakú és vékony vastagságú (**20B,G. ábra**). Ezek az idegvégződések általában GABA-pozitívak, de előfordul, hogy nem tartalmaznak GABA-t. Feltételezhetjük, hogy ezek a nucleus accumbensben található enkefalin- és dinorfin tartalmú GABAerg medium spiny neuronok axonvégződései (Pickel et al., 1993, Sesack and Pickel, 1992, 1995).

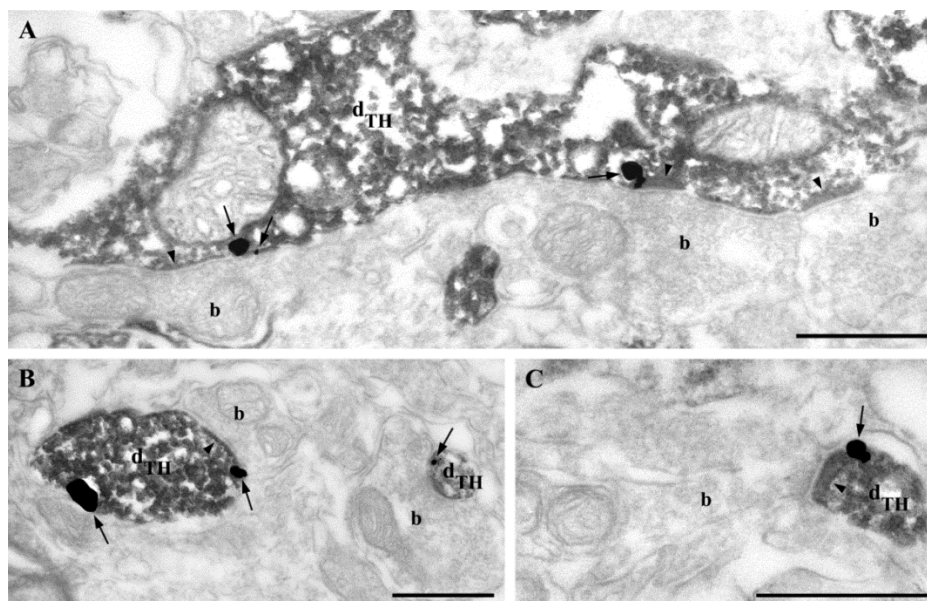
III. Számos bouton szimmetrikus szinapszisokat képzett sejtesteken vagy dendriteken, sok kicsi és lapos vezikulát tartalmaztak, de nagy dense core vezikulát sosem, a posztszinaptikus denzitásuk kevésbé látható. Ezek az idegvégződések valószínűleg a lokális GABA-pozitív interneuronokhoz tartoznak, de számos külső forrásuk is lehet (Bayer and Pickel, 1991).



20. ábra A DGL- α enzim jelenléte posztzinaptikusan a szimmetrikus és aszimmetrikus szinapszisokhoz közeli plazmamembránon. **(A-C)** Az elektronenzim DAB csapadék jelzi a DGL- α jelenlétét mind a vékony (A, C) mind a vastag (B) dendritekben (d) a VTA-ból származó mintákban. A DAB csapadék jól láthatóan membránhoz kötött és a szinapszisokhoz közel helyezkedik el. Az aszimmetrikus szinapszisok (A, C) kettős nyílfejjel, a szimmetrikus szinapszisok pedig kettős nyíllal (B, C) jelöltek. Az idegvégződések immunnegatívak és morfológiájukat tekintve nagyon változatosak. Az ábrán a különböző morfológiájú boutonokra három példa látható. **(A)** Kicsi, valószínűleg glutamáterg axonterminális (b) kevés, kerek vezikulával és nagyon kifejezett posztzinaptikus denzitással. **(B)** Nagy idegvégződés (b) tele kicsi vezikulákkal, amely sötétmagvú (dense core) vezikulát is tartalmaz (egy példa üres nyíllal jelölve). **(C)** A képen a felső bouton hasonló az (A) ábrán találhatóhoz, kiterjedt posztzinaptikus denzitással rendelkezik (kettős nyílfejjel jelölve). Az alsó axonterminális (b) csak kevés vezikulát tartalmaz, amelyek inkább laposak, nincs benne sötétmagvú vezikula és szimmetrikus szinapszist képez. **(D-G)** Nagy felbontású immunarany technikával mutattuk ki a DGL- α pontos sejten belüli elhelyezkedését. Az arany szemcsék (nyíllal jelölve) mindig a sejten belül a plazmamembránon, az aszimmetrikus (D) és a szimmetrikus (E-G) szinapszisok közelében voltak megtalálhatóak, az általunk megfigyelt és fent leírt mindhárom idegvégződés típus esetében: 1. **(D)** Kicsi axonterminális sok kicsi és kerek vezikulával és kiterjedt posztzinaptikus denzitással (kettős nyílfejjel a glutamáterg szinapszist jelöli); 2. **(E)** Axonterminális lapos vezikulákkal, jól látható szimmetrikus szinapszist képezve (kettős nyíl); 3. **(F, G)** Axonterminális sok vezikulával és sötétmagvú vezikulákkal (üres nyíl), nagyon vékony posztzinaptikus denzitással. A kettős nyíl egy feltehetőleg GABAerg szinapszist jelöl. Skála: 0,5 μ m (A-G).

3.3 A dopaminerg és nem-dopaminerg sejtek is expresszálnak DGL- α enzimet

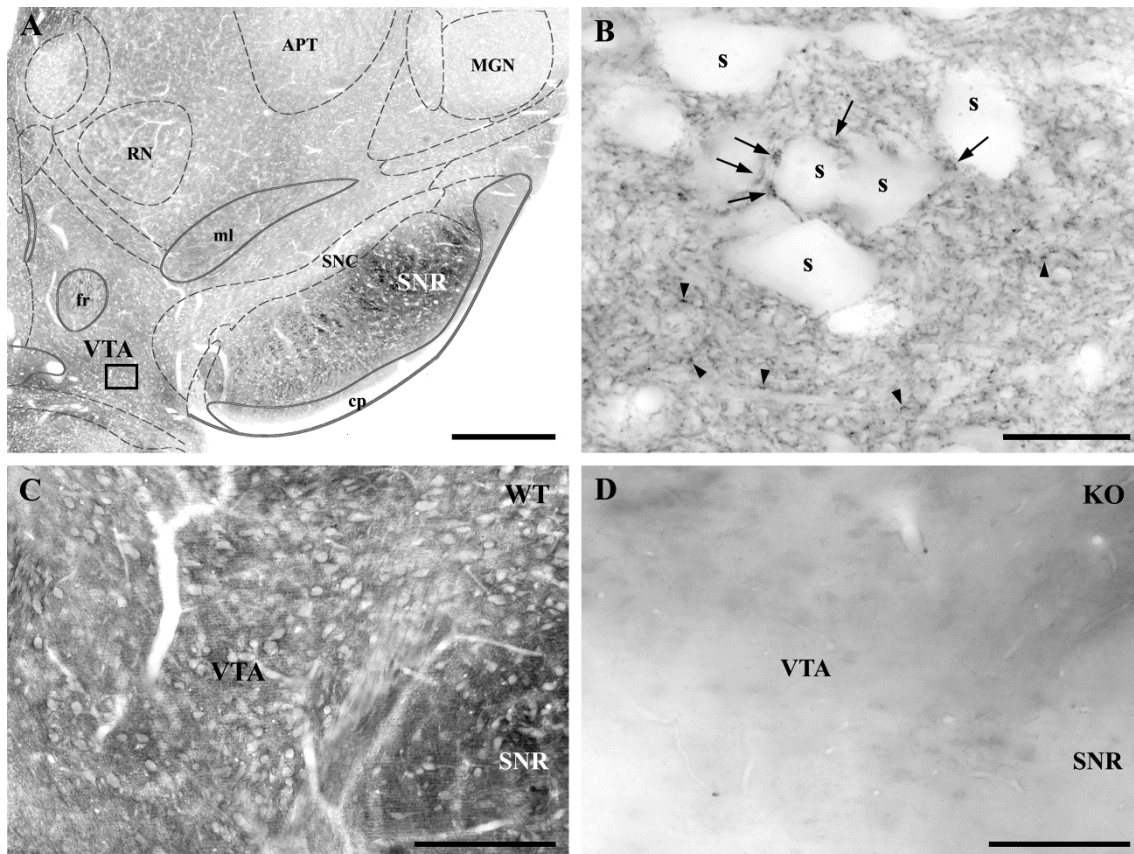
Annak érdekében, hogy megállapítsuk, hogy a VTA dopaminerg sejtjei termelik-e a DGL- α enzimfehérjét, kettős immunfestést alkalmaztunk. A DGL- α enzimet immunarany technikával, míg a VTA-ban található dopaminerg sejtekre jellemző tirozin-hidroxiláz (TH) jelenlétét immunperoxidáz (DAB) technikával tettük láthatóvá (**21. ábra**). Az elektronmikroszkópos vizsgálat a DGL- α sejten belüli elhelyezkedésére vonatkozóan az eddigi vizsgálatokhoz hasonló eredményt adott. Az enzim a feltételezett GABAerg, illetve glutamaterg szinapszisok közelében egyaránt megtalálható volt, bár a diffúzibilis DAB csapadék sokszor megnehezítette a szinapszisok pontos behatárolását. A mintáinkban gyakran előfordultak TH-immunnegatív, de DGL- α pozitív sejtek is. Ennek az is lehet a magyarázata, hogy a dopaminerg neuronokban a TH expressziója változhat az időben és így az, hogy van-e kimutatható mennyiségű hidroxiláz enzim ezekben a neuronokban, nem feltétlenül megbízható információ a dopaminerg sejtek beazonosítása szempontjából. (Bjorklund és Dunnet, 2007).



21. ábra Az egér VTA-ban található dopaminerg neuronok termelnek DGL- α enzimet. (A) A tirozin-hidroxilázal (TH) jelölt dopaminerg neuronok (d_{TH}) sejtmembránhoz kötötten tartalmaznak DGL- α enzimet, ahogy azt az ezüst intenzifikálással kombinált immunarany technika segítségével sikerült kimutatnunk. Az immunarany szemcsék (nyíllal jelölve) nagyrészt a szinapszisokat (nyílfejjel jelölve) körülvevő periszinaptikus gyűrűben fordulnak elő, az immunnegatív axonterminálisokkal szemben (b). (B, C) A DGL- α enzim (nyíllal jelölve) megtalálható a kisebb átmérőjű TH-pozitív dendritekben is (d_{TH}), amelyek a jelöletlen axonterminálisokkal (b) szinaptizálnak (szinapszis nyílfejjel jelölve). Skála: 0,5 μ m (A-C).

3.4 A preszinaptikus CB₁ receptor jelenléte a VTA GABAerg és glutamáterg axonterminálisain

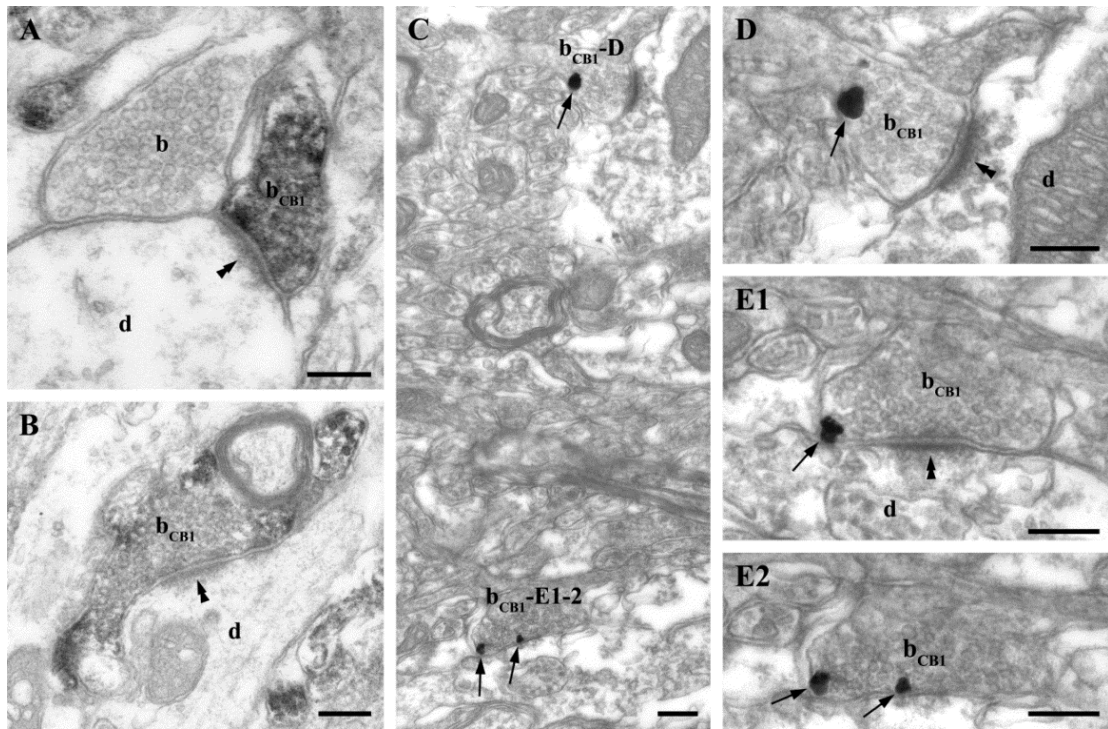
A DGL- α enzim posztszinaptikus jelenléte és az előzetes kutatások alapján felmerült a kérdés, hogy a VTA-ban a CB₁ kannabinoid receptor vajon megtalálható-e preszinaptikusan a glutamáterg, illetve a GABAerg szinapszisokban. Meglepő módon a korábbi anatómiai kutatások a VTA-ban azt mutatták, hogy a CB₁ receptor nagyon kis mennyiségben vagy egyáltalán nem volt jelen ezen az agyterületen (Herkenham et al. 1991b; Mailleux and Vanderhaeghen, 1992; Tsou et al., 1998). Ezért ennek a kérdésnek a megválaszolására a mások által korábbi kísérletekben használt antitesteknél sokkal nagyobb érzékenységgű antitestet használtuk (részletesen lásd Eredmények 1. fejezet; Fukudome et al., 2004). Ez az antitest a vad típusú állatokban sűrű neuropil jelölést adott (**22A-C. ábra**), ami a CB₁-génkiütött állatokból származó középagyi mintákban teljesen hiányzott (**22D. ábra**). Fénymikroszkópban nagyobb nagyításon szemcsés jelölés volt látható a vad típusú állatokból származó mintákban (**22B. ábra**). Ezek a feltételezett axonvarikozitások nagyrészt a CB₁-immunnegatív sejttestek körül és a fő dendritágak körül voltak láthatóak, kisebb szemcsék pedig a neuropil területén mindenhol előfordultak (**22B. ábra**).



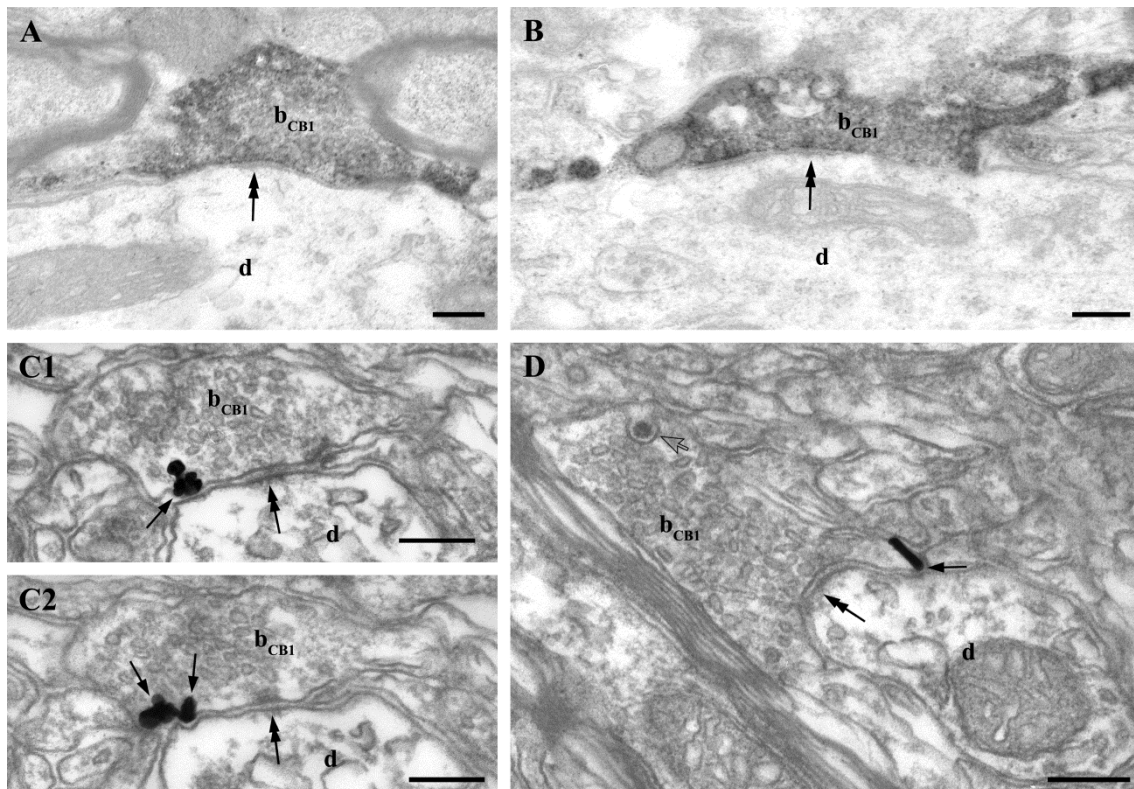
22. ábra A CB₁ kannabinoid receptor eloszlása a VTA-ban. **(A)** Közepesen sűrű CB₁-immunfestés látható a VTA területén. A középagyban ezen a területen kívül találunk még dopaminerg sejteket a substantia nigra pars compacta (SNC) területén is. Ezzel összhangban a fénymikroszkópos felvételen látszik, hogy az SNC-ben is van CB₁-immunjel. Érdekes módon a substantia nigra pars nigra (SNR) területén, ahol elsősorban GABAerg neuronok vannak sokkal erősebb az immunfestés, mint a VTA-ban, valószínűleg a striatumról érkező CB₁-pozitív GABAerg innerváció miatt. **(B)** Az **(A)** ábrán bekeretezett terület nagyobb nagyítású képén látszik a CB₁ festés szemcsés mintázata. Ennek mintázata nem homogén, hanem vannak nagyobb varikozitások (nyílal jelölve) és ezek nagyrészt a CB₁-immunnegatív sejttestek (s) körül csoportosulnak, míg a kisebb feltételezett axonterminálisok (nyílfejjel jelölve) a neuropilben oszlanak el. **(C, D)** A CB₁ antitest specificitásának vizsgálata ugyanabból az alomból származó vad típusú (WT) és génkiütött (KO) állatból vett mintákban. CB₁-immunfestés csak a vad típusú állatokból vett mintákban látható **(C)**, míg a génkiütött állatokból vett mintákban teljesen hiányzik **(D)**, bizonyítva az antitest specificitását. Rövidítések: APT, anterior pretecal nucleus; cp, cerebral penduncle, basal part; fr, fasciculus retroflexus; MG, medial geniculate nucleus; ml, lemniscus medialis; RN, red nucleus. Skála: 500µm **(A)**; 20 µm **(B)**; 200 µm **(C, D)**.

Ahhoz, hogy megállapítsuk a CB₁ receptorok sejten belüli lokalizációját, az immunfestések után elektronmikroszkópos analízist végeztünk az adott VTA mintákon **(23. és 24. ábra)**. Az immunarany és immunperoxidáz reakció eredménye hasonló mintázatot mutatott. A CB₁-immunjel az axonterminálisokra korlátozódott és az immunarany jelölés azt is megmutatta, hogy a receptor az idegvégződés plazmamembránjához kötötten helyezkedik el nagyrészt extraszinaptikus pozícióban.

Mivel az antitest epitópja a receptorfehérje sejten belül elhelyezkedő C-terminálisán található, az adott jelölési mintázat egyben utal a reakció specifikusságára is. Mindhárom axonterminális típus (lásd Eredmények 3.2 fejezet), amelyeknél posztzinaptikusan DGL- α enzim volt megtalálható, szintén tartalmazott preszinaptikusan CB₁ receptorokat (**23-24. ábra**).



23. ábra A CB₁ kannabinoid receptor preszinaptikus elhelyezkedése a VTA glutamaterg szinapszisaiban. (**A,B**) A 22. ábrán megfigyelt fénymikroszkópban jól látható szemcsés CB₁-pozitív immunjelölést részben azok a boutonok adják (b_{CB1}), amelyek aszimmetrikus szinapszisokat (dupla nyílfejjel jelölve) képeznek mind nagyobb (d (A)) mind kisebb (d (B)) átmérőjű, CB₁-immunnegatív dendritekkel. (**C-E2**) Gyenge, de egyértelmű CB₁-immunarany jelölés (nyíllal jelölve) is látható az axonterminálisokon (b_{CB1}). (**D és E1, E2**) A (C) ábrán látható két, immunarany szemcsét (nyíllal jelölve) tartalmazó CB₁-pozitív axonterminálisról (b_{CB1}) készült nagyobb nagyítású felvételek. Ezek a boutonok aszimmetrikus szinapszist képeznek az immunnegatív dendriteken (d) és jellemző rájuk a jól kifejezett posztzinaptikus denzitás (dupla nyílfejjel jelölve). (**E1,E2**) A (C) ábrán található alsó szinapszisoról és ugyanennek a szinapszisanak a szomszédos metszetéről készült nagyobb nagyítású felvétel (b_{CB1} (E1,E2)). Az elektron- mikroszkópos felvételeken jól látszik, hogy az immunarany szemcsék a receptor epitópjának megfelelő helyzetben, intracellulárisan, a plazmamembránhoz kötődve helyezkednek el. Skála: 0,2 μ m (A-E2).

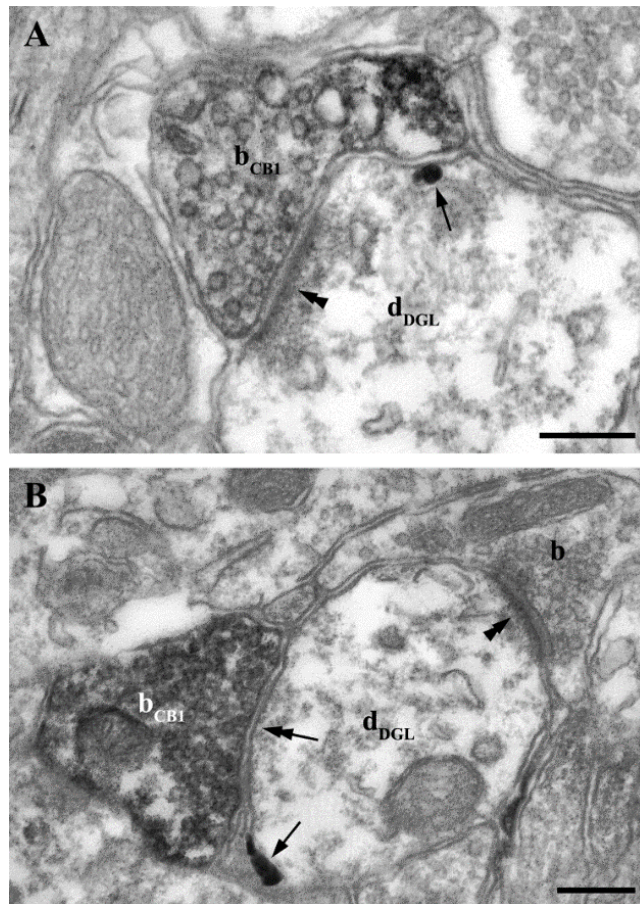


24. ábra A CB₁ kannabinoid receptor preszinaptikus elhelyezkedése a VTA GABAerg szinapszisaiban. (A, B) A DAB csapadék mutatja, hogy a CB₁ receptor megtalálható olyan axonterminálisokban is (b_{CB1}), amelyek szimmetrikus szinapszist (kettős nyíllal jelölve) képeznek, jelen esetben egy vastag immunnegatív proximális dendriten (d). Ez az elrendeződés magyarázza valószínűleg a 22. ábrán megfigyelhető szemcsés jelölési mintázat nagyobbik részét. (C1, C2) Két szomszédos szubcelluláris profilról készült felvételen a CB₁ receptorok helyét jelölő aranyszemcsék (nyíllal jelölve) preszinaptikusan helyezkednek el egy szimmetrikus szinapszist (kettős nyíllal jelölve) képző GABAerg terminális körül (b_{CB1}). (D) Az ábrán egy másik, CB₁-pozitív (b_{CB1}), szimmetrikus szinapszist képző idegvégződés is látható (d-dendrit). Ez az axonterminális különbözik a C1 és C2 ábrán látható axonterminálístól, mert jól látható sötétmagvú (dense core) vezikulát is tartalmaz (üres nyíllal jelölve) a sok, gyakran lapos vezikula mellett. Skála: 0,2 μm (A-D).

3.5 Posztzinaptikus DGL- α és preszinaptikus CB₁ receptorok kolokalizációja a VTA glutamaterg és GABAerg szinapszisaiban

A szinaptikus jelátvitel endokannabinoid-mediált, CB₁ receptor-függő rövid távú depressziója (STD) a VTA glutamaterg, illetve GABAerg szinapszisaiban egyaránt jól ismert és korábbi kísérleti eredmények alapján nagy valószínűség szerint a 2-AG felelős ezért a hatásért (Riegel and Lupica, 2004; Melis et al., 2004). A homoszinaptikus depresszióhoz szükséges molekuláris alkotóelemek jelenlétének bizonyítására DGL- α és CB₁ kettős festést végeztünk a VTA-t tartalmazó középgyag metszeteken.

A festések igazolták, hogy a CB₁-pozitív axonterminálisokkal szemben, mind a szimmetrikus, mind az aszimmetrikus szinapszisok esetében megtalálható a DGL- α enzim (25. ábra). Ez a molekuláris szerveződés közvetlen bizonyítékot jelent a retrográd 2-AG endokannabinoid jelpálya jelenlétére és a hippocampusban talált eredményeinkkel összhangban arra utal, hogy ez a jelpálya általános alkotóeleme lehet a központi idegrendszer sok szinapszistípusának.



25. ábra A posztzinaptikusan elhelyezkedő DGL- α enzim és a preszinaptikusan elhelyezkedő CB₁ receptor kolokalizációja a glutamáterg és GABAerg szinapszisokban. (A, B) Az elektronmikroszkópos felvételeken jól látható, hogy a 2-AG-t szintetizáló DGL- α enzim és a CB₁ receptor ugyanabban a szinapszisban található, de a szinapszis két ellentétes oldalán. A DGL- α esetében beágyazás előtti immunarany technikát alkalmaztunk (az enzim helyzete nyíllal jelölve), míg a CB₁ receptor preszinaptikus előfordulását a DAB csapadék mutatja (b_{CB1}). Az endokannabinoid rendszer hasonló szinaptikus felépítése mind a glutamáterg aszimmetrikus szinapszisok esetében (A), mind a GABAerg szimmetrikus szinapszisok esetében megfigyelhető (B). Az aszimmetrikus szinapszisok dupla nyílfejjel, a szimmetrikus szinapszisok dupla nyíllal jelölve (b, immunnegatív bouton) láthatóak. Skála: 0,2 μ m (A-B).

VI. MEGBESZÉLÉS

Dolgozatomban az endokannabinoid jelpálya elemeinek előfordulását és szinaptikus elrendeződését tanulmányoztuk a központi idegrendszer szinapszisaiban. Az általunk vizsgált egyik agyterület a hippokampusz volt, amely a szinaptikus plaszticitás és a tanulási folyamatok vizsgálatának egyik legfontosabb területe. A második vizsgált agyterület pedig a ventrális tegmentális área volt, amely olyan kóros tanulási folyamatok, mint amilyen például a függőség kialakulásában játszik fontos szerepet.

1. Az endokannabinoid rendszer felépítése a hippokampusz principális sejtjeire érkező serkentő szinapszisaiban

Ezen munka keretében először sikerült anatómiai módszerekkel megmutatnunk a hippokampusz glutamáterg szinapszisaiban a retrográd jelátvitelben résztvevő endokannabinoid rendszer egyes molekuláris elemeinek a jelenlétét és a sejten belüli elhelyezkedését.

1.1 A 2-AG termelő DGL- α enzim posztzinaptikus elhelyezkedése

A DGL- α enzim elhelyezkedését vizsgáló anatómiai kísérletek legfontosabb eredménye az, hogy ez az enzim posztzinaptikusan, a principális sejtek dendrituskéinek fejében található meg. Az alábbiakban azokat a kísérleti lépéseket sorolom fel, amelyeket megtettünk az eredmények minél nagyobb megbízhatósága érdekében. Az *in situ* hibridizációs kísérletek során a nagyobb specificitás elérésének érdekében két, egymással nem átfedő szekvenciájú ribopróbát használtunk, a háttérjelölődést negatív próba alkalmazásával zártuk ki. Így sikerült kimutatnunk, hogy a DGL- α enzimet nagy mennyiségben termeli a hippokampuszban előforduló két típusú, dendrituskéikkel rendelkező principális sejt: a gyrus dentatus szemcsesejtjei illetve a (CA1 és CA3 régióban vizsgált) piramissejtek. Az immunhisztokémiai vizsgálatok során két, a DGL- α független epitópjai ellen termeltetett antitestet használtunk és a festések során mindig végeztünk negatív (antitestet nem tartalmazó) kontroll kísérleteket is. A festések specifikusságát az is jól mutatta, hogy a nagy felbontású immunarany kísérletekben az elektronmikroszkópos felvételeken jól láthatóan a DGL- α enzimet jelölő arany szemcse a plazmamembrán intracelluláris felszínéhez kapcsolódott. Ez az eredmény összhangban áll azzal, hogy a DGL- α enzim szerkezete alapján négy transzmembrán régiót tartalmaz.

A denrittüskék nagyon változékony struktúrák, tulajdonképpen a tanulás sejtszintű modelljeinek tekinthetőek. Az őket érő hatásoktól függően átalakulnak annak megfelelően, vagy ingerek hiányában meg is szűnhetnek. A dendrittüskék fejéhez általában egy serkentő axonterminális, az arra jellemző aszimmetrikus szinapszissal és posztszinaptikus denzitással kapcsolódik. A vékony tükkenyak amolyan gátként viselkedik, amely elhatárolja az adott tüskefejet a sejt többi részétől, megteremtve ezzel a legtöbb szignálútvonal számára, hogy a plaszticitási mechanizmusok csak az adott szinapszisa specifikusan játszódjanak le. A kutatások arra utalnak, hogy az endokannabinoidok részt vesznek a serkentő szinapszisokon kialakuló hosszútávú plaszticitási folyamatokban. Az, hogy a DGL- α enzim a tüskefejekben található, beleillik ebbe az elképzelésbe. Az enzim anatómiai módszerekkel történt kimutatása posztszinaptikusan a glutamáterg szinapszisokban részben alátámasztja az ezt megelőző elektrofiziológiai eredményeket. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a hippocampus szinaptikus plaszticitási folyamataiban (mind a GABAerg illetve a glutamáterg szinapszisokat tekintve) a 2-AG-nek van a legfontosabb szerepe.

Itt jegyezném meg, hogy kísérleteinkben a szimmetrikus gátló GABAerg szinapszisokban nem volt kimutatható a DGL- α enzim jelenléte. Ezt alátámasztják azok az elektrofiziológiai kísérletek, melyek azt mutatták, hogy a GABAerg szinapszisok endokannabinoid függő depolarizáció-indukálta gátláscsökkenése (DSI) nem DGL-enzim függő. Ezzel ellentétben a 2-AG lebontó enzim (MGL) gátlásának hatására a DSI időtartama megnőtt, ami pedig azt jelenti, hogy a 2-AG szerepet játszik ezekben a folyamatokban. Azt, hogy mi nem találtuk meg mégsem a DGL- α ezekben a szinapszisokban, többféle oka lehet. Eredményezheti ezt az is, hogy az enzim mennyisége a kísérleteinkben a kimutatási határ alatt volt. Ezen kívül a 2-AG esetében léteznek DAG-független szintézisútvonalak is.

1.2 A posztszinaptikusan elhelyezkedő DGL- α enzim és a mGluR5 receptorok funkcionális kapcsolata és a heteroszínaptikus plaszticitás

Sok vizsgálat támasztja alá, hogy az endokannabinoid rendszer nem csak homo- hanem heteroszínaptikus plaszticitásban is szerepet játszik. A legjobb példa erre a CA1 piramissejtek esetében megfigyelhető gátlás hosszú távú depressziója (long-term depression of inhibition, I-LTD). A gátlás a preszinaptikus GABAerg axonterminálisokra

hat de a posztzinaptikus oldalról indul ki, mégpedig a glutamáterg Schaffer-kollaterálisok serkentése nyomán. A folyamatban a posztzinaptikus I-es típusú metabotróp glutamát receptorok aktivációja játszik szerepet. A CA1 piramis sejtek nagyrészt az I-es típusú mGluR-ok közül az 5-ös altípust (mGluR5) tartalmazzák, míg az 1-es altípus (mGluR1) egyes interneuron típusokban fordul elő. Az analízis, amit azért végeztünk, hogy megállapítsuk a CA1 piramis sejtekben az mGluR5 receptor sejten belüli eloszlását, érdekes eredményt hozott. Az analízis megmutatta, hogy a receptor eloszlása nagyrészt egy bizonyos periszinaptikus térrészre korlátozódik, amely a dendrittűskék fejében levő posztzinaptikus denzitás körül helyezkedik el (sosem a szinapszisban). Lujan és kollégái által az mGluR5 receptor eloszlásánál figyelembe vett kritériumokat alkalmazva, a DGL- α enzim esetében hasonló periszinaptikus eloszlást figyeltünk meg. Az enzim legnagyobb mennyiségben (az mGluR5 receptorhoz hasonlóan) a szinapszis szélétől számított 60nm-es távolságban volt megfigyelhető és a szinapszistól távolodva mennyisége hasonló mértékben csökkent. Azért is végeztük el ezt a számítást, mert azt tudtuk, hogy a 2-AG szintézisében ennek a receptornak fontos szerepe van. Ez a receptor képes aktiválni a PLC β enzimet, mely előállítja azt a DAG prekuzort, melyből a 2-AG keletkezik. Ezt az is bizonyítja, hogy a receptor farmakológiai módszerekkel való aktivációja striatális és hippocampális kultúra kísérletekben mérhető mennyiségű 2-AG keletkezését váltotta ki és ez a folyamat blokkolható volt PLC β és DAG inhibitorokkal. Az, hogy DGL inhibitorokkal az I-LTD gátolható, valamint a DGL- α és az mGluR5 periszinaptikus kolokalizációja arra utal, hogy az mGluR5 receptor és a DGL- α enzim együttes működésével keletkezik a 2-AG a glutamáterg szinapszisokban a heteroszínaptikus I-LTD során. Az is figyelemreméltó, hogy az I-es típusú glutamát receptor aktiváció hozzájárul még más, endokannabinoid- és DGL-függő, rövidtávú szinaptikus plaszticitási folyamatok létrejöttéhez is hippocampális glutamáterg szinapszisokban. Ezzel szemben az mGluR-ok a DSI létrejöttében nem játszanak szerepet. Ezt az bizonyítja, hogy a DSI DGL inhibitorokkal nem blokkolható és PLC β génkiütött állatokban is kiváltható. Ez a heterogenitás, ami a biokémiai szignálútvonalakban illetve a DGL- α és mGluR5 térbeli szegregációjában megfigyelhető arra utal, hogy a 2-AG irányította endokannabinoid jelátvitel eltérhet a különböző szinapszistípusokban és szerepe lehet a homo- illetve heteroszínaptikus plaszticitás létrejöttében.

1.3 A glutamáterg szinapszisokban a CB₁ receptor preszinaptikus elhelyezkedése

A kannabinoid receptorok azonosítása a hippokampusz glutamáterg szinapszisaiban vita tárgyát képezte azóta, amióta a serkentő ingerületátvitelre ható kannabinoid hatást először leírták (Shen et al., 1996). A mi kutatócsoportunkból kerültek ki korábban azok az eredmények melyek leírták más forrásokból származó adatokkal megegyezően, hogy a hippokampuszban található GABAerg idegvégződések nagy mennyiségben tartalmaznak CB₁ receptort (Katona et al., 1999; Tsou et al., 1999; Egertova and Elphick, 2000; Fukudome et al., 2004), ezzel szemben az eredmények a glutamáterg szinapszisokat CB₁ negatívnak mutatták. Az itt bemutatott munka során egy nagy érzékenyséű CB₁ antitestet használtunk és segítségével sikerült a glutamáterg terminálisokban is kimutatnunk a receptor jelenlétét. Azóta sok vizsgálat kimutatta, hogy a hippokampusz CA1 régiójában a glutamát felszabadulás gátlásában a CB₁ receptornak szerepe van, alátámasztva ezzel akkori eredményeinket. Hogy mi okozhatta azt, hogy előzetesen a glutamáterg szinapszisok CB₁ negatívnak tűntek? Egyik oka lehet ennek az, hogy a principális sejtek sokkal kevesebb receptort tartalmaznak mint az interneuronok és az előzőleg használt antitest nem volt elég érzékeny ennek a kimutatásához. A másik technikai oka ennek egy CB₁ receptor interaktív fehérje lehet, mely a receptor C-terminálisának utolsó 9 aminosavjához kötődik. Ezt a fehérjét szelektíven csak a principális sejtek termelik. Az immunhisztokémiai vizsgálatok során használt egyes antitestek lehetséges, hogy e miatt a fehérje miatt nem voltak képesek jól a CB₁ receptorhoz hozzákötődni (Niehaus et al., 2004).

2. Az endokannabinoid jelpálya jelenléte a hippokampusz interneuronjaira és principális sejtjeire érkező serkentő szinapszisaiban és endokannabinoid-függő hosszú távú depresszió (E-LTD)

E munka keretében kimutattuk, hogy az interneuronokra érkező serkentő szinapszisokban is jelen van a DGL-függő 2-AG szintézis és a kollaborátorokkal közös munkában az ezekre illetve a principális sejtekre érkező serkentő szinapszisokra is jellemző a serkentés endokannabinoid függő hosszú távú gátlása.

2.1 A 2-AG-t szintetizáló DGL- α enzim jelenléte a hippocampális interneuronokban

Az előző fejezetben ismertetett kísérletek során (és azóta sok kísérlet alátámasztotta ezt a megfigyelést) is igazoltuk, hogy a hippocampusz principális sejtjeire érkező serkentő szinapszisokra jellemző a retrográd endokannabinoid szignalizációs rendszer jelenléte. Ennek ellenére az eddigi elektrofiziológiai vizsgálatok arra utaltak, hogy az ezekben a szinapszisokban megfigyelhető mGluR-függő LTD kialakulásában az endokannabinoid rendszer nem játszik szerepet (Rouach and Nicoll, 2003; Nosyreva and Huber, 2005; Lanté et al., 2006). Ehhez hasonlóan a hippocampális interneuronok esetében is megfigyelhető az LTD jelensége, de eddig ezekben a sejtekben sem sikerült a DGL- α enzimet anatómiai módszerekkel kimutatni és a farmakológiai kísérletek is arra utaltak, hogy ezek a folyamatok is endokannabinoid-függetlenek. Annak bizonyítására, hogy az interneuronok tartalmazzak-e DGL- α enzimet első lépésben in situ hibridizáció végeztünk. A korábban elvégzett in situ hibridizációs kísérletekben nem sikerült az interneuronokban az enzimet kimutatnunk. Annak magyarázata, hogy most láttuk az interneuronok halvány jelölődését az lehet, hogy egy optimalizált in situ hibridizációs reakciót végeztünk el. A sejtek így is a principális sejtekhez képest halványan jelölődtek, mely összefüggésben áll azzal, hogy sokkal kisebb mennyiségben tartalmazzák az enzimet. Immunhisztokémiai módszerrel kettő, a parvalbumin vagy szomatosztatin neurokémiai markerekkel jelölhető (illetve a szomatosztatin mellett mGluR1a receptor alegységet tartalmazó) DGL- α pozitív interneuron populációt sikerült azonosítanunk. Az immunhisztokémiai és elektronmikroszkópiás vizsgálatok megmutatták, hogy a DGL- α enzim az interneuronokra érkező serkentő szinapszisokban is poszt- és periszinaptikusan volt megtalálható. Igaz volt ez a tüskékkel rendelkező szomatosztatin pozitív, illetve a tüskékkel nem rendelkező, a serkentő szinapszist a dendritre kapó parvalbumin pozitív interneuronokra is.

2.2 Endokannabinoid-függő LTD a hippocampusz piramissejtjeiben

Az ezzel kapcsolatos megfigyelések azt támasztják alá, hogy a hosszú távú depresszió kiváltása és folyamatai nagyon sokrétűek és sok különböző molekuláris kaszkád játszhat bennük szerepet. Egy ezek közül az endokannabinoidokat használja, melyek retrográd módon képesek a preszinaptikus sejt aktivitását lecsendesíteni, de sok más formája van még az LTD-nek, melyek endokannabinoid függetlenek (Collingridge et al., 2010). A

rendszerek bonyolultságát még az is fokozza, hogy ezek függnnek a sejtípustól és a különbség van a fejlődési fázisok között is.

3. Az endokannabinoid rendszer szinaptikus elemeinek jelenléte a ventrális tegmentális área glutamáterg és GABAerg szinapszisaiban

Az endokannabinoid rendszer mivel sok függőséget okozó drog jutalmazó hatását befolyásolja, központi szerepet játszik a szerfüggőségek kialakulásában. A legtöbb kábítószer megnöveli a ventrális tegmentális áréában található dopaminerg neuronok tüzelési aktivitását. Ezért nagyon fontos megérteni, hogy a VTA-ba sokféle területől befutó idegrostok és a VTA dopaminerg idegsejtjei közötti kapcsolatok működését az endokannabinoid rendszer milyen módon és mértékben befolyásolja. Ennek megértése választ adhat az endokannabinoid rendszer különböző függőségekkel kapcsolatos folyamatokban játszott szerepére.

3.1 Nagy számú dopaminerg és nem dopaminerg sejt termel DGL- α enzimet a VTA-ban

A mi eddigi megfigyeléseinket az előzetes kutatások eredményeivel összevetve megállapíthatjuk, hogy a DGL- α enzim az agyban sok területen expresszálódik. Az in situ hibridizációs kísérletek azt mutatták, hogy a VTA területén szinte az összes idegsejt termeli ezt az enzimet, bár kisebb koncentrációban, mint ahogy azt a principális sejteknél megfigyelhettük. A VTA körülbelül 55%-át alkotják a dopaminerg sejtek (Margolis et al., 2006). Az általunk végzett kettős immunfestések eredményei is arra utalnak, hogy a DGL- α jelen van mind a tirozin-hidroxiláz pozitív (dopaminerg) és negatív (nem dopaminerg) sejtekben egyaránt. A DGL- α szubcelluláris elhelyezkedése a központi idegrendszerben jól láthatóan egy általános törvényszerűséget követ, amit megerősítenek a hippokampuszban végzett vizsgálataink is. A VTA-ban található idegsejteknek általában nincsenek dendrittüskéi (hasonlóan az előző fejezetben leírt interneuronokhoz) és csak kevés tüske szerű nyúlvánnyal (spinula) rendelkeznek (Grace and Ohn, 1989; Steffensen et al., 1998). Ennek ellenére a DGL- α jelölés fénymikroszkópos képe itt is apró pettyezettséget mutat, mint a dendrittüskés principális sejteket tartalmazó hippokampuszban. A pettyezett mintázatot itt is a DGL- α (dolgozatomban a hippokampuszban már korábban ismertetett) szubcelluláris eloszlása eredményezi,

miszerint az enzim a szinapszis körüli periszinaptikus gyűrűben fordul elő a legnagyobb mértékben.

3.2 A dopaminerg és nem-dopaminerg sejtek DGL- α -t tartalmazó szinapszisaiban a CB₁ receptor preszinaptikus elhelyezkedése

A CB₁ receptor megtalálható volt mind a valószínűleg külső forrásból származó glutamaterg- és GABAerg, valamint a belső forrásból származó GABAerg afferenseken, megerősítve sok ezt megelőző elektrofiziológiai vizsgálat eredményét. A CB₁ receptor, mely a központi idegrendszerben preszinaptikus elhelyezkedésű, sok olyan szinapszis ingerületátvitelét befolyásolja, melyeket egyrészt helyi GABAerg interneuronok (Cheer et al., 2000; Szabó et al., 2002), másrészt külső forrásból származó GABAerg (Riegel and Lupica, 2004) illetve glutamaterg afferensek (Melis et al. 2004) képeznek. A nagy számú preszinaptikus lokalizáció mellett, a CB₁ immunfestés nem éri el a kimutatási határt a szomatikus és dendritikus régióban. Mivel a dopaminerg sejtek más agyterületekre vetítenek, ez nem zárja ki annak lehetőségét (amiről egyébként nagyon ellentmondásos eredmények vannak) hogy a nucleus accumbensbe vagy a prefrontális agykéregbe vetítő axonjuk terminális része tartalmazhatja a receptort (Wenger et al., 2003; Herkenham et al., 1991; Szabó et al., 1999; Kofalvi et al., 2005).

3.3 Az endokannabinoid rendszernek a drogaddikcióval, valamint a droghasználat agyi jutalmazórendszerével való kapcsolata

Az endokannabinoid jelpálya elemeinek nagy száma a VTA szinapszisaiban arra utal, hogy az agyi jutalmazórendszer működésében ez a jelpálya nagyon fontos szerepet játszik. A jelpálya heterogén előfordulása miatt nehezen értelmezhetőek a farmakológiai vizsgálatok azon eredményei, melyek mellett nem állnak az adott hatáshoz kapcsolható sejtszintű vizsgálatok. Ezért nagyon nehéz annak a pontos meghatározása, hogy az endokannabinoid rendszernek mi a szerepe az addikciós és a jutalmazó rendszerrel kapcsolatos folyamatokban. A folyamatok megértésében az elektrofiziológia nyújthat számunkra segítséget. A kutatások arra utalnak, hogy a dopaminerg neuronok által képzett meghatározott szinapszisokban (és nem mindegyikben) adott körülmények között szabadulnak fel endokannabinoidok (Melis et al., 2004a, b; Riegel and Lupica, 2004). Tehát a helyett, hogy a dopaminerg neuronok átlagos aktivitás esetén a felszabadított

endokannabinoidokkal egyaránt befolyásolnák a GABAerg és glutamáterg bemeneteket, úgy tűnik, hogy egy szinapszis specifikus aktivációja szükséges a felszabadulásukhoz ami összefüggésbe hozható a bejövő szinaptikus jellel. Ez a modell keretet adhat ahhoz, hogy megmagyarázzuk a kannabinoidok hatását a dopaminerg neuronok aktivitására és ennek az addikcióban játszott szerepét. Erre a modellre alapozva, Lupica és Riegel (2005) azt vetették fel, hogy különösen azok a dopaminerg neuronok, amelyek az erős jutalmazó hatással kapcsolt külvilágból érkező jeleket kódolják, úgy változtatják meg a saját tüzelési mintázatukat, hogy „megszöknek” a tónikus GABA gátlás alól az endokannabinoid rendszer segítségével.

VII. KÖVETKEZTETÉSEK

Munkám során a központi idegrendszer két különböző területén, a hippocampusban és a VTA-ban vizsgáltuk a 2-AG közvetítette endokannabinoid szignálrendszer két elemének eloszlását. A vizsgált szinapszisokban az egyik elem, a 2-AG előállításáért felelős enzim a DGL- α mindig posztzinaptikusan a szinapszisok szélén helyezkedik el. A 2-AG jelfogó receptora a CB₁ pedig a szinapszis másik oldalán, a preszinaptikus idegsejt idegvégződésén. Mivel az összes általunk vizsgált szinapszistípusban és agyterületen ezt az elhelyezkedést találtuk, ez egyrészt utal arra, hogy az általunk vizsgált rendszer alkotóinak szubcelluláris eloszlása egy általános érvényű törvényszerűséget követ, illetve alátámasztja a korábbi élettani megfigyeléseket, amelyek szerint a 2-AG egy retrográd jelátviteli molekula.

Az endokannabinoid rendszernek a szinaptikus plaszticitási folyamatokban kiemelkedő szerepe van. A hippocampusban végzett vizsgálataink során arra is fény derült, hogy mind az interneuronokra, mind pedig a principális sejtekre érkező serkentő szinapszisokban megtalálható az endokannabinoid szignálrendszer és ezen szinapszisokban indukálható az endokannabinoid-függő LTD. Az LTD kiváltásához sejttípus specifikus indukció szükséges, ami abban nyilvánul meg, hogy a serkentő szinapszisokban kisebb indukció kell az adott gátlás kiváltásához. Ennek olyan élettani vagy kórélettani folyamatokban lehet szerepe neuronhálózati szinten, amikor bizonyos körülmények között kialakuló túlzott serkentés hatására endokannabinoidok szabadulnak fel és ezek a serkentő sejtek szinapszisainak a működését lecsendesítik, miközben a gátló sejtek szinapszissai még tovább működhetnek segítve ezzel az esetleges patológiás állapot elkerülését.

A VTA az agyi belső jutalmazórendszer központja, a dopamintermelő sejtek nagy része itt található. A kábítószer egyik legfontosabb hatása, hogy a dopamin felszabadulást fokozzák. Ezt az is bizonyítja, hogy a dopaminerg rendszer blokkolásával kivédhető a legtöbb anyag jutalmazó hatása. Az addikció tulajdonképpen egy kóros tanulási forma. A mi eredményeink azt mutatták, hogy többféle típusú, helyi vagy külső forrásból származó GABAerg, illetve helyi glutamáterg a dopaminerg sejtekre érkező szinapszisban megtalálhatóak az endokannabinoid jelpálya elemei, így ez a rendszer fontos szerepet játszhat a dopaminfelszabadulás szabályozásában.

VIII. ÖSSZEFOGLALÁS

Korábbi kutatásokból feltételezhető volt, hogy a 2-AG endokannabinoid fontos szerepet játszhat a retrográd szinaptikus jelátvitelben a preszinaptikus CB₁ kannabinoid receptorok aktiválásán keresztül. Az előzetes kutatások azt is feltárták, hogy ez a jelpálya a központi idegrendszer számos területén jelen lehet és ennek következtében sok élettani és kórélettani folyamatban, mint például epilepsziában és a függőségekben is fontos szerepe lehet. Azért, hogy a 2-AG jelpálya egyes idegrendszeri folyamatokban játszott szerepét minél jobban megértsük, szükség van a jelpálya molekuláris alkotóelemeinek és azok eloszlásának pontosabb ismeretére. Doktori munkám során *in situ* hibridizációs és immunhisztokémiai módszerekkel, valamint fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatok segítségével a következő főbb megállapításokat tettem: 1) A hippocampális principális sejtek és a GABAerg interneuronok, valamint a középagyi ventrális tegmentális área (VTA) sejtjei termelik a 2-AG egyik feltételezett szintetizáló enzimének a DGL- α szerinhidroláznak az mRNS-ét; 2) A hippocampális glutamáterg és GABAerg sejtekre, valamint a VTA dopaminerg sejtjeire érkező serkentő szinapszisokban egyaránt megtalálható a DGL- α a posztszinaptikus oldalon fordult elő, egész pontosan a posztszinaptikus denzitás szélén periszinaptikus pozícióban koncentrált. Molekuláris célpontja a CB₁ receptor pedig mindig preszinaptikusan fordult elő. Ez a molekuláris és anatómia szerveződés arra utal, hogy a DGL- α a kiinduló pontja a retrográd szinaptikus jelátvitelnek, amelyben a 2-AG endokannabinoid kulcsszerepet játszik, mint retrográd jelmolekula, amely a preszinaptikus CB₁ receptorokon keresztül képes gátolni a neurotranszmitter felszabadulást a központi idegrendszer serkentő szinapszisaiban. Ez a mechanizmus egy negatív visszacsatolásként fontos szerepet játszhat a neuronhálózatok féken tartásában. A kísérleteim eredményeiből további következtetésként az is levonható, hogy a GABAerg interneuronokban valószínűleg később kapcsol be ez a „szinaptikus biztosíték”, amely így az esetleges túlserkentés és annak negatív következményei ellen jobban képes megvédeni a rendszert tovább engedve a GABAerg interneuronok fokozott serkentését. Ennek elsősorban az epilepsziás rohamok során lehet szerepe. További eredményeim alapján pedig a 2-AG-nek fontos szerepe van a dopaminerg sejtek aktivitásának szabályozásában is, aminek az agyi jutalmazórendszer működésében és a szenvedélybetegségek kialakításában lehet szerepe.

IX. SUMMARY

Prior physiological studies proposed that the endocannabinoid molecule 2-AG may play an important role in retrograde synaptic transmission via the activation of presynaptic CB₁ receptors. These earlier research findings have also uncovered that this signaling pathway is present in many regions of the central nervous system and hence may have a crucial function in several physiological and pathophysiological processes, such as epilepsy and addiction. To better understand the functional role of the 2-AG signaling pathway in the brain, it is necessary to identify its molecular components and to describe their cellular and subcellular distribution. In my thesis work, I have employed in situ hybridization and immunohistochemistry approaches together with light and electron microscopic investigations and made the following observations: 1) mRNA of a candidate 2-AG synthesizing enzyme DGL- α is expressed by hippocampal principal cells and GABAergic interneuron as well as by midbrain ventral tegmental area neurons; 2) DGL- α is present postsynaptically at the afferent excitatory synapses of hippocampal principal cells, GABAergic interneurons and midbrain VTA dopaminergic neurons, where the enzyme exhibits a perisynaptic accumulation at the edge of the postsynaptic density. In contrast, CB₁ cannabinoid receptors, the predominant molecular targets of 2-AG were always found presynaptically. This molecular and anatomical organization suggest that DGL- α is the starting point retrograde synaptic transmission, in which 2-AG indeed plays a key role as the retrograde messenger molecule, and then by activating presynaptic CB₁ receptors it inhibits neurotransmitter release at the excitatory synapses. This mechanism functions as a negative feedback pathway and may be instrumental in keeping neuronal network activity under control. An interesting aspect of the present experimental findings indicate that this „synaptic circuit-breaker” is turned on later at excitatory synapses targeting hippocampal GABAergic interneurons providing further protection against excess excitability and its negative consequences by allowing excitatory stimulation of inhibitory neurons. This phenomenon may be important during epileptic seizures. Additional findings in the thesis support the notion that 2-AG plays also a role in the regulation of the activity of dopaminergic neurons, which may be important in controlling the brain’s reward pathway and addiction.

X. IRODALOMJEGYZÉK

- Alger BE, Kim J. (2011) Supply and demand for endocannabinoids. *Trends Neurosci*, 34(6):304-15.
- Amaral DG (1978) A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *J Comp Neurol* 182:851–914.
- Baude A, Nusser Z, Roberts JD, Mulvihill E, McIlhinney RA, Somogyi P. (1993) The metabotropic glutamate receptor (mGluR1 alpha) is concentrated at perisynaptic membrane of neuronal subpopulations as detected by immunogold reaction. *Neuron*, 11(4):771-87.
- Bauer M, Chicca A, Tamborrini M, Eisen D, Lerner R, Lutz B, Poetz O, Pluschke G, Gertsch J. (2012) Identification and quantification of a new family of peptide endocannabinoids (Pepcans) showing negative allosteric modulation at CB1 receptors. *J Biol Chem*, 287(44):36944-67.
- Bisogno T, Howell F, Williams G, Minassi A, Cascio MG, Ligresti A, Matias I, Schiano-Moriello A, Paul P, Williams EJ, Gangadharan U, Hobbs C, Di Marzo V, Doherty P. (2003) Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J Cell Biol*, 163:463-468.
- Bisogno T, Melck D, De Petrocellis L, Di Marzo V (1999) Phosphatidic acid as the biosynthetic precursor of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in intact mouse neuroblastoma cells stimulated with ionomycin. *J Neurochem* 72:2113–2119.
- Bisogno T, Sepe N, Melck D, Maurelli S, De Petrocellis L, Di Marzo V. (1997) Biosynthesis, release and degradation of the novel endogenous cannabimimetic metabolite 2- arachidonoylglycerol in mouse neuroblastoma cells. *Biochem J*, 322:671-677.
- Blankman JL, Simon GM, Cravatt BF. (2007) A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Chem Biol*, 14:1347-1356.
- Bliss TV, Lomo T. (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*, 232(2):331-56.

- Blockade of effects of smoked marijuana by the CB1-selective cannabinoid receptor antagonist SR141716.
- Boehm S, Betz H. (1997) Somatostatin inhibits excitatory transmission at rat hippocampal synapses via presynaptic receptors. *J Neurosci*, 17(11):4066-75.
- Brakeman PR, Lanahan AA, O'Brien R, Roche K, Barnes CA, Hagan RL, Worley PF. (1997) Homer: a protein that selectively binds metabotropic glutamate receptors. *Nature*, 386:284-8.
- Brown SP, Safo PK & Regehr WG. (2004) Endocannabinoids inhibit transmission at granule cell to Purkinje cell synapses by modulating three types of presynaptic calcium channels. *J Neurosci*, 24:5623–5631.
- Broyd SJ, van Hell HH, Beale C, Yücel M, Solowij N. (2016) Acute and Chronic Effects of Cannabinoids on Human Cognition-A Systematic Review. *Biol Psychiatry*, 79(7):557-67.
- Budney AJ, Novy PL, Hughes JR. (1999) Marijuana withdrawal among adults seeking treatment for marijuana dependence. *Addiction*, 94(9):1311-22.
- Cabral GA, Rogers TJ, Lichtman AH. (2015) Turning Over a New Leaf: Cannabinoid and Endocannabinoid Modulation of Immune Function. *J Neuroimmune Pharmacol*, 10(2):193-203.
- Calabresi P, Picconi B, Tozzi A, Ghiglieri V, Di Filippo M. (2014) Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. *Nat Neurosci*, 17(8):1022-30.
- Caputi A, Melzer S, Michael M, Monyer H. (2013) The long and short of GABAergic neurons. *Curr Opin Neurobiol*, 23(2):179-86.
- Castillo PE. (2012) Presynaptic LTP and LTD of excitatory and inhibitory synapses. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1;4(2).
- Castillo PE, Younts TJ, Chávez AE, Hashimoto Y. (2012) Endocannabinoid signaling and synaptic function. *Neuron*, 76(1):70-81.
- Castillo PE. (2012) Presynaptic LTP and LTD of excitatory and inhibitory synapses. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(2).
- Chávez AE, Chiu CQ, Castillo PE. (2010) TRPV1 activation by endogenous anandamide triggers postsynaptic long-term depression in dentate gyrus. *Nat Neurosci*, 13(12):1511-8.

- Chávez AE, Hernández VM, Rodenas-Ruano A, Chan CS, Castillo PE. (2014) Compartment-specific modulation of GABAergic synaptic transmission by TRPV1 channels in the dentate gyrus. *J Neurosci*, 34(50):16621-9.
- Chevaleyre V, Castillo PE. (2003) Heterosynaptic LTD of hippocampal GABAergic synapses: A novel role of endocannabinoids in regulating excitability. *Neuron*, 38:461-472.
- Chevaleyre V, Heifets BD, Kaeser PS, Sudhof TC, Castillo PE. (2007) Endocannabinoid-mediated long-term plasticity requires cAMP/PKA signaling and RIM1a. *Neuron*, 54:801–812.
- Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. (1996) Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*, 384:83–87.
- Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. (1996) Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*, 384:83–87.
- Cui Y, Paillé V, Xu H, Genet S, Delord B, Fino E, Berry H, Venance L. (2015) Endocannabinoids mediate bidirectional striatal spike-timing-dependent plasticity. *J Physiol*, 593(13):2833-49.
- Dahlstroen A, Fuxe K. (1964) Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol Scand Suppl*, SUPPL 232:1-55.
- DeFelipe J. (2013) Cajal and the discovery of a new artistic world: the neuronal forest. *Prog Brain Res*, 203:201-20.
- Devane WA, Dysarz FA, 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. (1988) Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol*, 34:605-613.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, 258:1946-1949.
- Di Marzo V. (2011) Endocannabinoid signaling in the brain: biosynthetic mechanisms in the limelight. *Nat Neurosci*, 14(1):9-15.

- Dinh TP, Carpenter D, Leslie FM, Freund TF, Katona I, Sensi SL, Kathuria S, Piomelli D. (2002) Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99:10819-10824.
- Edwards DA, Kim J, Alger BE. (2006) Multiple mechanisms of endocannabinoid response initiation in hippocampus. *J Neurophysiol*, 95(1):67-75.
- Filomena Fezza , Monica Bari , Rita Florio , Emanuela Talamonti , Monica Feole and Mauro Maccarrone (2014) Endocannabinoids, Related Compounds and Their Metabolic Routes. *Molecules* 19(11), 17078-17106.
- Freeman M. (2000) Feedback control of intercellular signalling in development. *Nature*, 408(6810):313-9.
- Freund TF, Buzsaki G (1996) Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6:347-470.
- Freund TF, Kali Sz. (2008) Interneurons. *Scholarpedia*, 3(9):4720.
- Fritschy JM, Panzanelli P. (2014) GABAA receptors and plasticity of inhibitory neurotransmission in the central nervous system. *Eur J Neurosci*, 39(11):1845-65.
- Fu J, Bottegoni G, Sasso O, Bertorelli R, Rocchia W, Masetti M, Guijarro A, Lodola A, Armirotti A, Garau G, Bandiera T, Reggiani A, Mor M, Cavalli A, Piomelli D. (2011) A catalytically silent FAAH-1 variant drives anandamide transport in neurons. *Nat Neurosci*, 15(1):64-9.
- Fukaya M, Uchigashima M, Nomura S, Hasegawa Y, Kikuchi H, Watanabe M. (2008) Predominant expression of phospholipase Cbeta1 in telencephalic principal neurons and cerebellar interneurons, and its close association with related signaling molecules in somatodendritic neuronal elements. *Eur J Neurosci*, 28:1744-1759.
- Gabrielli M, Battista N, Riganti L, Prada I, Antonucci F, Cantone L, Matteoli M, Maccarrone M, Verderio C. (2015) Active endocannabinoids are secreted on extracellular membrane vesicles. *EMBO Rep*, 16(2):213-20.
- Gao Y, Vasilyev DV, Goncalves MB, Howell FV, Hobbs C, Reisenberg M, Shen R, Zhang MY, Strassle BW, Lu PM, Mark L, Piesla MJ, Deng KW, Kouranova EV, Ring RH, Whiteside GT, Bates B, Walsh FS, Williams G, Pangalos MN, Samad TA, Doherty P. (2010) Loss of retrograde endocannabinoid signaling and

- reduced adult neurogenesis in diacylglycerol lipase knock-out mice. *J Neurosci*, 30:2017-2024.
- Gaoni Y, Mechoulam R. (1964) Isolation, structure and partial syntheses of an active constituent of hashish. *J Amer Chem Soc*, 86:1646-1647.
- Gerdeman GL, Ronesi J, Lovinger DM. (2002) Postsynaptic endocannabinoid release is critical to long-term depression in the striatum. *Nat Neurosci*, 5:446-451.
- Gonsiorek W, Lunn C, Fan X, Narula S, Lundell D, Hipkin RW. (2000) Endocannabinoid 2-arachidonyl glycerol is a full agonist through human type 2 cannabinoid receptor: antagonism by anandamide. *Mol Pharmacol*, 57(5):1045-50.
- Granger AJ, Nicoll RA. (2013) Expression mechanisms underlying long-term potentiation: a postsynaptic view, 10 years on. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, 369(1633):20130136.
- Grueter BA, Brasnjo G, Malenka RC. (2010) Postsynaptic TRPV1 triggers cell type-specific long-term depression in the nucleus accumbens. *Nat Neurosci*, 13(12):1519-25.
- Gulyás AI, Cravatt BF, Bracey MH, Dinh TP, Piomelli D, Boscia F, Freund TF. (2004) Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala. *Eur J Neuroscience*, 20:441-458.
- Gulyás AI, Hájos N, Katona I, Freund TF. (2003) Interneurons are the local targets of hippocampal inhibitory cells which project to the medial septum. *Eur J Neurosci*, 17(9):1861-72.
- Gunduz-Cinar O, Flynn S, Brockway E, Kaugars K, Baldi R, Ramikie TS, Cinar R, Kunos G, Patel S, Holmes A. (2016) Fluoxetine Facilitates Fear Extinction Through Amygdala Endocannabinoids. *Neuropsychopharmacology*, 41(6):1598-609.
- Halasy K, Hajszan T, Kovács EG, Lam TT, Leranth C. (2004) Distribution and origin of vesicular glutamate transporter 2-immunoreactive fibers in the rat hippocampus. *Hippocampus*, 2004;14(7):908-18.
- Hashimoto-dani Y, Ohno-Shosaku T, Kano M. (2007) Presynaptic monoacylglycerol lipase activity determines basal endocannabinoid tone and terminates retrograde endocannabinoid signaling in the hippocampus. *J Neurosci*, 27:1211-1219.

- Hashimotodani Y, Ohno-Shosaku T, Tsubokawa H, Ogata H, Emoto K, Maejima T, Araishi K, Shin HS, Kano M. (2005) Phospholipase C β serves as a coincidence detector through its Ca²⁺ dependency for triggering retrograde endocannabinoid signal. *Neuron*, 45(2):257-68.
- Hashimotodani Y, Ohno-Shosaku T, Tanimura A, Kita Y, Sano Y, Shimizu T, Di Marzo V, Kano M. (2013) Acute inhibition of diacylglycerol lipase blocks endocannabinoid-mediated retrograde signalling: evidence for on-demand biosynthesis of 2-arachidonoylglycerol. *J Physiol*, 591(19):4765-76.
- Heifets BD, Chevaleyre V, Castillo PE. (2008) Interneuron activity controls endocannabinoid-mediated presynaptic plasticity through calcineurin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(29):10250-5.
- Henny P, Brown MT, Northrop A, Faunes M, Ungless MA, Magill PJ, Bolam JP. (2012) Structural correlates of heterogeneous in vivo activity of midbrain dopaminergic neurons. *Nat Neurosci*, 15(4):613-9.
- Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC (1990) Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87:1932-1936.
- Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC (1991) Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci*. 11(2):563-83.
- Herlitze S, Garcia DE, Mackie K, Hille B, Scheuer T, Catterall WA. Modulation of Ca²⁺ channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature*, 380(6571):258-62.
- Hermanson DJ, Gamble-George JC, Marnett LJ, Patel S. (2014) Substrate-selective COX-2 inhibition as a novel strategy for therapeutic endocannabinoid augmentation. *Trends Pharmacol Sci*, 35(7):358-67.
- Hsu KL, Tsuboi K, Adibekian A, Pugh H, Masuda K, Cravatt BF. (2012) DAGL β inhibition perturbs a lipid network involved in macrophage inflammatory responses. *Nat Chem Biol*, 8(12):999-1007.
- Huestis MA, Gorelick DA, Heishman SJ, Preston KL, Nelson RA, Moolchan ET, Frank RA. (2001) *Arch Gen Psychiatry*, 58(4):322-8.
- Jinde S, Zsiros V, Nakazawa K. (2013) Hilar mossy cell circuitry controlling dentate granule cell excitability. *Front Neural Circuits*, 7:14.

- Jinno S. (2009) Structural organization of long-range GABAergic projection system of the hippocampus. *Front Neuroanat*, 3:13.
- Jung KM, Astarita G, Zhu C, Wallace M, Mackie K, Piomelli D. (2007) A key role for diacylglycerol lipase- α in metabotropic glutamate receptor-dependent endocannabinoid mobilization. *Mol Pharmacol*, 72:612-621.
- Kaczocha M, Glaser ST, Deutsch DG. (2009) Identification of intracellular carriers for the endocannabinoid anandamide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(15):6375-80.
- Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimoto-dani Y, Uchigashima M, Watanabe M (2009) Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev*, 89:309-380.
- Katona I, Sperl agh B, Sik A, K afalvi A, Vizi ES, Mackie K, Freund TF. (1999) Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J Neurosci*, 19(11):4544-58.
- Katona I, Freund TF. (2008) Endocannabinoid signaling as a synaptic circuit breaker in neurological disease. *Nat Med*, 14(9):923-30.
- Katona I, Freund TF. (2012) Multiple functions of endocannabinoid signaling in the brain. *Annu Rev Neurosci*, 35:529-58.
- Kim D, Jun KS, Lee SB, Kang NG, Min DS, Kim YH, Ryu SH, Suh PG, Shin HS. (1997) Phospholipase C isozymes selectively couple to specific neurotransmitter receptors. *Nature*, 389:290–293.
- Klausberger T, Somogyi P (2008) Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science* 321:53-7.
- Klausberger T, Magill PJ, M arton LF, Roberts JD, Cobden PM, Buzs aki G, Somogyi P. (2003) Brain-state- and cell-type-specific firing of hippocampal interneurons in vivo. *Nature*, 421(6925):844-8.
- Klausberger T, M arton LF, Baude A, Roberts JD, Magill PJ, Somogyi P. (2004) Spike timing of dendrite-targeting bistratified cells during hippocampal network oscillations in vivo. *Nat Neurosci*, 7(1):41-7.
- K ofalvi A, Rodrigues RJ, Ledent C, Mackie K, Vizi ES, Cunha RA, Sperl agh B (2005) Involvement of cannabinoid receptors in the regulation of neurotransmitter

- release in the rodent striatum: a combined immunochemical and pharmacological analysis. *J Neurosci.* 25(11):2874-84.
- Kozak KR, Rowlinson SW, Marnett LJ (2000) Oxygenation of the endocannabinoid, 2-arachidonylglycerol, to glyceryl prostaglandins by cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 275:33744–9.
- Kreitzer AC, Regehr WG. (2001) Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. *Neuron*, 29(3):717-27.
- Kullmann DM, Lamsa KP. (2007) Long-term synaptic plasticity in hippocampal interneurons. *Nat Rev Neurosci*, 8(9):687-99.
- Lammel S, Hetzel A, Häckel O, Jones I, Liss B, Roeper J. (2008) Unique properties of mesoprefrontal neurons within a dual mesocorticolimbic dopamine system. *Neuron*, 57(5):760-73.
- Lammel S, Ion DI, Roeper J, Malenka RC. (2011) Projection-specific modulation of dopamine neuron synapses by aversive and rewarding stimuli. *Neuron*, 70(5):855-62.
- Lammel S, Lim BK, Ran C, Huang KW, Betley MJ, Tye KM, Deisseroth K, Malenka RC (2012) Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area. *Nature*, 491(7423):212-7.
- Lante' F, Cavalier M, Cohen-Solal C, Guiramand J, VignesM. (2006) Developmental switch from LTD to LTP in low-frequency-induced plasticity. *Hippocampus*, 16:981–989.
- Ledent C, Valverde O, Cossu G, Petitet F, Aubert JF, Beslot F, Bohme GA, Imperato A, Pedrazzini T, Roques BP, Vassart G, Fratta W, Parmentier M. (1999) Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science*, 283:401-404.
- Lee SH, Ledri M, Tóth B, Marchionni I, Henstridge CM, Dudok B, Kenesei K, Barna L, Szabó SI, Renkecz T, Oberoi M, Watanabe M, Limoli CL, Horvai G, Soltesz I, Katona I. (2015) Multiple Forms of Endocannabinoid and Endovanilloid Signaling Regulate the Tonic Control of GABA Release. *J Neurosci*, 35(27):10039-57.

- Leung D, Saghatelian A, Simon GM, Cravatt BF (2006) Inactivation of N-acyl-phosphatidylethanolamine phospholipase D reveals multiple mechanisms for the biosynthesis of endocannabinoids. *Biochemistry* 45:4720-4726.
- Leung HT, Tseng-Crank J, Kim E, Mahapatra C, Shino S, Zhou Y, An L, Doerge RW, Pak WL. (2008) DAG lipase activity is necessary for TRP channel regulation in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron*, 58(6):884-96.
- Liu J, Wang L, Harvey-White J, Huang BX, Kim HY, Luquet S, Palmiter RD, Krystal G, Rai R, Mahadevan A, Razdan RK, Kunos G. (2008) Multiple pathways involved in the biosynthesis of anandamide. *Neuropharmacology*, 54:1-7.
- Ludányi A, Hu SS, Yamazaki M, Tanimura A, Piomelli D, Watanabe M, Kano M, Sakimura K, Maglóczy Z, Mackie K, Freund TF, Katona I. (2011) Complementary synaptic distribution of enzymes responsible for synthesis and inactivation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in the human hippocampus. *Neuroscience*;174:50-63.
- Lujan R, Nusser Z, Roberts JD, Shigemoto R, Somogyi P. (1996) Perisynaptic location of metabotropic glutamate receptors mGluR1 and mGluR5 on dendrites and dendritic spines in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci*, 8:1488-1500.
- Lupica CR, Riegel AC. (2005) Endocannabinoid release from midbrain dopamine neurons: a potential substrate for cannabinoid receptor antagonist treatment of addiction. *Neuropharmacology*, 48(8):1105-16.
- Lüscher C, Malenka RC. (2011) Drug-evoked synaptic plasticity in addiction: from molecular changes to circuit remodeling. *Neuron*, 69(4):650-63.
- Maccaferri G, Roberts JD, Szucs P, Cottingham CA, Somogyi P. (2000) Cell surface domain specific postsynaptic currents evoked by identified GABAergic neurones in rat hippocampus in vitro. *J Physiol*, 524 Pt 1:91-116.
- Maccarrone M. (2008) Good news for CB1 receptors: endogenous agonists are in the right place. *Br J Pharmacol*, 153(2):179-81.
- Mackie K, Hille B. (1992) Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma–glioma cells. *Proc Nat Acad Sci*, 89:3825–3829.
- Maejima T, Hashimoto K, Yoshida T, Aiba A, Kano M. (2001) Presynaptic inhibition caused by retrograde signal from metabotropic glutamate to cannabinoid receptors. *Neuron*, 31:463–475.

- Maldonado R, Valverde O, Berrendero F. (2006) Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction. *Trends Neurosci*, 29(4):225-32.
- Marianne J. Bezaire and Ivan Soltesz (2013) Quantitative Assessment of CA1 Local Circuits: Knowledge Base for Interneuron-Pyramidal Cell Connectivity *Hippocampus*, 23(9): 751–785.
- Maroso M, Szabo GG, Kim HK, Alexander A, Bui AD, Lee SH, Lutz B, Soltesz I. (2016) Cannabinoid Control of Learning and Memory through HCN Channels. *Neuron*, 2;89(5):
- Marsicano G, Wotjak CT, Azad SC, Bisogno T, Rammes G, Cascio MG, Hermann H, Tang J, Hofmann C, Zieglgänsberger W, Di Marzo V, Lutz B. (2002) The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature*, 418(6897):530-4.
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346:561-564.
- McBain CJ, Freund TF, Mody I. (1999) Glutamatergic synapses onto hippocampal interneurons: precision timing without lasting plasticity. *Trends Neurosci*, 22(5):228-35.
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, Pertwee RG, Griffin G, Bayewitch M, Barg J, Vogel Z (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*, 50:83-90.
- Mechoulam R. (1986) The pharmacohistory of *Cannabis sativa* In: Mechoulam R (szerk.), *Cannabinoids as Therapeutic Agents*. CRC Press. pp. 1-19.
- Mechoulam R, Hanuš LO, Pertwee R, Howlett AC. (2014) Early phytocannabinoid chemistry to endocannabinoids and beyond. *Nat Rev Neurosci*, 15(11):757-64.
- Melis M, Perra S, Muntoni AL, Pillolla G, Lutz B, Marsicano G, Di Marzo V, Gessa GL, Pistis M (2004) Prefrontal cortex stimulation induces 2-arachidonoylglycerol-mediated suppression of excitation in dopamine neurons. *J Neurosci*, 24:10707-10715.

- Mitrophanov AY, Groisman EA. (2008) Positive feedback in cellular control systems. *Bioessays*, 30(6):542-55.
- Monory K, Blaudzun H, Massa F, Kaiser N, Lemberger T, Schutz G, Wotjak CT, Lutz B, Marsicano G (2007) Genetic dissection of behavioural and autonomic effects of Delta(9)-tetrahydrocannabinol in mice. *PLOS Biol*, 5:e269.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 365:61-65.
- Murataeva N, Straiker A, Mackie K. (2014) Parsing the players: 2-arachidonoylglycerol synthesis and degradation in the CNS. *Br J Pharmacol*, 171(6):1379-91.
- Navarrete M, Araque A. (2010) Endocannabinoids potentiate synaptic transmission through stimulation of astrocytes. *Neuron*,68(1):113-26.
- Nicolussi S, Gertsch J. (2015) Endocannabinoid transport revisited. *Vitam Horm*, 98:441-85.
- Nosyreva ED, Huber KM (2005) Developmental switch in synaptic mechanisms of hippocampal metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression. *J Neurosci*, 25(11):2992-3001.
- Nyilas R, Dudok B, Urban GM, Mackie K, Watanabe M, Cravatt BF, Freund TF, Katona I. (2008) Enzymatic machinery for endocannabinoid biosynthesis associated with calcium stores in glutamatergic axon terminals. *J Neurosci*, 28:1058-1063.
- Oades RD, Halliday GM. (1987) Ventral tegmental (A10) system: neurobiology. 1. Anatomy and connectivity. *Brain Res*, 434(2):117-65.
- Ohno-Shosaku T, Maejima T, Kano M. (2001) Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neuron*, 29(3):729-38.
- Ohno-Shosaku T, Kano M. (2014) Endocannabinoid-mediated retrograde modulation of synaptic transmission. *Curr Opin Neurobiol*, 29:1-8.
- Okamoto Y, Morishita J, Tsuboi K, Tonai T, Ueda N. (2004) Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *J Biol Chem*, 279:5298–5305.
- Okamoto Y, Morishita J, Tsuboi K, Tonai T, Ueda N. (2004) Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *J Biol Chem*, 279:5298–5305.

- Pamplona FA, Ferreira J, Menezes de Lima O Jr, Duarte FS, Bento AF, Forner S, Villarinho JG, Bellocchio L, Wotjak CT, Lerner R, Monory K, Lutz B, Canetti C, Matias I, Calixto JB, Marsicano G, Guimarães MZ, Takahashi RN. (2012) Anti-inflammatory lipoxin A4 is an endogenous allosteric enhancer of CB1 cannabinoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(51):21134-9.
- Pan B, Wang W, Long JZ, Sun DL, Hillard CJ, Cravatt BF, Liu QS. (2009) Blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis by selective monoacylglycerol lipase inhibitor 4-nitrophenyl 4-(dibenzo[d][1,3]dioxol-5-yl(hydroxy)methyl) piperidine-1-carboxylate (JZL184) enhances retrograde endocannabinoid signaling. *J Pharmacol Exp Ther*, 331:591-597.
- Pan B, Wang W, Zhong P, Blankman JL, Cravatt BF, Liu QS. (2011) Alterations of endocannabinoid signaling, synaptic plasticity, learning, and memory in monoacylglycerol lipase knock-out mice. *J Neurosci*, 31(38):13420-30.
- Papini S, Sullivan GM, Hien DA, Shvil E, Neria Y. (2015) Toward a translational approach to targeting the endocannabinoid system in posttraumatic stress disorder: a critical review of preclinical research. *Biol Psychol*, 104:8-18.
- Pertwee RG, Howlett AC, Abood ME, Alexander SP, Di Marzo V, Elphick MR, Greasley PJ, Hansen HS, Kunos G, Mackie K, Mechoulam R, Ross RA. (2010) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB₁ and CB₂. *Pharmacol Rev*, 62(4):588-631.
- Pignatelli M, Bonci A. (2015) Role of Dopamine Neurons in Reward and Aversion: A Synaptic Plasticity Perspective. *Neuron*, 86(5):1145-57.
- Piomelli D. (2014) More surprises lying ahead. The endocannabinoids keep us guessing. *Neuropharmacology*, 76 Pt B:228-34.
- Puente N, Reguero L, Elezgarai I, Canduela MJ, Mendizabal-Zubiaga J, Ramos-Uriarte A, Fernández-Espejo E, Grandes P. (2015) The transient receptor potential vanilloid-1 is localized at excitatory synapses in the mouse dentate gyrus. *Brain Struct Funct*, 220(2):1187-94.
- RÁCZ B, Weinberg RJ. (2013) Microdomains in forebrain spines: an ultrastructural perspective. *Mol Neurobiol*, 47(1):77-89.

- Rani Sagar D, Burston JJ, Woodhams SG, Chapman V. (2012) Dynamic changes to the endocannabinoid system in models of chronic pain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 367(1607):3300-11.
- Regehr WG, Carey MR, Best AR. (2009) Activity-dependent regulation of synapses by retrograde messengers. *Neuron*, 63:154–70.
- Riegel AC, Lupica CR. (2004) Independent presynaptic and postsynaptic mechanisms regulate endocannabinoid signaling at multiple synapses in the ventral tegmental area. *J Neurosci*, 24(49):11070-8.
- Robbe D, Kopf M, Remaury A, Bockaert J, Manzoni OJ. (2002) Endogenous cannabinoids mediate long-term synaptic depression in the nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 8384–8388.
- Roeper J. (2013) Dissecting the diversity of midbrain dopamine neurons. *Trends Neurosci*, 36(6):336-42.
- Rouach N, Nicoll RA. (2003) Endocannabinoids contribute to short-term but not long-term mGluR-induced depression in the hippocampus. *Eur J Neurosci*, 18(4):1017-20.
- Ruehle S, Rey AA, Remmers F, Lutz B. (2012) The endocannabinoid system in anxiety, fear memory and habituation. *J Psychopharmacol*, 26(1):23-39.
- Scoville WB, Milner B. (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 20(1):11-21.
- Sheng M, Hoogenraad CC. (2007) The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. *Annu Rev Biochem*, 76:823-47.
- Simon GM, Cravatt BF. (2006) Endocannabinoid biosynthesis proceeding through glycerophospho-N-acyl ethanolamine and a role for alpha/beta-hydrolase 4 in this pathway. *J Biol Chem*, 281:26465-26472.
- Simon GM, Cravatt BF. (2008) Anandamide biosynthesis catalyzed by the phosphodiesterase GDE1 and detection of glycerophospho-N-acyl ethanolamine precursors in mouse brain. *J Biol Chem*, 283:9341-9349.
- Somogyi J, Baude A, Omori Y, Shimizu H, El Mestikawy S, Fukaya M, Shigemoto R, Watanabe M, Somogyi P. (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*, 19(3):552-69.
- Somogyi P, Hodgson AJ, Smith AD, Nunzi MG, Gorio A, Wu JY. (1984) Different populations of GABAergic neurons in the visual cortex and hippocampus of cat contain somatostatin- or cholecystokinin-immunoreactive material. *J Neurosci*, 4(10):2590-603.
- Stella N, Schweitzer P, Piomelli D. (1997) A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature*, 388:773-778.
- Stempel AV, Stumpf A, Zhang HY, Özdoğan T, Pannasch U, Theis AK, Otte DM, Wojtalla A, Rácz I, Ponomarenko A, Xi ZX, Zimmer A, Schmitz D. (2016) Cannabinoid Type 2 Receptors Mediate a Cell Type-Specific Plasticity in the Hippocampus. *Neuron*, 90(4):795-809.
- Sugiura T, Kishimoto S, Oka S, Gokoh M (2006) Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. *Prog Lipid Res* 45:405–446.
- Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K. (1995) 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 215:89-97.
- Suh J, Rivest AJ, Nakashiba T, Tominaga T, Tonegawa S. (2011) Entorhinal cortex layer III input to the hippocampus is crucial for temporal association memory. *Science*, 334(6061):1415-20.
- Südhof TC. (2013) Neurotransmitter release: the last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron*, 80(3):675-90.
- Szabadics J, Varga C, Molnár G, Oláh S, Barzó P, Tamás G. (2006) Excitatory effect of GABAergic axo-axonic cells in cortical microcircuits. *Science*, 311(5758):233-5.
- Szabo B, Müller T, Koch H (1999) Effects of cannabinoids on dopamine release in the corpus striatum and the nucleus accumbens in vitro. *J Neurochem*, 73(3):1084-9.
- Szabó GG, Lenkey N, Holderith N, Andrási T, Nusser Z, Hájos N. (2014) Presynaptic calcium channel inhibition underlies CB₁ cannabinoid receptor-mediated suppression of GABA release. *J Neurosci*, 34(23):7958-63.

- Tanaka J, Nakagawa S, Kushiya E, Yamasaki M, Fukaya M, Iwanaga T, Simon MI, Sakimura K, Kano M, Watanabe M. (2000) Gq protein alpha subunits Galpha and Galpha11 are localized at postsynaptic extra-junctional membrane of cerebellar Purkinje cells and hippocampal pyramidal cells. *Eur J Neurosci*, 12(3):781-92.
- Tanda G, Pontieri FE, Di Chiara G. (1997) Cannabinoid and heroin activation of mesolimbic dopamine transmission by a common mu1 opioid receptor mechanism. *Science*, 276(5321):2048-50.
- Tanda G, Munzar P, Goldberg SR. (2000) Self-administration behavior is maintained by the psychoactive ingredient of marijuana in squirrel monkeys. *Nat Neurosci*, 3(11):1073-4.
- Tang AH, Alger BE. (2015) Homer protein-metabotropic glutamate receptor binding regulates endocannabinoid signaling and affects hyperexcitability in a mouse model of fragile X syndrome. *J Neurosci*, 35(9):3938-45.
- Tanimura A, Yamazaki M, Hashimoto Y, Uchigashima M, Kawata S, Abe M, Kita Y, Hashimoto K, Shimizu T, Watanabe M, Sakimura K, Kano M (2010) The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol produced by diacylglycerol lipase alpha mediates retrograde suppression of synaptic transmission. *Neuron* 65:320-327.
- Tasic B, Menon V, Nguyen TN, Kim TK, Jarsky T, Yao Z, Levi B, Gray LT, Sorensen SA, Dolbeare T, Bertagnoli D, Goldy J, Shapovalova N, Parry S, Lee C, Smith K, Bernard A, Madisen L, Sunkin SM, Hawrylycz M, Koch C, Zeng H. (2016) Adult mouse cortical cell taxonomy revealed by single cell transcriptomics. *Nat Neurosci*, 19(2):335-46.
- Tóth K, Freund TF. (1992) Calbindin D28k-containing nonpyramidal cells in the rat hippocampus: their immunoreactivity for GABA and projection to the medial septum. *Neuroscience*, 49(4):793-805.
- Tsuboi K, Ikematsu N, Uyama T, Deutsch DG, Tokumura A, Ueda N. (2013) . Biosynthetic pathways of bioactive N-acylethanolamines in brain. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 12(1):7-16.

- Tsutsumi T, Kobayashi T, Ueda H, Yamauchi E, Watanabe S, Okuyama H (1994) Lysophosphoinositide-specific phospholipase C in rat brain synaptic plasma membranes. *Neurochem Res* 19:399–406.
- Uchigashima M, Narushima M, Fukaya M, Katona I, Kano M, Watanabe M. (2007) Subcellular arrangement of molecules for 2-arachidonoyl-glycerol-mediated retrograde signaling and its physiological contribution to synaptic modulation in the striatum. *J Neurosci*, 27:3663-3676.
- Uchigashima M, Yamazaki M, Yamasaki M, Tanimura A, Sakimura K, Kano M, Watanabe M.(2011) Molecular and morphological configuration for 2-arachidonoylglycerol-mediated retrograde signaling at mossy cell-granule cell synapses in the dentate gyrus. *J Neurosci*, 31(21):7700-14.
- Vallée M, Vitiello S, Bellocchio L, Hébert-Chatelain E, Monlezun S, Martin-Garcia E, Kasanetz F, Baillie GL, Panin F, Cathala A, Roullot-Lacarrière V, Fabre S, Hurst DP, Lynch DL, Shore DM, Deroche-Gamonet V, Spampinato U, Revest JM, Maldonado R, Reggio PH, Ross RA, Marsicano G, Piazza PV. (2014) Pregnenolone can protect the brain from cannabis intoxication. *Science*, 343(6166):94-8.
- van de Giessen E, Weinstein JJ, Cassidy CM, Haney M, Dong Z, Ghazzaoui R, Ojeil N, Kegeles LS, Xu X, Vadhan NP, Volkow ND, Slifstein M, Abi-Dargham A. (2016) Deficits in striatal dopamine release in cannabis dependence. *Mol Psychiatry*,.
- Varma N, Carlson GC, Ledent C, Alger BE. (2001) Metabotropic glutamate receptors drive the endocannabinoid system in hippocampus. *J Neurosci* 21:RC188.
- Vizi ES, Kiss JP, Lendvai B. (2004) Nonsynaptic communication in the central nervous system. *Neurochem Int*, 45(4):443-51.
- Wang H, Lupica CR. (2014) Release of endogenous cannabinoids from ventral tegmental area dopamine neurons and the modulation of synaptic processes. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 52:24-7.
- Wenger T, Moldrich G, Furst S. (2003) Neuromorphological background of cannabis addiction. *Brain Res Bull*, 61(2):125-8.
- Wettschureck N, van der Stelt M, Tsubokawa H, Krestel H, Moers A, Petrosino S, Schutz G, Di Marzo V, Offermanns S. (2006) Forebrain-specific inactivation of

- G(q)/G(11) family G proteins results in age-dependent epilepsy and impaired endocannabinoid formation. *Mol Cell Bio*, 26:5888-5894.
- Wheeler DW, White CM, Rees CL, Komendantov AO, Hamilton DJ, Ascoli GA. (2015) Hippocampome.org: a knowledge base of neuron types in the rodent hippocampus. *Elife*, 4. pii: e09960..
- Wilson RI, Kunos G, Nicoll RA (2001) Presynaptic specificity of endocannabinoid signaling in the hippocampus. *Neuron*, 31:453-62.
- Wilson RI, Nicoll RA. (2001) Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature*, 410:588-592.
- Yager LM, Garcia AF, Wunsch AM, Ferguson SM. (2015) The ins and outs of the striatum: role in drug addiction. *Neuroscience*, 301:529-41.
- Yoshida T, Fukaya M, Uchigashima M, Miura E, Kamiya H, Kano M, Watanabe M (2006) Localization of diacylglycerol lipase- α around postsynaptic spine suggests close proximity between production site of an endocannabinoid, 2-arachidonoyl-glycerol, and presynaptic cannabinoid CB1 receptor. *J Neurosci* 26:4740-4751.
- Yoshino H, Miyamae T, Hansen G, Zambrowicz B, Flynn M, Pedicord D, Blat Y, Westphal RS, Zaczek R, Lewis DA, Gonzalez-Burgos G. (2011) Postsynaptic diacylglycerol lipase mediates retrograde endocannabinoid suppression of inhibition in mouse prefrontal cortex. *J Physiol*, 589(Pt 20):4857-84.
- Zimmer A, Zimmer AM, Hohmann AG, Herkenham M, Bonner TI. (1999) Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96:5780-5785.
- Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sorgard M, Di Marzo V, Julius D, Hogestatt ED. (1999) Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*, 400:452-457.
- Zygmunt PM, Ermund A, Movahed P, Andersson DA, Simonsen C, Jönsson BA, Blomgren A, Birnir B, Bevan S, Eschalier A, Mallet C, Gomis A, Högestätt ED. (2013) Monoacylglycerols activate TRPV1--a link between phospholipase C and TRPV1. *PLoS One*, 8(12):e81618.

XI. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Az értekezés témáját adó saját közlemények:

Péterfi Z*, Urbán GM*, Papp OI, Németh B, Monyer H, Szabó G, Erdélyi F, Mackie K, Freund TF, Hájos N, Katona I. (2012) Endocannabinoid-mediated long-term depression of afferent excitatory synapses in hippocampal pyramidal cells and GABAergic interneurons. **Journal of Neuroscience**, 32(41):14448-63.

*=megosztott első szerző

Mátyás F, Urbán GM, Watanabe M, Mackie K, Zimmer A, Freund TF, Katona I. (2008) Identification of the sites of 2-arachidonoylglycerol synthesis and action imply retrograde endocannabinoid signaling at both GABAergic and glutamatergic synapses in the ventral tegmental area. **Neuropharmacology**, 54(1):95-107.

Katona I, Urbán GM, Wallace M, Ledent C, Jung KM, Piomelli D, Mackie K, Freund TF. (2006) Molecular composition of the endocannabinoid system at glutamatergic synapses. **Journal of Neuroscience**, 26(21):5628-37.

Az értekezés témájától független közlemények:

Nyilas R, Dudok B, Urbán GM, Mackie K, Watanabe M, Cravatt BF, Freund TF, Katona I. (2008) Enzymatic machinery for endocannabinoid biosynthesis associated with calcium stores in glutamatergic axon terminals. **Journal of Neuroscience**, 28(5):1058-63.

Berghuis P, Rajnicek AM, Morozov YM, Ross RA, Mulder J, Urbán GM, Monory K, Marsicano G, Matteoli M, Cauty A, Irving AJ, Katona I, Yanagawa Y, Rakic P, Lutz B, Mackie K, Harkany T. (2007) Hardwiring the brain: endocannabinoids shape neuronal connectivity. **Science**, 316(5828):1212-6.

XII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban témavezetőmnek, Freund Tamás professzornak tartozom köszönettel a munkám során nyújtott támogatásért és a rengeteg tanácsért, valamint azért, hogy lehetővé tette, hogy a KOKI-ban dolgozhassak.

Köszönöm tanítómesteremnek, Katona Istvánnak annak a lehetőségét, hogy a Molekuláris Neurobiológiai Kutatócsoport tagjává válhattam. Rengeteg gyakorlati és elméleti tudást kaptam Tőle és a tudományos munkához való olyan hozzáállást, mely bármilyen kutatási területen hasznomra válhat majd.

Köszönettel tartozom az Agykéreg Kutatócsoport, a Molekuláris Neurobiológiai Kutatócsoport és a Hálózat-idegéletani Kutatócsoport valamennyi munkatársainak a hasznos tanácsokért és a közös tanulmányainkban az értékes együttműködésért.

Köszönöm a Molekuláris neurobiológiai Kutatócsoport tagjainak, kiemelten Dudok Barnának, Ludányi Anikónak és Nyilas Ritának a sok segítséget és a hatékony munkához szintén nagyon fontos jó hangulatú mindennapokat.

Köszönöm az Agykéreg Kutatócsoport tagjának, Mátyás Ferencnek a közös munkánk során nyújtott segítségét. Szeretnék köszönetet mondani a kutatómunka technikai hátterének biztosításáért és a fontos módszertani alapok türelmes megtanításáért Lengyel Katalinnak. Köszönöm a szintén sok technikai segítséget Goda Gyözőnek és Iványi Katalinnak.

Köszönettel tartozom külföldi kollégáinknak és együttműködő partnereinknek Kwang-Mook Jung-nak, Catherine Ledent-nek, Ken Mackie-nek, Danielle Piomellinek, Andreas Zimmernek, Masahiko Watanabe-nak az antitestek és genetikailag módosított egérvonalak rendelkezésünkre bocsátásáért.

Végül, de nem utolsó sorban hálásan köszönöm családomnak a munkában és a dolgozat megírásában nyújtott segítséget és támogatást. Köszönöm férjemnek, aki mindvégig támogatott és hitt bennem és akinek támogatása nélkül ez a munka nem jöhetett volna létre. Gyermekeimnek, akik drukkoltak és türelmesen túrték, hogy helyettük a dolgozatom megírásával foglalkozzam és a nagymamáknak, akik pedig sokszor erejükön felül dolgoztak azon, hogy a gyerekek ne érezzék annyira édesanyjuk hiányát.