

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**A GLUTATION, A NITROZOG GLUTATION ÉS A CISZTEIN
NEUROMODULÁTOR ÉS NEUROTRANZMITTER SZEREPE
A KÖZPONTI IDEGRENSZERBEN**

HERMANN ANDRÁS



**DEBRECENI EGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
ÁLLATANATÓMIAI ÉS ÉLETTANI TANSZÉK**

**UNIVERSITY OF TAMPERE
MEDICAL SCHOOL
BRAIN RESEARCH CENTER**

DEBRECEN, 2002

TARTALOMJEGYZÉK	1
RÖVIDÍTÉSEK	5
1. BEVEZETÉS	7
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	10
2.1. A glutamát-receptorok; alosztályok és altípusok	
2.1.1. Ionotrop receptorok	
2.1.1.1. NMDA-receptorok	
2.1.1.1.1. Szerkezet és klónozás	
2.1.1.1.2. Farmakológia és lokalizáció	
2.1.1.1.3. Az NMDA-receptorok működése	
2.1.1.2. AMPA-receptorok	
2.1.1.2.1. Szerkezet és klónozás	
2.1.1.2.2. Farmakológia és lokalizáció	
2.1.1.2.3. Az AMPA-receptorok működése	
2.1.1.3. Kainát-receptorok	
2.1.1.3.1. Szerkezet és klónozás	
2.1.1.3.2. Farmakológia és lokalizáció	
2.1.1.3.3. A kainát-receptorok működése	
2.1.2. Metabotrop glutamát-receptorok	
2.2. A glutation	
2.2.1. A glutation metabolizmusa és funkciója	
2.2.2. A glutation a központi idegrendszerben	
2.2.3. A glutation neuromodulátor szerepe	
2.2.3.1. A glutation hatása az ionotrop glutamát-receptorokon	
2.2.3.1.1. Az NMDA-receptoron kifejtett hatások	
2.2.3.1.2. A nem-NMDA-receptorokon kifejtett hatások	
2.2.3.2. A glutation hatása neurotranszmitterek felszabadulására és felvételére	
2.2.4. A glutation lehetséges neurotranszmitter szerepe	
2.2.4.1. A neurális sejtválaszok módosítása glutationnal	
2.2.4.2. A triciált glutationkötődés: GSH-receptor?	
2.3. A nitrogén-monoxid	
2.3.1. A nitrogén-monoxid képződése	
2.3.2. A nitrogén-monoxid-szintáz	
2.3.2.1. A nitrogén-monoxid-szintáz aktivációja és lokalizációja	
2.3.3. Az NMDA-receptorok és az NO kölcsönhatása	
2.3.4. A Janusz-arcú nitrogén-monoxid: celluláris hatásmechanizmus	
2.3.5. A nitrogén-monoxid szerepe a neurotoxicitásban	
2.3.6. A nitrogén-monoxid neuroprotektív hatásai	
2.3.7. A nitrozoglutation	
2.4. A cisztein	
3. CÉLKITŰZÉSEK	32

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK33

- 4.1. Preparatív eljárások
 - 4.1.1. Kísérleti állatok
 - 4.1.2. Szinaptikus plazmamembrán preparálása
 - 4.1.3. Kisagyi szemcsejtenyésztés
 - 4.1.4. A membránfehérjék kémiai módosítása
 - 4.1.4.1. A ciszteinil-oldalláncok kémiai módosítása
 - 4.1.4.2. A diszulfidhidak redukálása
 - 4.1.4.3. Az arginil-oldalláncok módosítása
 - 4.1.4.4. A karboxilcsoportok módosítása
- 4.2. Vizsgálómódszerek
 - 4.2.1. Kötődésvizsgálatok
 - 4.2.1.1. [³H]Glutamátkötődés
 - 4.2.1.2. [³H]Kainátkötődés
 - 4.2.1.3. [³H]Fluorowillardiin-kötődés
 - 4.2.1.4. [³H]CPP-kötődés
 - 4.2.1.5. [³H]Dizocilpin-kötődés
 - 4.2.1.6. [³H]Glutation-kötődés
 - 4.2.2. A kalciumfelvétel vizsgálata
 - 4.2.3. Az intracelluláris Ca²⁺-szint mérése
- 4.3. Számolási módszerek és statisztikai analízis

5. EREDMÉNYEK 41

- 5.1. A nitrozoglutation kölcsönhatása az ionotrop glutamátreceptorokkal
- 5.2. A szinaptikus plazmamembránban glutationspecifikus kötőhelyeinek jellemzése
 - 5.2.1. A [³H]GSH-kötődés jellemzői
 - 5.2.2. A glutamátszármazékok és glutamátreceptor-ligandumok hatása a [³H]GSH kötődésére
 - 5.2.3. A glicin- és a GABA-receptor ligandumok hatása a [³H]GSH kötődésére
 - 5.2.4. A cisztein, a ciszteinszármazékok és a szulfhidril vegyületek hatása a [³H]GSH kötődésére
 - 5.2.5. Dipeptidek hatása a [³H]GSH kötődésére
 - 5.2.6. A glutationszármazékok hatása a [³H]GSH kötődésére
- 5.3. A membránfehérje aminosav-oldalláncainak szerepe a glutation kötődésében
 - 5.3.1. A tiolcsoportokat és a diszulfidhidakat módosító vegyületek hatása a glutation kötődésére
 - 5.3.2. Az arginil-oldalláncok kémiai módosításának hatása a [³H]GSH kötődésére
 - 5.3.3. A glutamil- és aszpartil-oldalláncok módosításának hatása a [³H]GSH kötődésére
- 5.4. Az L-cisztein hatása a glutamáttal és NMDA-val kiváltott neuronális Ca²⁺-beáramlásra és az intracelluláris Ca²⁺-szint emelkedésére
 - 5.4.1. A cisztein kölcsönhatása az NMDA-receptorral

5.4.2.	A cisztein hatása a Ca ²⁺ -homeosztázisra	
6.	DISZKUSSZIÓ	49
6.1.	A GSNO kölcsönhatása az ionotrop glutamát receptorokkal	
6.2.	A glutation kötődése szinaptikus plazmamembránhoz	
6.3.	Egyes aminosav-oldalláncok szerepe a glutation kötődésében	
6.4.	Az L-cisztein hatása az NMDA-receptor-mediált Ca ²⁺ -beáramlásra és az intraneuronális Ca ²⁺ -szintre	
7.	ÖSSZEFOGLALÁS	55
8.	IRODALOMJEGYZÉK	56
9.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	87
10.	FÜGGELÉK	89

RÖVIDÍTÉSEK

[³ H]CGP	DL-(E)-2-[³ H]amino-4-propil-5-foszfono-3-pentenoát
[³ H]FWD	(S)-5-fluoro[³ H]willardiin
1NP	1-nitrozo-pirrolidin
ADP	adenozin-difoszfát
ALS	amiotrofiás laterál szklerózis
AMPA	α-Amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazol-propionát
APV	D,L-2-amino-5-foszfonovalerát
BSA	bovin-szérum-albumin
CAM-KII	Ca ²⁺ -kaldmodulin II.
CEE	cisztein-etilészter
cGMP	ciklikus guanozin monofoszfát
CME	cisztein-metilészter
CNQX	6-ciano-7-nitroquinoxalin-2,3-dion
CPP	3-((R,S)-karboxipiperazin-4-il)-propil-1-foszfónát
CSA	cisztein-szulfonsav
DAG	diacil-glicerol
D-AP5	D-2-amino-5-foszfonovalerát
DCG IV	(2S,2'R,3'R)-2-(2',3'-dikarboxi-ciklopropil)glicin
DCQX	6,7-dikloro-quinoxalin-2,3-dion
DDP	4,4-dithio-dipiridil
DMSO	dimetilszulfid
DNQX	6,7-dinitro-quinoxalin-2,3-dion
DTNB	5,5-dithio-bis-2-nitro-benzoát
DTT	D,L-dithiotreitol
EDC	1-etil-3-(3-dimetil-amino-propil)karbodimiide
EDTA	etiléndiamin-szulfonát
EPSP	excitatorikus posztzinaptikus potenciál
FAD	flavin-adenin-dinukleotid
FMN	flavin-mononukleotid
GABA	γ-amino-vajsav
GAPDH	gliceralhid-3'-foszfát-dehidrogenáz
GluR	AMPA/kainát receptor alegység
GPX	glutation-peroxidáz
GSA	glutation-szulfonsav
GSH	glutation
GSNO	S-nitrozoglutation
GSSG	oxidált glutation
HA-966	1-hidroxi-3-amino-2-pirrolidon
HEK293	humán vesesejt
HEPES	N-2-hidroxi-etil-piperazin-N'-2-etánszulfonát
IP ₃	inozitol-trifoszfát
ISDN	izosorbit-dinitrát
KA	kainát
KIR	központi idegrendsze
KRH	Krebs-Ringer-Hepes
L-AP3	L(+)-2-amino-3-foszfonopropionát

L-AP4	L(+)-2-amino-4-foszfоновajsav
L-AP5	L(+)-2-amino-5-foszfonovalerát
L-NAME	L-Nitro-arginin-metil-észter
L-NARG	NG-Nitro-L-arginin
L-SOP	L-szerin-O-foszfát
LTD	hosszútávú gátlás
LTP	hosszútávú serkentés
MNQX	5,6-dinitroquinoxalin-2,3-dion
MK-801	dizocilpin
N	aszparagin
NAC	N-acetilcisztein
NBQX	6-nitro-7-szulfamoilbenzol(f)-quinoxalin-2,3-dion
NEM	N-etil-maleimid
NMDA	N-metil-D-aszpartát
NOS	nitrogén-monoxid-szintáz
NTP	nitroglicerín
PCP	fenciklidin
PGO	fenilglioxál
PI	foszfinozitol
PITC	fenil-izotiocianát
PKC	protein kináz C
PLA2	foszfolipáz2
PSD	posztzinaptikus denzitás
Q	glutamin
R	arginin
SBG	S-butylglutation
S-DHPG	S-3,5-dihidroxifenilglicin
SEG	S-ethylglutation
SIN1	3-morfolino-szidonimin
SMG	S-methylglutation
SNAP	S-nitroso-N-acetil-penicilamin
SOD	szuperoxid-dizmutáz
SpeG	S-pentylglutation
SPG	S-propylglutation
TES	2-(3-hidroxil-1,1-bisz(hidroximetil)etil)-aminoetán-szulfonát
TM	transzmembrán
transz-ACPD	transz-1-aminociklopentán-1,3-dikarboxilát

1. BEVEZETÉS

Az emlősök valamennyi egyede rendelkezik azzal a képességgel, hogy a külvilágból és szervezetének belső környezetéből információkat vegyen fel, specifikus szöveteiben feldolgozza és azokra „célszerű” biológiai válaszokat adjon. E biológiai feladatra specifikusan differenciált szövet, az idegrendszer szolgál, amelynek elemi egysége a neuron. Az idegműködés alapvető működése a reflex. A környezet kémiai és fizikai változásait (ingereit) a receptorsejtek érzékelik, és azokra specifikus ingerületi folyamatot generálnak a sejtekben. Valamennyi idegsejt elektromos jelet használ, amely sztereotip, függetlenül attól, hogy érző információt szállít vagy specifikus agyterületeket köt össze. Az ingerület áttevődik más neuronokra, és végül a célsejtekre. Az ingerület terjedése sejtközötti kapcsolatokon, a szinapszisokon keresztül valósul meg. Kémiai-, elektromos és vegyes típusú szinapszisokat ismerünk. Az emlősök idegrendszerében az információátadás valamennyi szinapszisban kémiai úton, hasonló módon zajlik. A preszinaptikus neuron kémiai vegyületeket, transzmittereket szabadít fel, amelyek a posztzinaptikus sejtek felszínén elhelyezkedő specifikus receptorfehérjékkel kölcsönhatva valamilyen sejtválaszt hoznak létre.

A célsejtekre gyakorolt hatásuk alapján az ingerületátvivő anyagok lehetnek serkentők és gátlók. A klasszikus transzmitterek -mint az acetilkolin és a noradrenalin- mellett bizonyítottan más biogén aminok, aminosavak és peptidok, sőt a gázhalmazállapotú nitrogén-monoxid (NO) és a szén-monoxid (CO) is szerepet játszanak az idegsejtek egymás közötti, valamint a neuronok és a gliasejtek közötti információátvitelében. Az emlősök központi idegrendszerében az aminosav típusú transzmitterek játsszák a legfontosabb szerepet. Serkentő transzmitterként a glutaminsav és az aszparaginsav, a legfőbb gátlóként pedig a γ -aminovajsav (GABA) működik. A glicin az agytörzsben és a gerincvelőben a GABA-hoz hasonlóan gátló mediátor, a központi idegrendszer más területein viszont a glutaminsav hatását potenciórozva serkentő funkciót tölt be. Az idegvégződésekből felszabaduló glutamát és aszpartát pre- és posztzinaptikus hatásait a plazmamembránok integráns részét képező ionotrop és metabotrop receptorok közvetítik, amelyek száma és affinitása agyterületenként és sejtípusonként más és más. Farmakológiai, elektrofiziológiai és molekulárbiológiai eredmények alapján mindkét típusú receptorcsalád további altípusokra különíthető el. Az ionotrop receptorcsaládba tartoznak a specifikus ligandumairól elnevezett N-metil-D-aszpartát (NMDA), kainát (KA) és α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazolpropionát (AMPA) receptorok, melyek aktiválása többnyire depolarizációt, helyi membránpotenciál-változást vált ki, a posztzinaptikus receptorok intracelluláris doménjén keresztül pedig a citoplazmatikus fehérje-fehérje kölcsönhatások révén számos jelátvivő mechanizmust indíthatnak el. A metabotrop receptorok aktiválása az intracelluláris G-proteineken keresztül az inozitolfoszfát, a cAMP és más intracelluláris hírvivő molekulák koncentrációját változtatva lassúbb, de hosszabban tartó választ vált ki.

A GABA az agy valamennyi területén, elsősorban az interneuronokban található meg. Hatását farmakológiailag különböző receptorokon fejti ki. A GABA-receptorok aktiválása rendszerint a neuronok ingerlékenységének csökkenéséhez vezet. A GABA_A- és GABA_C- receptorok aktiválása Cl⁻-beáramlást és következményes hiperpolarizációt hoz létre, ami gátolja az idegsejtek működését, szedációt és izomtónus-csökkenést okoz.

Mai ismereteink alapján a serkentő glutamáterg transzmisszió az emlősök idegrendszerében szerepet játszik az ideg- és a gliasejtek differenciálódásában és növekedésében, az interneuronális kapcsolatok kialakításában, az érző információk feldolgozásában, az agy éber állapotának fenntartásában, a mozgáskoordinációban, a megismerési, a tanulási és a memóriafolyamatokban, valamint az érzelmi reakciókban, mint például a szorongás és a stressz. A fentiek alapján nyilvánvaló, hogy a glutamáterg transzmisszióban bekövetkező kóros elváltozások az életfunkciók és a magasabbrendű

idegtevékenység zavarát idézhetik elő. Az idegsejtek aktivitását a glutaminsav és a GABA által létrehozott ingerlő és gátló hatások eredője határozza meg. Az ingerlés-gátlás egyensúlyának tartós felborulása kóros állapotokhoz és végül sejtpusztuláshoz vezet. Állatkísérletek és klinikai adatok alátámasztják, hogy az extracelluláris glutamát koncentrációjának fiziológias szintet meghaladó emelkedése a glutamáterg végkészülékek túlzott aktiválásával excitotoxikussá válhat (pl. akut agyi iszkémiás és hipoglikémiás állapotokban). Szerepet tulajdonítanak a glutamátnak a krónikus neurodegeneratív kórképek, így az epilepszia, a skizofrénia, a Parkinson-kór, az Alzheimer-kór, a Huntington-betegség, az olivo-pontocerebelláris atrófia és az amiotrófiás laterálszklerózis (ALS) patogenezisében is.

Az élettani és a kóros folyamatok megismeréséhez, valamint a neuropszichiátriai betegségek gyógyításához elengedhetetlenül szükséges az ingerületátvivő anyagok szerepének, molekuláris hatásmechanizmusának és a központi idegrendszeri neurotranszmisszió szabályozásának pontosabb ismerete.

Az elmúlt évtizedben bizonyossá vált, hogy a viszonylag kis molekulatömegű peptidok (pl. az endorfinok, a vazointesztinális peptid (VIP), a neuropeptid Y (NPY), a kolecisztokinin (CCK)) és a peptid típusú releasing hormonok is rendelkeznek idegrendszeri szabályozó szereppel. Ezek a peptid-mediátorok gyakran a klasszikus transzmitterekkel együtt, de más-más típusú vezikulákban tárolva található meg ugyanazokban a neuronokban. Depolarizáció során a felszabadult peptidok kotranszmitterként vagy neuromodulátorként a klasszikus transzmitterekkel együtt fejthetik ki hatásukat a célsejten, erősítve vagy éppen gyengítve azok hatását. Az utóbbi 25-30 évben számos neuroaktív aminosavat tartalmazó, viszonylag kis molekulatömegű, endogén di- és tripeptidet izoláltak az agyszövetből. Bár szerkezetüket felderítették, pontos funkciójukat napjainkig sem tisztázták.

A γ -glutamil-ciszteinil-glicin (GSH) egy filogenetikusan ősi tripeptid. Az endogén GSH az élővilág szinte valamennyi sejtjében számos metabolikus funkcióval rendelkezik, így például redox reakciók kofaktora, antioxidáns, részt vesz a xenobiotikumok metabolizmusában, a leukotriének szintézisében, a DNS-szintézisben és hibajavító (repair) mechanizmusában, az aminosavak, a fémionok membránokon keresztüli és az egyes kötőfehérjék közötti transzportjában. A GSH-molekulát alkotó aminosavak neuroaktívak, közülük a glutamát és a glicin neurotranszmitter. A cisztein pontos szerepe nem tisztázott, ezért vizsgálni kívántuk az NMDA-függő Ca^{2+} -beáramlásra és az intracelluláris Ca^{2+} -szint változására gyakorolt hatását. A GSH-t kémiai szerkezete alkalmassá teszi arra, hogy neuromodulátorként és neurotranszmitterként egyaránt működhessen. A glutation valóban módosítja a glutamáterg neurotranszmissziót az ionotrop glutamát receptorokkal való kölcsönhatása révén, valamint a receptorok szelektív agonistáival kiváltott neuronális Ca^{2+} -válasz és a neurotranszmitter-felszabadulás szabályozásával. Irodalmi adatok alapján bizonyosra vehető, hogy a GSH képes megkötni az NO-t is, így glutation-nitrogén-monoxidként (GSNO) megnövelheti az NO életidejét, és a keletkezés helyétől távolabb elhelyezkedő effektorokhoz is képes eljuttatni azt. Az NO retrográd neurotranszmitterként modulálja az NMDA-receptorfehérjén keresztül a sejtválaszokat, így szerepet játszik a jelátviteli mechanizmusokban. Mivel a GSH és származékai kölcsönhatnak a glutamát receptorokkal, ezért azt kívántuk megvizsgálni, hogy a GSNO is befolyásolja-e a glutamáterg receptorok ligandumainak kötődését. Amennyiben hatással van a kötődésre, úgy a GSH-hoz hasonlóan a GSNO is neuromodulátorként működhet.

Amellett, hogy a GSH kölcsönhatásba lép a glutamát receptorokkal és ott neuromodulátor szerepet tölt be, receptorkötődési és elektrofiziológiai vizsgálatok alapján feltételezhető volt, hogy más membránfehérjékkel is kölcsönhatásba léphet, esetleg önálló receptormal is rendelkezhet a központi idegrendszerben. Mivel a GSH megfelel a feltételezett transzmitterekkel szemben támasztott számos követelménynek, azt kívántuk megvizsgálni, hogy valóban rendelkezik-e a glutamát receptoroktól eltérő, saját kötőhellyel, amihez kötődve befolyásolhatja az ingerületátvitelt. Mivel szinaptikus plazmamembránban találtunk ilyen kötőhelyeket, további

feladat volt, hogy jellemezzük a glutation kötődését ezekhez a helyekhez. Ezen belül megvizsgáltuk, hogy a GSH-molekulában, valamint a GSH-t kötő fehérje (fehérjék) oldalláncában lévő ciszteinnek szerepe van-e a peptid és a kötőfehérje kölcsönhatásában. A cisztein-oldalláncok mellett a kötőfehérje kémiai módosításával más oldalláncok szerepét is tisztázni kívántuk. Az évtizedek alatt felhalmozódó óriási mennyiségű információ ellenére számos központi idegrendszeri részfolyamat hiányos. Alapkutatás jellegű munkánkkal a GSH és származékai neurotranszmisszióban betöltött szerepét kívántunk pontosabban megismerni.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A GLUTAMÁTRECEPTOROK; ALOSZTÁLYOK ÉS ALTÍPUSOK

Az emlősök idegrendszerében számos szerkezetileg és farmakológiailag eltérő receptort azonosítottak savas aminosavak számára. Ezen receptorok közös endogén liganduma az L-glutamát és az L-aszpartát (Collingridge és Lester, 1989; Nakanishi, 1992). A glutamát-receptorok két nagy családja az ionotrop és a metabotrop glutamát-receptorok. Az ionotrop receptorok a membránok integráns fehérjéi. Több alegységből épülnek fel, és kationokra szelektív ioncsatornát képeznek. Az ionotrop receptorok N-metil-D-aszpartát (NMDA), 2-amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazolpropionát (AMPA) és kainát (KA) receptorokra oszthatók, amelyek nevüket szintetikus agonistáik után kapták (Monaghan, 1989; Watkins és mtsai, 1990; Récasens és mtsai, 1992). Az AMPA és a kainát-receptorokat nem-NMDA-receptorokként is emlegetik. A metabotrop glutamát-receptorok intracelluláris GTP-kötő fehérjékhez kapcsolódnak, és a sejtválaszokat az inozitol-foszfolid metabolizmusának (Conn és Désai, 1991) vagy a ciklikus nukleotidok szintézisének befolyásolásával hozzák létre (Nakanishi, 1992; Monaghan és Wenthold, 1997).

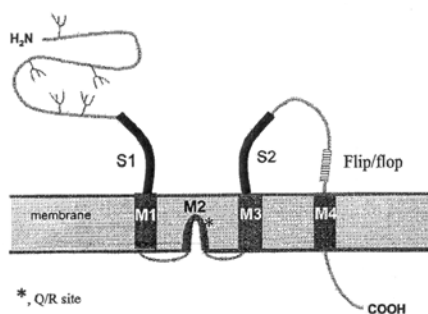
2.1.1. Ionotrop receptorok

2.1.1.1. NMDA-receptorok

2.1.1.1.1. Szerkezet és klónozás

A natív NMDA-receptorok heterodimer felépítésűek, legalább kétféle, NMDAR1 és NMDAR2A-D alegységből tevődnek össze. Ezeket az alegységeket két géncsalád kódolja (NR1 és NR2A-D), amelyeket egérből, patkányból és emberből is klónoztak (Moriyoshi és mtsai, 1991; Ikeda és mtsai, 1992; Kutsuwada és mtsai, 1992; Monyer és mtsai, 1992; Yamazaki és mtsai, 1992b; Ishii és mtsai, 1993; Le Bourdallés és mtsai, 1994; Hollmann és Heinemann, 1994). Az NMDAR1 alegység 8 változata (1a/b-4a/b) ismert (Hollmann és mtsai, 1993; Zukin és Bennett, 1995), amelyek főleg az extracelluláris N-terminális és az intracelluláris C-terminális aminosavsorrendjében különböznek egymástól. Az NMDAR2A-D alegységeket négy különböző gén kódolja. Az alegységek közös tulajdonsága a hosszú intracelluláris C-terminális domén. Ezen potenciális foszforilációs helyek találhatóak (Chen és Huang, 1992; Hollmann és Heinemann, 1994). Így egyes protein-kinázok (pl. a protein kináz C), valamint a CAM-KII és egyes foszfatázok (pl. a kalcineurin) részt vesznek a szinaptikus plaszticitás folyamataiban, például a hosszú távú potenciózásban (LTP) vagy gátlásban (LTD) (Wang és Feng, 1992). Az ingerlési frekvencia és az ingerléskor intracellulárisan jelenlévő Ca^{2+} mennyiségének függvényében az NMDA-receptorokon keresztül beáramló Ca^{2+} mindkét folyamatot megindíthatja (Mulkey és Malenka, 1992). A magas posztszinaptikus intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció a potenciózást segíti elő, amíg az alacsonyabb koncentráció gátlást hoz létre. Az ionotrop glutamát-receptor-alegységek az extracelluláris N-terminális és az intracelluláris C-terminális mellett három, a membránt átszelő hidrofób domént (M1, M3, M4) és egy, a membránban lévő domént (M2) tartalmaznak (Henley 1994; Hollmann és Heinemann, 1994; Wo és mtsai, 1995; Hirai és mtsai, 1996; Sutcliffe és mtsai, 1996; Paas, 1998). Az M2 domén egy, az intracelluláris oldalon belépő és a membránon belül visszahajló szakasz, amely az ioncsatorna falát képezi, hasonlóan, mint a P szegmens a feszültségfüggő K^{+} - és a ciklikus nukleotid-vezérelt csatornák esetén (Bennett és Dingle, 1995; Kuner és mtsai, 1996). Az extracelluláris N-terminális M1 domént közvetlenül megelőző szakasza (S1), valamint az M3 és az M4 domén közti hurok (S2) tartalmazza a ligandumkötésért felelős oldalláncokat (O'Hara és

mtsai, 1993; Kuusinen és mtsai, 1995; Tygesen és mtsai, 1995; Chen és Gouaux, 1997). Ezek a szakaszokon kiválasztott egyes aminosavak célzott, indukált mutagenézise felfüggeszti a ligandumok kötődését (Kuryatov és mtsai, 1994; Hirahi és mtsai, 1996; Laube és mtsai, 1997). Az összes glutamát-receptor alegység M2 régiójának egy kitüntetett helyén (ún. Q/R/N helyén) glutamin, arginin vagy aszparagin aminosavak találhatóak. Az NMDA-receptor-alegységek M2 régiójában ezen a helyen egy aszparagil-oldallánc van, ami az NMDA-receptor-ionoforra jellemző Ca^{2+} -szelektivitásért felelős. Az NMDAR1 alegységben az aszparagin glutaminnal való helyettesítése a Ca^{2+} -permeabilitás csökkenésével jár. Viszont ugyanez a helyettesítés az NMDAR2 alegységben a Mg^{2+} -blokk megszűnéséhez vezet (Burnashev és mtsai, 1992).



1. ábra. Az ionotrop glutamát-receptor alegységek transzmembrán topológiája.

2.1.1.1.2. Farmakológia és lokalizáció

Az NMDA-receptor alegységek olyan receptor-ioncsatorna komplexet képeznek a membránban, amely Ca^{2+} -ra szelektív, de kisebb mértékben Na^- és K^- ionokat is átenged. A komplexen számos kötőhely van.

1., Serkentő aminosavagonista kötőhely az endogén L-glutamát, L-aszpartát, L-homociszteát, L-ciszteinszulfínát és kvinolinát, valamint a szintetikus NMDA számára (Collingridge és Lester, 1989; Récasens és mtsai, 1992; Stone, 1993). Ehhez a helyhez kötődnek a kompetitív antagonisták is, pl. az L-2-amino-5-foszfonovalerát (APV) és a 3-((RS-karboxipiperazin-4-il)-propil-1-foszfónát (CPP).

2., Sztrichnin-inszenzitív glicinkötő koaktivátorhely, ahova a glicin mellett a D-szerin és a D-alanin is kötődhet. Ez a kötőhely blokkolható a glicin-analóg parciális agonista 1-hidroxi-3-amino-2-pirrolidonnal (HA-966), valamint az antagonisták kinurenáttal, a 7-klorokinurenáttal és a 6,8-dinitroquinoxalindionnal (MNQX).

3., A csatornán belül az intracelluláris felszínhez közel található egy Mg^{2+} -kötőhely, ami az ioncsatorna feszültségfüggő blokkolásában játszik szerepet (Nowak és mtsai, 1984).

4., Fenciklidin (PCP) kötőhely, amely szintén a csatornában foglal helyet. Ehhez más, nem kompetitív NMDA-antagonista disszociatív anesztetikumok is kötődnek, pl. a ketamin, a dextorfán, a desipramin és az (+5)-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo(a,d)cikloheptén-5,10-imin hidrogén-maleát (MK-801, dizocilpin). Ezek a vegyületek a nyitott csatornába kötődnek, jelezvén annak aktivált állapotát (Anis és mtsai, 1983; Collingridge és Lester, 1989; Lodge és Johnson, 1990).

5., Zn²⁺-kötőhely, amely feszültségtől nem függő csatornablokkot közvetít (Peters és mtsai, 1987).

6., Poliamin kötőhelyek, amelyek putreszcint és endogén aktiváló hatású spermint és spermidint kötnek, valamint a poliamin-antagonista, protektív hatású ifenprodilt (Ransom és Stec, 1988; Carter és mtsai, 1989; Williams K. és mtsai, 1989; Lodge és Johnson, 1990).

7., Proton (H⁺) kötőhely, ahova bekötődve a proton a receptor allosztérikus gátlását hozza létre (Aizenmann és mtsai, 1989; Yoneda és mtsai, 1994).

A fentiekén kívül számos más anyag is befolyásolja az NMDA-receptorok működését, de hatásuk pontos helye még ismeretlen. Ilyenek: az etanol (Lovinger és mtsai, 1989, 1990; Buller és mtsai, 1995), a gangliozidok, az inzulin (Liu és mtsai, 1995) és a hisztamin (Vorobjev és mtsai, 1993). A két utóbbi stimuláló hatású. Mindezekén felül az NMDA-receptor több redox modulációs helyvel is rendelkezik. Köhr és mtsai (1994) rekombináns NMDA-receptor alegységeket expresszáltak humán embrió vesesejtben (HEK293). Az NR1/NR2 alegységet DTT-vel redukálták, és az alegységen két –egy gyors és egy lassú– redox modulációs helyet írtak le. A lassú redox modulációs komponensért két cisztein (cys744 és cys798) a felelős, amíg a gyors redox modulációs komponensért az NR2A N-terminális cys370. Az NR1/NR2B, az NR1/NR2C és az NR1/NR2D receptorok csak lassú redox modulációs helyet tartalmaznak. Paoletti és mtsai (1997), valamint Choi és mtsai (2000) arra következtettek, hogy a DTT potenciózó hatását nemcsak a gyors redox moduláló komponens redukálásával fejt ki, hanem a Zn²⁺ kelálásával is. A receptor aktivitását befolyásolhatják szabad oxigéngyökök és tiol-redox ágensek, pl. az endogén glutation és a nitrogén-monoxid is (Aizenmann és mtsai, 1989, 1990; Levy és mtsai, 1990; Sucher és Lipton, 1991; Lipton és mtsai, 1993; Sullivan és mtsai, 1994).

Mint korábban említettem, az NMDA-receptorok működését a C-terminálison lévő szekvenciák foszforilációja is szabályozza (Chen és Huang, 1992; Kutsuwada és mtsai, 1992; Tingley és mtsai, 1993; Roche és mtsai, 1994).

A receptoron lévő különböző kötőhelyek egymással kölcsönhatnak. Az agonista és a koagonista kötőhelyek között pozitív kooperáció áll fenn, az agonista glutamát és a koagonista glicin elősegíti egymás kötődését (Monaghan és mtsai, 1988). A glicin-analóg parciális agonista HA-966 aktiválja az NMDA-antagonista CPP kötődését (Compton és mtsai, 1990). Ugyanakkor előfordul, hogy az egyik kötőhely antagonistája gátolja egy másik kötőhelyen az agonista kötődését (Monaghan és mtsai, 1988; Kaplita és Ferkany, 1990; Monahan és mtsai, 1990). A receptorok heterogenitása miatt az NMDA-receptorok farmakológiája nagyon bonyolult. Az egyedfejlődés alatt az NMDA-receptorok kötőhelyeinek eloszlása változik, a felnőtt egyedeknél már jelentős helyi eltérést mutatnak. Különböző agyrégiókban például a CPP-t eltérő affinitással kötő helyek találhatóak (van Amsterdam és mtsai, 1992). A glicin-affinitás szintén régióként változik, legnagyobb a kisagyban (Sakurai és mtsai, 1993). A poliamin serkentő hatása is területenként változik, ami ugyancsak a receptorok heterogén eloszlására utal (Subramanian és McGonigle, 1991). A receptornak így két –agonista-, illetve antagonistá-preferáló– szubpopulációja vagy konformációs állapota létezhet (Monaghan és mtsai, 1988). Ezek aránya más és más az agy különböző területein. *Xenopus oocitán* expresszált rekombináns NMDA-receptorokkal végzett elektrofiziológiai tanulmányok szerint (Sugihara és mtsai, 1992) az NR2 alegységekből álló homomerek inaktívak, viszont az NR1 receptor alegységek funkcionális homomerek csatornákat alakítanak ki, amelyek nagyon sok tulajdonságukban hasonlítanak a natív NMDA-receptorokra. A receptorok között lényeges fiziológiai és farmakológiai eltérések vannak. Az eltérések oka az NR1 alegység különböző NR2 alegységekkel való kapcsolódása a natív receptorokban. Az NR1 alegység minden NMDA-receptornak alkotóeleme, és az agy egész területén megtalálható (Meguro és mtsai, 1992; Shigemoto és mtsai, 1992). Az NR2A-D alegységek eloszlása viszont jellegzetes képet mutat. Az NR2A alegység elsősorban az előagyban (agykéregben), a hippocampusban és a kisagyban fordul elő, és lokalizációja megfelel az antagonistá szubpopuláció lokalizációjának (Meguro és mtsai, 1992; Monyer és

mtsai, 1992). Az NR2B alegység főleg az előagyban található meg, az NR2C a kisagyban, míg az NR2D a köztiagyban és az alacsonyabb agyrégiókban lokalizálódik (Kutsuwada és mtsai, 1992; Meguro és mtsai, 1992; Monyer és mtsai, 1992). Stern és mtsai (1992, 1994) heteromerikus NMDA-csatornákon végzett kísérletei szerint a csatornák két nagy csoportja létezik: vannak magas és alacsony konduktanciájú ionofórok. Az NR1/NR2A és az NR1/NR2B alegységből felépülők képezik a magas, míg az NR1/NR2C és NR1/NR2D alegységekből felépülők az alacsony vezetőképességű csatornákat.

2.1.1.1.3. Az NMDA-receptorok működése

Az NMDA-receptor-ioncsatorna komplex az agonista glutamát és a koaktivátor glicin együttes hatásának következtében aktiválódik. Ha egyidejűleg a membrán depolarizált állapotba kerül, akkor megszűnik a feszültségfüggő Mg^{2+} -blokk, a csatorna kinyílik, és rajta Ca^{2+} -ionok áramlanak a sejtbe. A beáramló Ca^{2+} számos intracelluláris folyamatot indít el.

1., Aktiválja a foszfolipáz A2-t (PLA2), ez arachidonsavat hasít le, ami aztán preszinaptikusan fokozza a glutamát felszabadulását (Dumuis és mtsai, 1988), és gátolja a glutamát gliába való felvételét (Chan és mtsai, 1983). Így a posztszinaptikus Ca^{2+} -beáramlás fokozódik (Miller és mtsai, 1992).

2., A Ca^{2+} intracelluláris koncentrációjának növekedése aktiválja a nitrogén-monoxid-szintáz, ami nitrogén-monoxidot szabadít fel. Az NO fokozza a ciklikus-guanozin-3',5'-monofoszfát (cGMP) szintézisét a preszinaptikus végkészülékben, és onnan glutamátot szabadít fel (Garthwaite és mtsai, 1988).

3., Az ornitin-dekarboxiláz aktivációja poliaminok termelődését eredményezi. Ezek az NMDA-receptorokon keresztül további Ca^{2+} -beáramlást váltanak ki (Porcella és mtsai, 1992).

4., A protein-kináz C aktiválódik, foszforilálja a receptorfehérjét, és felfüggeszti annak Mg^{2+} -blokkját (Chen és Huang, 1992; Tingley és mtsai, 1993; Roche és mtsai, 1994).

5., Korai gének expresszálódnak, melyek transzkripciója szabályozza a célgén expresszióját. A potenciális célgének közt található például az apoptózist indukáló gének (Chen és mtsai, 1995).

Az emlősgagyban az NMDA-receptorok központi szerepet játszanak a használatfüggő szinaptikus plaszticitás különböző formáinak létrehozásában, így az LTP-ben és az LTD-ben. A szinaptikus plaszticitást a szinapszisban bekövetkező funkcionális és morfológiai változások határozzák meg, amelyek az információtárolás és a viselkedés alapjait képezik. Az NMDA-receptoroktól függő LTP kiváltásában két egyidejű jel, a preszinaptikus glutamátfelszabadulás és a posztszinaptikus membrán-depolarizáció játszik szerepet (Malgaroli, 1994; Kullmann és mtsai, 2000). Az LTP indukálásában a kulcsesemény a Ca^{2+} akkumulációja, illetve a Ca^{2+} -függő protein-kinázok aktiválása, amelyek elősegítik és modulálják az LTP kialakulását. Az LTP létrejöttében és/vagy modulációjában emellett retrográd transzmitterek is szerepet játszanak, pl. a nitrogén-monoxid (Zhuo és mtsai, 1993; Schuman és Madison, 1994), a szén-monoxid (Stevens és Wang, 1993) és az arachidonsav (Williams és mtsai, 1989). Az NMDA-receptorok tehát molekuláris időkapcsolóknak tekinthetők (Seeburg, 1993), mert csak az AMPA- és a kainátreceptorok ismétlődő stimulációjával létrejött tartós posztszinaptikus depolarizáció esetén jönnek működésbe, és ilyenkor kései serkentő posztszinaptikus potenciált (EPSP) generálnak. Az NMDA-receptorok ezáltal a pre- és posztszinaptikus neuronok szinkron aktivitásának szenzorai. Az aktivált NMDA-receptorokon a sejtbe áramló Ca^{2+} más ingerületátvivő anyagok felszabadulását is kiválthatja, például az acetilkolinét, a dopaminét (Cai és mtsai, 1991) és a noradrenalinét (Wang és mtsai, 1992).

2.1.1.2. AMPA-receptorok

2.1.1.2.1. Szerkezet és klónozás

Eddigi tudásunk szerint az AMPA-receptorok négy alegysége ismert (GluR1-4 vagy GluRA-D). Az alegységeket négy különböző gén kódolja, ezeket egérből, patkányból és emberből is klónozták. A GluR1 alegység 96-97%-os, amíg a másik három alegység csak 68-73%-os szekvenciahomológiát mutat a három fajban (Hollmann és Heinemann, 1994). Kimutatták, hogy mindegyik alegység a C-terminálishoz közel tartalmaz egy szakaszt, ami az AMPA-receptor deszenzitizációját szabályozza. Az alegységek két különböző elsődleges szekvenciával rendelkeznek ezen a szakaszon, ami az mRNS alternatív vágásából ered. Ezeket az alegységek flip és flop változatának nevezzük (Sommer és mtsai, 1990). A receptoralegységek aminosavsorrendjének összehasonlításából kiderült, hogy a GluR2 M2 régiójában egy R (arginin), amíg a többi alegység M2 régiójában egy Q (glutamin) található. Valójában az R (arginin) nem kódolódik a GluR2 alegység génjében, hanem mRNS szerkesztéssel az eredeti glutamin argininre cserélődik (Sommer és mtsai, 1991). Ez maga után vonja az ioncsatorna permeabilitásának megváltozását, és megmagyarázza a GluR2 alegység funkcionális dominanciáját az AMPA-receptor-csatorna komplexekben (Hume és mtsai, 1991). A GluR2 alegységet tartalmazó AMPA-receptor-ioncsatorna komplex kevésbé átjárható Ca^{2+} -ionok számára, viszont monovalens, főleg Na^{+} - és K^{+} -ionokra szelektív (Hollmann és Heinemann, 1994). Az AMPA-receptorok kapcsolatban állhatnak más fehérjékkel, bár ezekről nagyon keveset tudunk. A rekombináns alegységek funkcionális receptort alkothatnak, függetlenül attól, hogy ezek homomer vagy heteromer felépítésűek (Hollmann és Heinemann, 1994). Az alegységek az NMDA-receptorokhoz hasonló topológiát mutatnak. A membrán három transzmembrán domén (M1, M3, M4) szeli át, és egy (M2) domén hajtókanyarszerűen visszahajlik a membránban. Hasonlóan az NMDA- és kainátreceptorokhoz az AMPA-receptorok pontos sztöchiometriája sem ismert, de az valószínű, hogy heteromer felépítésűek, és négy vagy öt alegységből állnak.

2.1.1.2.2. Farmakológia és lokalizáció

Különböző receptoralegységekkel végzett rekombinációs kísérletekben azt találták, hogy az agonista ligandumok közül általában az AMPA a leghatásosabb, majd az L-glutamát és a kainát. Az L-glutamát sokkal hatásosabb a GluRA/B kombinációban, mint a GluRB/D-ben (Stein és mtsai, 1992). Az AMPA-receptorok szelektív ligandumai egyes AMPA-származékok (Krogsgaard-Larsen és mtsai, 1980), a természetes willardiin és származékai (Watkins és mtsai, 1990; Hawkins és mtsai, 1995), valamint a növényi eredetű β -N-oxalilamino-L-alanin és a β -N-metilamino-L-alanin (Gill és Lodge, 1997) is. Ezek mellett a kainátreceptoron is hatásos domoát és kviszkalát is agonista hatású. Rekombinációs kísérletekben a különböző alegység-variációk nem különböztek a kompetitív antagonisták 6-ciano-7-nitroquinoxalin-2,3-dion (CNQX) gátló hatására nézve, ugyanakkor a szulfamoil(f)quinoxalin (NBQX) esetében némi eltérést tapasztaltak (Stein és mtsai, 1992). A 6,7-dinitroquinoxalin-2,3-dion (DNQX) az előbb említett antagonistákkal együtt sokkal hatásosabb az AMPA-, mint a kainátreceptorokon. Az AMPA-receptorok kompetitív antagonistája továbbá a racém deka-hidroizoquinolin (LY215490) és annak aktív izomerje, az LY293558 is. Az AMPA-receptorok nemkompetitív antagonistái bizonyos barbiturátok (pl. a metohexiton, a pento- és a fenobarbitál) (Gill és Lodge, 1997) és az agriotoxin, ami a GluR1-, 3- és 4-es alegységre szelektív. Ez a toxin a nyitott AMPA-receptor-csatornát feszültségfüggő módon blokkolja (Herlitze és mtsai, 1993). Két további vegyület mutat szelektivitást a kainátreceptorokra, a 2,3-benzodiazepan GYKI 52466 és GYKI 53655 (Tarnawa és mtsai, 1990). Bizonyos poliaminok, mint a Joro pók mérge, szelektíven blokkolják

azt a receptorcsatornát, amelyik nem tartalmazza a GluR2 alegységet (Herlitze és mtsai, 1993; Blaschke és mtsai, 1993). Ez a toxin azon a Q/R/N helyen hat, amelyik a kalcium-szelektivitásért felelős. A toxin a szerkesztett változatot (R) nem blokkolja. Így segíthet azon idegsejtek azonosításában, amelyek kalciumra átjárható AMPA-receptorokat tartalmaznak. A GluR1 alegység az intracelluláris C-terminálison két helyen foszforilálható a ciklikus adenzin 3',5'-monofoszfát (cAMP)-függő PKC, és egy helyen a protein-kináz (PKA) által (Roche és mtsai, 1996). Ezen helyek foszforilálásával megváltozik a receptorcsatorna nyitvatartási ideje, a csatornanyitás valószínűsége és az érzékenysége. A receptor működéséhez glikolizációs helyek is hozzájárulnak, amelyek a receptoralegységek összeállítását szabályozzák, és fenntartják a receptor ligandumkötéshez szükséges konformációját (Kawamoto és mtsai, 1994; 1995). A GluR2 és a GluR3 alegységben öt, amíg a GluR1 és a GluR4 alegységben hat potenciálisan glikolizálható hely van (Hullebroeck és Hampson, 1992). A GluR1-4 receptoralegységek főleg posztzinaptikusan fordulnak elő (Petralia és Wenthold, 1992), bár a gerincvelőben a GluR1 és a GluR3 preszinaptikusan is megtalálható (Ye és Westlund, 1996). A kisagyi szemcsesejtek főleg GluR2 és GluR4 alegységeket expresszálnak, míg a Bergman-gliasejtek GluR1 és GluR4 alegységeket. A hippocampus CA1 régiója erős, amíg CA3 régiója gyenge GluR4 expressziót mutat (Keinänen és mtsai, 1990). A négy alegység flip és flop variációi is jellegzetes eloszlást mutatnak a központi idegrendszerben.

2.1.1.2.3. Az AMPA-receptorok működése

A GluR2 alegységet tartalmazó AMPA-receptorok felelősek a gyors serkentő ingerületátvitelért. A receptorok aktiválása maga után vonja a monovalens ionok beáramlásának növekedését. Az intracelluláris térbe jutva az ionok gyors depolarizációt váltanak ki, és gyors serkentő posztzinaptikus potenciált (EPSP) generálnak. Az AMPA- és az NMDA-receptorok együttes előfordulása (Nicoll és mtsai, 1990) felelős az NMDA-receptorok ismétlődő aktiválásáért, és az LTP létrehozásában játszhat szerepet. A GluR2 alegységet nem tartalmazó receptorok közvetlenül is szerepet játszhatnak az LTP kialakításában, mert ezek a receptorok nagy mennyiségű Ca^{2+} -iont képesek beengedni, ezáltal a receptorok aktiválása neurotranszmitter-felszabadulást is kiválthat (Iino és mtsai, 1990).

Az AMPA kiváltotta sejtválaszt allosztérikusan potenciórozó szerek tanulást segítő hatása felvetette, hogy néhány ilyen vegyület javíthatja a memóriazavarokat (Stäubli és mtsai, 1994). Az AMPA-receptor-antagonisták viszont védik a sejtet a globális és a helyi iszkémia okozta sejthalál ellen, és segíthetnek meggátolni a más traumák által kiváltott agyi sérüléseket is. Egyes AMPA-antagonisták antikonvulzáns hatással is rendelkeznek. Mivel az AMPA-receptorok a fiziológiás, gyors serkentő ingerületátvitelben játszanak döntő szerepet, ezért azok teljes gátlása nem kívánatos. Terápiásan azoknak az AMPA-receptor-alegységeknek a gátlása jöhet szóba, amelyek patológiás folyamatokban vesznek részt (Sheardown és mtsai, 1990).

2.1.1.3. Kainátreceptorok

2.1.1.3.1. Szerkezet és klónozás

A kainátreceptorok eddig ötféle alegységét klónozták: a GluR5 (Bettler és mtsai, 1990; Sommer és mtsai, 1992), a GluR6 (Egebjerg és mtsai, 1991) és a GluR7 (Bettler és mtsai, 1992) alegységeket, amelyek valószínűleg KA1 (Werner és mtsai, 1991) és KA2 (Herb és mtsai, 1992; Sakimura és mtsai, 1992) alegységekkel kombinálódnak. Expressziós kísérletekben (Bettler és mtsai, 1990; Sommer és mtsai, 1992) kimutatták, hogy a GluR5 és a GluR6 (Egebjerg és mtsai, 1991) alegységek funkcionális homomer csatornákat képeznek számos olyan tulajdonsággal, amelyekkel a natív receptorok rendelkeznek. A KA1 és a KA2 homomerek nagy affinitású

kötőhellyel rendelkeznek, de nem hoznak létre funkcionális ioncsatornát (Werner és mtsai, 1991; Herb és mtsai, 1992; Sakimura és mtsai, 1992). Biokémiai (Wenthold és mtsai, 1994; Puchalski és mtsai, 1994) és fiziológiai kísérletek (Sakimura és mtsai, 1992; Partin és mtsai, 1993) eredményei szerint a KA1 vagy a KA2 alegységek a GluR5 vagy a GluR6 alegységekkel heteromerikus csatornákat alkotnak. Nem találtak viszont bizonyítékot arra, hogy a GluR7 alegység részt venne homo- vagy heteromer funkcionális csatorna felépítésében (Lomeli és mtsai, 1992; Partin és mtsai, 1993), bár ez az alegység bizonyos sejtekben expresszáva (Bettler és mtsai, 1992) olyan kainátkötő helyeket hozott létre, amelyek affinitása összehasonlítható a GluR5 vagy a GluR6 alegységeivel. A GluR5 és a GluR6 alegységek RNS-szerkesztésen eshetnek át, amely módosíthatja az általuk képzett ioncsatorna permeabilitását (Sommer és mtsai, 1991; Köhler és mtsai, 1993). Az AMPA-receptor GluR2 alegységéhez hasonlóan (Sommer és mtsai, 1991) a GluR5 és a GluR6 alegységek genomikus szekvenciája glutamint (Q) kódol a feltételezett pórusformáló régióban, ami argininre (R) cserélhető az RNS szerkesztésével, mielőtt az mRNS-fehérjébe átíródna. A GluR2-vel éles ellentétben (Hume és mtsai, 1991; Burnashev és mtsai, 1992) a GluR6 szerkesztett (R) verziója sokkal jobban átjárható Ca^{2+} -ionok számára, mint a nemszerkesztett verzió (Q) (Köhler és mtsai, 1993), de csak akkor, ha az M1-ben is a szerkesztett változat található (Egebjerg és Heinemann, 1993). A Q/R hely mellett azonban a GluR6 mRNS két másik helye is áteshet szerkesztésen az M1-ben. A genomikus szekvencia izoleucint és tirozint kódol azon a helyen, ahol a szerkesztett változat valint és ciszteint tartalmaz (Köhler és mtsai, 1993). Ennek a két helynek a szerkesztése a GluR6(R) esetében nincs jelentős hatással, de a GluR6(Q)-ban bekövetkezett változás erősen csökkenti a Ca^{2+} -permeabilitást (Köhler és mtsai, 1993).

2.1.1.3.2. Farmakológia és lokalizáció

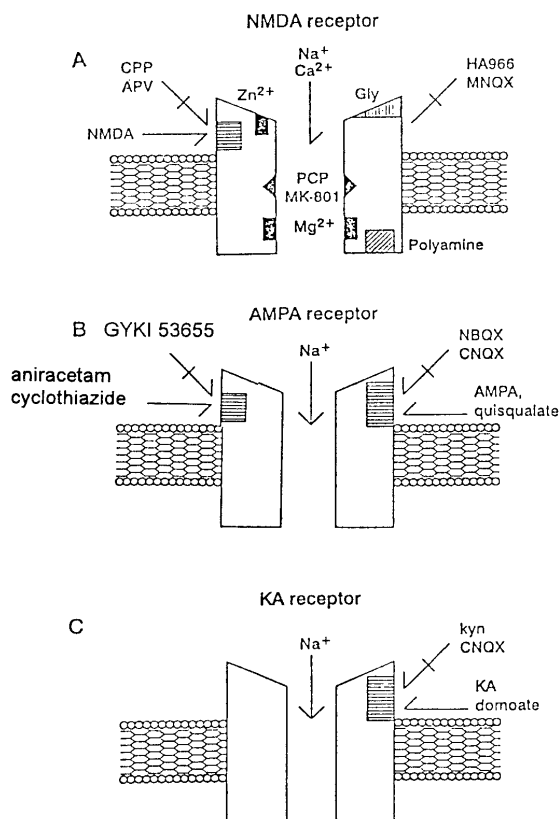
A kainát különböző receptoraltípusokat aktiválhat, beleértve az AMPA-receptorokat (Patneau és Mayer, 1991), a kainátreceptorokat (Agrawal és Evans, 1986; Huettner, 1990) és néhány fajban az alacsony molekulahúlyú kainátkötő fehérjéket (Henly, 1994). Az AMPA-receptorok közvetítik a gyors serkentő ingerületátvitelt a központi idegrendszerben (Monaghan és mtsai, 1989). Bár a kainát kisebb affinitással aktiválja ezeket a receptorokat, mint az AMPA, a glutamát vagy a kviszkalát, de sokkal nagyobb ionáramot hoz létre, mint a többi agonista (Patneau és Mayer, 1991). A kainátreceptorok szelektív agonistái a kainát és a domoát (Egebjerg és mtsai, 1991; Sommer és Seeburg, 1992), valamint agonista az (S)-5-trifluorometil-willardiin (Wang és mtsai, 1993). Kompetitív, nem szelektív antagonisták a CNQX és a DNQX. Natív és rekombináns KA-receptorok relatíve szelektív antagonistája az oxim NS-102 (Johansen és mtsai, 1993).

A kainátreceptorok elsődlegesen a striatumban, a thalamus nucleus reticularisában, a hipotalamusban, a gyrus dentatusban, a nagyagykéreg mély rétegeiben, a kisagyi szemcsesejtekben és a hippocampus CA3 régiójának stratum lucidum területén lokalizálódnak. Kainátreceptorok jelen lehetnek pre- (Coyle, 1983; Represa és mtsai, 1987; Petralia és mtsai, 1994) és poszt-szinaptikusan is (Gartwaite és Gartwaite, 1983; Petralia és mtsai, 1994).

2.1.1.3.3. A kainátreceptorok működése

A kainátreceptorok élettani szerepe a központi idegrendszerben nem teljesen tisztázott. Patkányokban a különböző kainátreceptor-alegységeket kódoló mRNS-ek szintje közvetlenül a születés után nagyon magas, ami azt sugallja, hogy ezek a receptorok fontos szerepet játszanak az idegi fejlődésben és a plaszticitásban (Bahn és mtsai, 1994). A preszinaptikus kainátreceptorok például a hippocampus CA3 régiójának moharost-termináljaiban (Represa és mtsai, 1987; Malva és mtsai, 1995) és a kisagyi párhuzamos pályákon (Petralia és mtsai, 1994) a

transzmitterek felszabadulását szabályozhatják (Chittajallu és mtsai, 1996). A posztszinaptikus membránban a kainátreceptorok (Huntley és mtsai, 1993; Petralia és mtsai, 1994) közvetlenül hozzájárulhatnak a serkentő posztszinaptikus áram létrehozásához (Paternain és mtsai, 1995). A szinaptikus plaszticitásban és bizonyos neurológiai kórképek patogenezisében jelentőséggel bírhat egyes receptormediált csatornák Ca^{2+} -áteresztőképesége. Ezek a receptorok a szinaptikus válaszok finomhangolásában is szerepet játszhatnak. Mindemellett a kainát erős neurotoxin. A kainátreceptorok aktiválása a hippocampus CA3 régiójában kiterjedt sejtpusztulást (Sucher és mtsai, 1991) és limbikus rohamokat okoz (Lothman és Collins, 1981).



2. ábra. Az ionotrop glutamát receptorok farmakológiai tulajdonságai. (A) NMDA-receptor, (B) AMPA-receptor, (C) kainátreceptor.

2.1.2. Metabotrop glutamát receptorok

A metabotrop glutamát receptorok GTP-kötő fehérjékhez (G-protein) kapcsolt membránreceptorok. Eddig nyolc (mGluR1-8) receptort klónoztak, amelyek szerkezete nagyon hasonlít egymásra. A hosszú extracelluláris aminoterminális láncrészt hét transzmembrán szakasz és egy intracelluláris C-terminális követi. A ligandumok az N-terminális szakasz azon részéhez kötődnek, amely szekvenciák baktériumok periplazmás aminosav-kötőhelyével homológok (O'Hara és mtsai, 1993). A metabotrop receptorok szekvenciahomológiájuk szerint három nagy csoportba oszthatók (Conn és Pin, 1997). Az I. csoportba az mGluR1 és az mGluR5 receptorok tartoznak, amelyek a foszfoinozitol hidrolízisén keresztül fejtik ki hatásukat. A

metabotrop receptorok II. csoportjának receptorai (mGluR2 és mGluR3), valamint a III. csoport receptorai (mGluR4 és mGluR5) az adenilát cikláz aktivitását gátolhatják. Ezen receptorok számos vágási változata létezik (Conn és Pin, 1997; Corti és mtsai, 1998). Az I. csoport receptorai foszfolipáz C-t (PLC) aktiválnak, ami inozitol-1,4,5-trifoszfát (IP₃) és diacil-glicerol (DAG) képződését eredményezi. Az IP₃ Ca²⁺-ot szabadít fel az intracelluláris raktárakból, amíg a DAG PKC-t aktivál (Conn és Desai, 1991). Ezen receptorok a K⁺-csatornák aktivitásának gátlásával fokozzák a sejt ingerlékenységét (Conn és Pin, 1997), de gátló hatását is megfigyelték, amit a Ca²⁺-aktivált K⁺-csatornák aktiválása eredményez (Fiorillo és Williams, 1998). A szinapszisokban pre- és posztzinaptikusan lokalizálódhatnak. A preszinaptikusan elhelyezkedő receptorok a Ca²⁺-csatornák gátlásával csökkentik a glutamátfelszabadulást, amíg a preszinaptikus K⁺-csatornák PKC-közvetítette gátlása fokozza azt. A posztzinaptikus mGluR1 receptorok PKC-t aktiválnak, ami az NMDA-receptorokat foszforilálja, így a receptorok fokozódó aktivitása LTP-t generálhat. Posztzinaptikusan elhelyezkedő receptorok lassú depolarizációt és kismértékű tüzelést váltanak ki a membránban, ami úgy tűnik, hogy a K⁺-áram G-protein közvetített gátlása útján valósul meg.

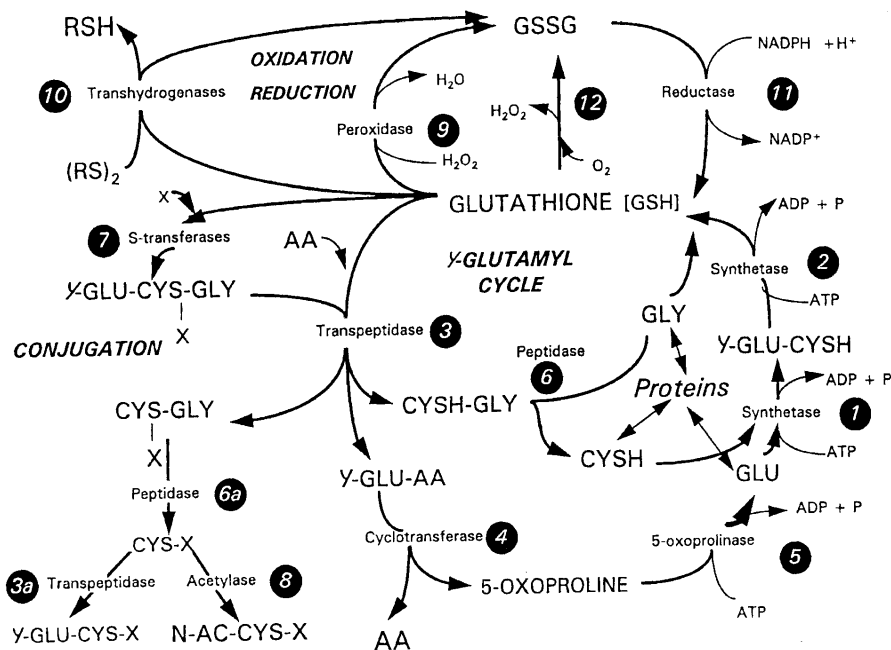
Az I. csoport receptorai L-glutamáttal, kvizskaláttal, ibotenáttal és trans-1-amino ciklopentán-1,3-dikarboxiláttal (trans-ACPD) aktiválhatók. Szelektív agonistájuk az S-3,5-dihidroxi-fenilglicin (S-DHPG). Gátlószereik az L-AP3 és az L-AP4. Szelektív gátlószerek az AIDA. A II. csoport receptorai (mGluR2 és mGluR3) L-glutamáttal és trans-ACPD-vel aktiválhatók, szelektív agonistájuk a DCGIV, míg a III. csoport receptorainak (mGluR4, 6, 7 és 8) szelektív agonistái az L-amino-4-foszfonobutirát (L-AP4) és az L-szerin-O-foszfát (L-SOP). A II. és a III. típusú receptorok főleg preszinaptikusan helyezkednek el, közülük az mGluR7 centrálisan, amíg az mGluR2 és az mGluR3 a szinapszis perifériáján található meg (Cartmell és Schoepp, 2000). E két csoport receptorai gátló autoreceptorok a glutamáterg preszinaptikus terminálokban. Aktiválódva az adenilát- és a guanilát-cikláz gátlásán keresztül csökkentik a cAMP és a cGMP szintet, de feltételezhető a közvetlen G-protein közvetítette Ca²⁺-csatornán keresztüli gátolhatóságuk is. Így gátolják a glutamát felszabadulását, és csökkentik az idegi aktivitást. A metabotrop glutamát receptorok különböző fajtái a gliasejteken is megtalálhatók (Mineff és Valtschanoff, 1999). A gliális ionotrop (AMPA és kainát), valamint a metabotrop (mGluR1, 5, 2, 3, 4 és 7) receptorok együttesen szabályozzák a gliális választ, és ezzel valószínűleg az ideg- és a gliasejtek közti kommunikáció szabályozásában vesznek részt (összefoglalók: Nakanishi, 1992; Pin és Duvoisin, 1995; Nicoletti és mtsai, 1996; Riedel, 1996).

2.2. A GLUTATION

2.2.1. A glutation metabolizmusa és funkciója

A γ -glutamil-ciszteinil-glicin (glutation, GSH) filogenetikailag az egyik legősibb peptid, az egész élővilágban gyakorlatilag minden sejtben megtalálható (Martin és MacIwain, 1959; Orłowski és Karkowsky, 1976). A GSH az öt felépítő aminosavakból a γ -glutamil ciklusban szintetizálódik, és aminosavakká történő lebomlása szintén e ciklusban zajlik. A tripeptid szintézisét a γ -glutamilcisztein-szintetáz és a glutation-szintetáz katalizálja két ATP-molekula segítségével. Mindkét enzim szubsztrátjainak és termékeinek kontrollja alatt áll. A szintetizált GSH negatív visszacsatolás révén a γ -glutamilcisztein-szintetázt gátolja, és szabályozza az intracelluláris GSH-koncentrációt is. A glutation lebomlását a membránhoz kötött γ -glutamil-transzferáz (γ -GT) enzim katalizálja, amely vagy a γ -glutamil kötést hidrolizálja, vagy a glutamátot szabad aminosavakra, peptidekre helyezi át. A keletkezett γ -glutamil-peptid a γ -glutamil ciklotranszferáz hatására 5-oxoprolinra, aminosavra, illetve peptidre hasad. A gyűrűs 5-oxoprolint az 5-oxoprolináz alakítja glutaminsavvá (Meister és Anderson, 1983; Deneke és

Fanburg, 1989). A glutation metabolizmusában résztvevő enzimek és a GSH előfordulása a központi idegrendszerben egymáshoz kapcsolt (Orlowski és Karkowsky, 1976).



3. ábra. A glutation metabolizmusa.

A GSH általános redox funkciói közismertek. Mint antioxidáns szabadgyökökkel reagál és védi a sejtet a radioaktív- és az UV-sugárzástól, valamint az oxidatív stressz okozta károsodástól. A glutation-peroxidáz-reakcióban (GPX) a peroxid lebontása során a glutation hidrogén-donorként szolgál és oxidálódik, a keletkezett GSSG pedig a glutation-reduktáz (GSR) által GSH-vá redukálódik. A glutation-S-tranzferáz (GST) szubsztrátjaként különböző xenobiotikumokkal konjugálódik, elősegítve azok eltávolítását a szervezetből (Meister és Anderson, 1983). A GSH számos más enzim kofaktora vagy szubsztrátja, és szabályozza a sejtciklust, valamint a sejtmetabolizmust (Kosower és Kosower, 1978; Meister, 1988; Max, 1989).

2.2.2. A glutation a központi idegrendszerben

A glutation (Reichelt és Fonnum, 1969; Slivka és mtsai, 1987a,b; Kirstein és mtsai, 1991), az S-metilglutation (SMG) (Kanazawa és mtsai, 1965) és a glutation-szulfonsav (GSA) (Li és mtsai, 1993b) az agyszövet endogén vegyületei. A glutation szöveti koncentrációja a KIR-ben 1,4-3,4 mM. Ennek 95%-a redukált formában van jelen (Slivka és mtsai, 1987a,b), de például oxidatív stresszben a GSSG aránya megnő (Folbergrova, és mtsai, 1979). Az SMG 0,1–0,2 mg/kg mennyiségben található a friss agyszövetben. A GSH megtalálható epitél-, glia- és idegsejtekben, de jelen van az extracelluláris térben is (Orlowski és Karkowsky, 1976). A cerebrospinalis folyadék GSH-koncentrációja mikromólos (Rehncrona és Siesjö, 1979). A peptidet a neuronokban az idegvégződéseken, az axonokban és a kisagy szemsesejtek kivételével az idegsejt perikarionjaiban is kimutatták (Slivka és mtsai, 1987a; Philbert és mtsai, 1991; Hjelle és mtsai, 1994). A GSH szintje sokkal magasabb differenciálódott

asztrocitatenyészetben, mint asztroblasztokban vagy idegsejttenyészetben (Raps és mtsai, 1989). Tenyésztett asztrociták mitokondriumaiban a glutation koncentrációja 8-20 mM (Jain és mtsai 1991; Yudkoff és mtsai, 1990). Immunocitokémiai módszerekkel GSH-ellenes specifikus antitestet alkalmazva azt találták, hogy az agyszövet gliasejtjeiben sem magasabb a GSH-koncentráció, mint az idegsejtokban, bár különböző agyterületeken változik a neuronális és gliális GSH koncentráció aránya (Hjelle és mtsai, 1998). A glutation a neuronokból és az asztrocitákból is felszabadul, de még nem ismert, hogy milyen módon (Raps és mtsai, 1989; Yudkoff és mtsai, 1990; Zängerle és mtsai, 1992). Feltételezik, hogy az asztrociták és az idegsejtek között GSH-transzport működik. A korai posztisztkémiás fázis alatt fokozódik a GSH felszabadulása (Andiné és mtsai, 1991; Wallin és mtsai, 1999), ami arra utalhat, hogy a GSH szerepet játszik az extracelluláris milió redox állapotának fenntartásában. Mivel a fenti kísérletekben nem határozták meg a redukált és az oxidált glutation arányát, nem zárható ki, hogy a sejtek oxidált glutationt is felszabadítanak. A GSSG-felszabadulás arra utalhat, hogy bizonyos körülmények között a sejtek nem képesek a normális intracelluláris redox állapot fenntartására. Ekkor a GSSG az extracelluláris tér felől módosíthatja az intracelluláris eseményeket.

Mivel a GSH-t felépítő három aminosav mindegyike neuroaktív, már korábban felmerült annak a lehetősége, hogy a fent említett általános funkciók mellett a GSH maga is neoromodulátorként vagy neurotranszmitterként működhet a KIR-ben.

2.2.3. A glutation neuromodulátor szerepe

2.2.3.1. A glutation hatása az ionotrop glutamát receptorokon

2.2.3.1.1. Az NMDA-receptoron kifejtett hatások

Az endogén glutamát valamennyi ionotrop és metabotrop glutamát receptorral kölcsönhat. A GSH, a GSSG és számos S-alkilált származéka a patkány szinaptikus plazmamembrán preparátumon gátolja a [³H]glutamát kötődését. Ez arra utal, hogy a GSH kölcsönhatásba lép glutamátkötőhelyekkel (Koller és Coyle, 1985; Ogita és mtsai, 1986; Ogita és Yoneda, 1987; Yoneda és mtsai, 1990; Ogita és mtsai, 1995; Varga és mtsai, 1997; Jenei és mtsai, 1998; Janáky és mtsai, 1998). A Na⁺ jelenlétében kimutatott hőmérséklet- és Cl⁻/Ca²⁺-függő kötődés nagy valószínűséggel a transzportáló fehérjékhez való kötődést reprezentálja (Pin és mtsai, 1994). Ezekben a kísérletekben is hatásosan gátolja a GSH a glutamát kötődését (Ogita és mtsai, 1986; Vincent és McGeer, 1980; Ogita és Yoneda, 1986), de a Na⁺-független kötődésben a GSH és származékai lényegesen hatásosabbak (Ogita és mtsai, 1986; Varga és mtsai, 1989, 1997; Janáky és mtsai, 1998, 1999; Jenei és mtsai, 1998). A GSH-hoz hasonlóan potenciális leszorítószereknek bizonyult a GSSG és más, glutamátot tartalmazó peptid is (Varga és mtsai, 1989, 1997; Janáky és mtsai, 1998, 1999; Jenei és mtsai, 1998). A GSH és a GSSG egyaránt gátolta a [³H]CPP (Yoneda és mtsai, 1990) és a [³H]CGP-kötődését (Ogita és mtsai, 1995; Pasqualatto, 1998) is az NMDA-receptor NMDA-felismerő doménjéhez, még hozzá nagyobb affinitással, mint ahogy ezek a ligandumok az NMDA kötődését gátolták. A fenti vegyületekhez hasonlóan a glutation S-alkil módosulatai (SMG, SEG, SPG, SpeG, SBG, GSA) is hatásosan leszorították a [³H]CPP-t (Jenei és mtsai, 1998). Mivel a GSH és S-alkil származékai egyaránt hatásosan gátolják az NMDA-receptor ligandjainak kötődését, megállapítható, hogy nem a cisztein-oldallánc szabad tiolosoportjainak, hanem minden bizonnyal a γ -glutamilcsoportnak van szerepe a kötődésben. Nem dönthető el viszont a fenti adatokból, hogy a GSH és származékai agonistákként vagy antagonistákként hatnak az NMDA-receptoron. Ogita és mtsai (1995) azt tapasztalták, hogy a GSH sokkal hatékonyabban gátolta az agonista [³H]glutamát, mint az antagonistista [³H]CGP kötődését. Úgy tűnik, hogy az NMDA-agonisták hatásosabbak az

agonisták leszorításában, mint az antagonistákéban, ezért a GSH-t Ogita és mtsai (1995) inkább NMDA-receptor-agonistának tartották. Funkcionális tesztekben azonban a ligandum koncentrációjától függően változik az agonista vagy antagonistá jelleg. A GSH mikromólos koncentrációban gátolta, míg magasabb koncentrációban fokozta az NMDA-kiváltotta neuronális választ (Janáky és mtsai, 1993, 1998, 1999). Ezt látszik alátámasztani az a tény is, hogy a GSH, a GSSG és a GSH alkil származékai koncentrációfüggő módon fokozzák a dizocilpin kötődését, ami viszont a glutamáthoz hasonlóan agonista hatást feltételez az NMDA-receptorokon. Ez a hatásuk NMDA-antagonistákkal (CGP, L-AP5) kivédhető, de nem befolyásolható glutamát-dehidrogenázzal (Ogita és mtsai, 1995), amiből arra következtethetünk, hogy a glutation hatásáért nem a potenciálisan belőle felszabaduló glutamát a felelős. A glutamát maximális aktiváló hatása mellett azonban sem a GSH, sem az alkil származékai nem fokozzák tovább a [³H]dizocilpin-kötődést. Ezek az adatok alátámasztják, hogy a GSH a γ -glutamils csoportja révén kötődik az NMDA-receptorok glutamátkötőhelyeihez (Ogita és mtsai, 1986; Varga és mtsai, 1989; Oja és mtsai, 1995; Janáky és mtsai, 1998, 1999).

A GSH és származékai mM-os koncentrációban a [³H]glicint és a glicin-antagonista [³H]kinurenátot is leszorítják a koaktivátor glicinkötőhelyekről (Ogita és mtsai, 1995; Varga és mtsai, 1997; Jenei és mtsai, 1998; Janáky és mtsai, 1998, 1999). Ezenfelül azt is tesztelték, hogy a GSH-nak és más tiolvegyületeknek milyen szerepe lehet az NMDA-receptorhoz kapcsolt ioncsatorna nyitásában (Yoneda és mtsai, 1990; Ogita és mtsai, 1995; Varga és mtsai, 1997; Jenei és mtsai, 1998; Janáky és mtsai, 1998). Tenyésztett patkány kortikális neuronokon az NMDA-receptor aktiválásával létrehozott áramot a DTT mint redukáló ágens jelentősen fokozta (Leslie és mtsai, 1992; Lipton, 1993; Lipton és Stamler, 1994), amíg az oxidáló 5'5-dithio-bis-nitrobenzoesav (DTNB) csökkentette, és megszüntette a DTT fokozó hatását. Az NMDA-val kiváltott Ca²⁺-áramot a GSH bifázisos módon befolyásolja: mikromólos koncentrációban gátolja, millimólos koncentrációban növeli. Aktiváló hatását az L-AP5 és a dizocilpin kivédi. Ez a bifázisos hatás azzal magyarázható, hogy a GSH nagy koncentrációban a DTT-hez hasonlóan redukálja az NMDA-receptor funkcionális tiols csoportjait, amíg mikromólos koncentrációban gátolja az agonista kötődését. A GSSG és az S-alkil glutationszármazékok, amelyek nem tartalmaznak szabad tiols csoportot, antagonistaként működnek (Janáky és mtsai, 1993).

2.2.3.1.2. A nem-NMDA-receptorokon kifejtett hatások

Számos endogén γ -glutamil-peptid gátolja a Na⁺-tól független [³H]AMPA és [³H]kainát kötődését szinaptikus plazmamembránban (Varga és mtsai, 1989, 1994). A GSH és a GSSG nagyobb affinitással kötődik az AMPA-receptorokhoz, mint a kainátreceptorokhoz (Jenei és mtsai, 1998). A GSH S-alkil származékai (SMG, SEG, SPG, SBG, SPeG és GSA) szintén nagy affinitással kötődnek az AMPA-receptorokhoz. A GSH ciszteinil oldalláncának alkilálása nem csökkentette nagy mértékben a vegyület affinitását, ami arra utal, hogy a ciszteinil oldallánc nem vesz részt a glutation kötődésében az AMPA receptorokhoz. Ugyanakkor a GSH tiols csoportjának alkilálása növeli a molekula AMPA-receptor szelektivitását a KA-receptorokkal szemben. Kinetikai vizsgálatok eredményei szerint nem egy tiszta kompetitív gátlásról (versengés a glutamátkötőhelyekért) van szó csupán, hanem a GSH, a GSSG és a glutationszármazékok allosztérikus kölcsönhatás révén is befolyásolhatják ezeket a receptorokat. Fiziológiás koncentrációban a GSH az NMDA-receptorok mellett az AMPA-receptorokon hat, ahol γ -glutamil oldalláncai révén kompetitíven és allosztérikusan leszorítja az endogén glutamátot. A GSH így részt vehet a neurotranszmisszió finomhangolásában, azáltal, hogy az AMPA-receptorok aktiválásakor bekövetkezett ionáram idejét megrövidíti.

2.2.3.2. *A glutation hatása a neurotranszmitterek felszabadulására és felvételére*

Werman és mtsai már 1971-ben leírták, hogy a GSH és a GSSG acetilkolin-felszabadulást vált ki a neuromuszkuláris jukcióban. Mind a GSH, mind a cisztein kiválthat glutamátfelszabadulást kisagyi szemcsesejtekből (Janáky és mtsai, 1998). A GSH és a GSSG is gátolja a Cl^- és Ca^{2+} -függő, hőmérséklet-érzékeny glutamátkötődést durva szinaptikus plazmamembránokhoz (Varga és mtsai, 1994), ami valószínűleg glutamátfelvételnek felel meg. Szinaptoszóma-frakcióban azonban a GSH fokozta a glutamát felvételét (Varga és mtsai, 1994). A GSH a striatumban fokozta a glutamát- és NMDA-indukálta dopaminfelszabadulást, de ugyanitt gátolta a K^+ -depolarizációval kiváltott dopaminfelszabadulást. Sem a GSH, sem a DTT nem befolyásolta hippocampális szeletekből az alap [^3H]GABA-felszabadulást. A DTT viszont koncentrációfüggő módon megemeli és meghosszabbítja a glutamát-aktiválta [^3H]GABA felszabadulását. Ez az aktiváló hatás dizocilpinnel és Mg^{2+} -mal gátolható (Janáky és mtsai, 1993, 1999). A DTT-vel ellentétben a GSH és a GSSG nem emeli a glutamát-agonistákkal kiváltott GABA-felszabadulást, sőt a DTT potenciórozó hatását kivédi. Ezen adatok arra utalnak, hogy bizonyos esetekben a GSH és a GSSG megakadályozhatja az erős redukálószer által kiváltott potenciálisan patológiás neurotranszmitter-felszabadulást (Pittaluga és Raiteri, 1992). Más neurotranszmitterek preszinaptikus felszabadulásának szabályozásában a GSH talán preszinaptikus receptorai révén is részt vesz. Ennek tisztázása azonban további kísérleteket igényel.

A fenti adatok alapján joggal állíthatjuk, hogy bár a GSH molekulatömege nagyobb és flexibilitása limitáltabb, mint a glutamáté, kölcsönhatásba lép a glutamátreceptorokkal és a transzportfehérjékkel. Ezenkívül a GSH ciszteinje befolyásolja a glutamátreceptorok és a transzportfehérjék redox állapotát is (Janáky és mtsai, 1993; Köhr és mtsai, 1994; Kiskin és mtsai, 1986; Terramani és mtsai, 1988; Aizenman és mtsai, 1989; Lazarewicz és mtsai, 1989; Sucher és mtsai, 1990; Tang és Aizenman, 1993). Ezek mellett redox vegyületek (pl. aszkorbinsav és nitrogén-monoxid) szintézisét és intracelluláris metabolizmusát is szabályozza (Aizenman és mtsai, 1990; Manzoni és mtsai, 1992b). A harmadik alkotórész, a glicin az NMDA-receptor-ionoforon koagonistaként hathat, bár a glicinkötőhelyekhez a GSH affinitása meglehetősen alacsony. A GSH tehát mint neuromodulátor befolyásolhatja a glutamátérg neurotranszmisszió részfolyamatait. Hatással lehet a serkentő aminosavak felszabadulására, idegi vagy gliális felvételére, valamint a pre- és posztszinaptikus glutamátreceptorokon keresztül a celluláris válasz kialakítására.

2.2.4. *A glutation lehetséges neurotranszmitter szerepe*

2.2.4.1. *A neurális sejtválaszok módosítása glutationnal*

Már a fent említett vizsgálatok során felmerült annak a lehetősége is, hogy a GSH nem csak neuromodulátor szereppel bírhat a KIR-ben. Patkányagyból preparált szövetszeleten (wedge technika, Harrison és mtsai, 1985) a GSH koncentrációfüggő módon depolarizációt vált ki (Shaw és mtsai, 1996, Pasqualatto és mtsai, 1998). Ezt a depolarizációt sem az AMPA-, sem az NMDA-receptor-antagonisták (DNQX, L-AP5) nem csökkentették. A GSH-kiváltotta depolarizáció tehát feltehetően nem a glutamátreceptor-ioncsatornán keresztül játszódik le. A GSH-kiváltotta depolarizáció Ca^{2+} -mentes közegben nem csökkent, de a Na^+ eltávolítása megszüntette azt. Tehát ezt a depolarizációt is a befelé irányuló Na^+ -áram hozza létre. A GSH-val kiváltott depolarizáció az inhibitorikus GABA-val részlegesen visszafordítható. Ezen adatok és a kötődésvizsgálatok (lásd később) eredményei alapján feltételezhető, hogy a GSH olyan receptor(ok)on keresztül fejt ki hatását, amely(ek) nagy valószínűséggel nem azonos(ak) az eddig ismert egyetlen glutamátreceptorral sem. Továbbá a cisztein-peptid struktúra szükséges a

hatáshoz. A GSH-ból származtatható dipeptidek (pl. a glutamil-cisztein, a ciszteinil-glicin), valamint más dipeptidek (pl. a ciszteinil-alanin, az aszpartil-cisztein) a GSH-hoz hasonlóan hatottak, és az L-AP5 nem gátolta az általuk kiváltott depolarizációt. A glutation-szulfonsav (GSA) és az S-metil-glutation (SMG) L-AP5-szenzitív módon depolarizálnak. A cisztein olyan potenciálváltozást hoz létre, mint az NMDA. A depolarizáció L-AP5-tel kivédhető. Ugyanilyen hatást váltanak ki a cisztein analógjai, az N-acetilcisztein (NAC), a cisztein-monoetil-észter (CEE) és a cisztein-metil-észter (CME) is. Az általuk létrehozott depolarizáció szintén felfüggeszthető L-AP5-tel. Az adatok alapján tisztán elkülöníthető egy GSH-kiváltotta „GSH-receptor-mediált” és egy cisztein-szerű „NMDA-receptor-mediált” hatás. Ezek az adatok azt támasztják alá, hogy a GSH membránpotenciál-változást létrehozó hatásában fontos szerepet játszik a ciszteinil-oldallánc. Tehát a KIR-ben a GSH feltehetően rendelkezik olyan kötőfehérjével, amelyhez hozzákötődve direkt vagy indirekt módon depolarizációt vált ki.

2.2.4.2. A triciált glutationkötődés : GSH-receptor?

A [³H]glutation az agyszövetből izolált plazmamembrán-frakcióhoz és a szövetszeletekhez nagy affinitással kötődik, és a kötőhelyekről nemjelölt GSH-val lezorzítható, tehát a GSH számára specifikus Na⁺-független kötőhelyet/receptort tételezhetünk fel. A triciált GSH-val végzett kötődésvizsgálatok (Ogita és Yoneda, 1987, 1988, 1989; Guo és Shaw, 1992; Guo és mtsai, 1992; Lanius és mtsai, 1993, 1994) azt mutatták, hogy a GSH-nak legalább két kötőhelye van a KIR-ben. Ezek közül az egyik viszonylag nagy affinitású, a másik kis affinitású. Ezen kötőhelyek viszont nem különíthetők el egyértelműen a glutamátkötőhelyektől. Ezért a glutamát-receptor-ligandumok szisztematikus alkalmazásával megpróbáltuk elkülöníteni a GSH kötőhelyét a glutamátkötőhelytől. A [³H]GSH kötőhelyei a KIR valamennyi vizsgált területén megtalálhatók. A kötőhelyek száma, illetve sűrűsége a retinában a legnagyobb, csökkenő denzitással fordulnak elő a hipotalamuszban, a striátumban, a gerincvelőben, a középagyban, a hid-nyúltvelőben, a hippocampusban, a kisagyban és az agykéregben (Ogita és Yoneda, 1987). Receptor-autoradiográfias módszerrel a retina fotoreceptoráiban és pigmenthámjában, a hippocampus gyrus dentatusában, a habenulában, a hipotalamuszban, a gerincvelőben és a neokortex egyes részeiben mutattak ki GSH-kötőhelyeket (Bains és mtsai, 1997; Shaw, 1998). Az asztrocitákon is található GSH-receptorok (Guo és Shaw, 1992; Guo és mtsai, 1992). [³H]GSH-kötőhelyeket számos perifériás szövetben, így az agyalapi mirigyben, a mellékvesében, a májban, a lépben, a vázizmokban és a szívben is kimutattak (Ogita és Yoneda, 1988).

2.3. A NITROGÉN-MONOXID

Az elmúlt két évtized során bebizonyosodott, hogy a gáz halmazállapotú, szabadgyök típusú nitrogén-monoxid (NO) fontos szerepet játszik az élővilág intercelluláris jelátviteli folyamataiban. Így például immunmediátor, a makrofágok baktériumölő és citotoxikus képességének fontos eleme. Az a felismerés, hogy az NO mediátor funkcióval rendelkezik a központi és a környéki idegrendszerben, alapvetően új irányokat szabott az idegrendszer-kutatásokban. Az NO olyan atipikus neurotranszmitter/neuromodulátor, amelynek féléletideje igen rövid, a szokásos transzmissziós folyamatokat megkerülve fejt ki hatását. Nem vezikulákban tárolódik, a képződés helyéről diffúzió révén jut el a célmolekulákhoz, és nem rendelkezik poszt-szinaptikus receptorral. Képződhet a preszinaptikus idegvégződésben, de a poszt-szinaptikus sejtben is. Hatását kifejtheti abban a sejtben, amelyben képződött, de gáz halmazállapotú vegyület lévén a biológiai membránokon is könnyen keresztüljut. Így a szinaptikus membránok receptorain kívül intracelluláris fehérjéken is közvetlenül hathat és

befolyásolhatja a jelátviteli folyamatokat. A perifériás beidegzés révén szabályozza az erek- és a gyomor-béltraktus simaizomsejtjeinek tónusát, ennek következtében a vérnyomást, az egyes szervek vérellátását, a gyomor-bél motilitását. A központi idegrendszerben módosíthatja a neurtranszmisszió szinte valamennyi folyamatát: a transzmitterek felszabadulását, visszavételét, a szinaptikus jelátvitelt, az agy fejlődését, a szinapszisok kialakulását és funkcionális megerősítését, a neuro- és szinaptikus plaszticitást. Részt vesz a tanulási folyamatok alapjául szolgáló hosszútávú megerősítő (LTP) és gátló folyamatokban (LTD), a szöveti károsodást kísérő hosszantartó fájdalom fenntartásában.

2.3.1. A nitrogén-monoxid képződése

Az NO a nitrogén-monoxid-szintáz (NOS) hatására, L-argininből két egymástól független lépésben képződik. Az első reakcióban az arginin kételektronos oxidációja révén N^ω-hidroxiarginin (NHA) intermedier képződik. Az enzimreakció emlékeztet a citokróm P450 által katalizált monooxygenáz reakcióra. Az NHA nitrogén-monoxiddá és citrulinná alakulása kevésbé tisztázott. Valószínű, hogy a második oxidációs lépéshez a NADPH és az NHA is egy-egy elektront szolgáltat. A hidroxilációt a biopterin felgyorsítja, a CO pedig gátolja. A NOS működéséhez feltétlen szükség van Ca²⁺-ra és kalmodulinra, valamint oxigénre. Az enzim aktiválásához elektrondonor és -akceptor kofermentekre, flavin-adenin-dinukleotidra (FAD), flavin-mononukleotidra (FMN) vagy adenin-dinukleotid-foszfátra (NADPH) is szükség van.

2.3.2. A nitrogén-monoxid-szintáz

Az elmúlt tíz évben molekulárbiológiai módszerekkel a nitrogén-monoxid-szintáz enzimek három nagy családját azonosították. Kettő közülük konstitutív, amelyek a központi idegrendszerben a neuronokban (nNOS) és az endotél sejtekben (eNOS) állandóan jelen vannak. Az indukálható iNOS a makrofágokban, a neutrofil granulocitákban, a hepatocitákban és a gliasejtekben, illetve a harántcsíkolt izomban található meg. Az nNOS 29 exonját találták meg a DNS-szekvenciában, ami a számos izoforma jelenlétét magyarázhatja. A különböző osztályokba sorolt klónozott enzimek aminosavsorrendjükben körülbelül 50%-os hasonlóságot mutatnak. Valamennyi NOS konzervatív szakaszán megtalálhatók a bázikus amfipátiás alfa-hélix kalmodulin-, a hem-, a NADPH-, az FMN- és a FAD-felismerő, illetve -kötőhelyek, valamint a protein-kinázok (PKA és PKC) foszforilációs szekvenciája (Bredt és mtsai, 1991a,b). A NOS-ok mintegy fele a C terminálisban erős hasonlóságot mutat patkány citokróm P450 reduktázzal (CPR) és szulfid-reduktázzal (Bredt és mtsai, 1991a), amelyek szintén tartalmaznak specifikus kötőhelyeket a NADPH, az FMN és a FAD számára. Az endoteliális NOS család enzimeit szarvasmarhából és emberből is klónozták (Lamas és mtsai, 1992; Sessa és mtsai, 1992; Janssens és mtsai, 1992; Marsden és mtsai, 1992). A két izoforma, 135 kDa molekulatömegű fehérje egymással 90%-os szekvenciaazonosságot mutat (Pollock és mtsai, 1991), a klónozott makrofág NOS- és az agyi NOS-szekvenciákkal viszont csak 50, illetve 60%-ost. Az aminoterminális szakaszon az eNOS mirisztilációs, illetve palmitoilációs szekvenciákat tartalmaz, amíg az nNOS olyan PDZ-szekvenciát, amely a membránokhoz való kötődést segíti elő. Az indukálható NOS látszólag elkülönült két izoformáját makrofágokból (Lowenstein és mtsai, 1992; Lyons és mtsai, 1992) és humán hepatocitákból izolálták (Geller és mtsai, 1993), amelyek primer szekvenciája egymással 80%-ban egyezik meg.

2.3.2.1. A nitrogén-monoxid-szintáz aktivációja és lokalizációja

Az iNOS-szabályozás elsősorban az enzim mennyiségének növekedése révén valósul meg. A szintézist különböző citokinek és mikrobiális antigének, lipopoliszacharidok fokozzák,

és már pár óra alatt megnő a fehérje expressziója, illetve az NO termelődése (Hibbs és mtsai, 1987). Az iNOS szorosan köti a kalmodulint, de az enzimaktivitást ugyanúgy, mint más NOS esetén is, az intracelluláris Ca^{2+} -szint változása határozza meg. A celluláris Ca^{2+} -szint növekedése elsősorban az intracelluláris raktárakból inozitol-trifoszfát receptorokon keresztül valósul meg (Knowles és mtsai, 1989; Bredt és Snyder, 1990).

Az agyi nNOS és eNOS enzimek aktivitása, illetve annak szabályozása kizárólag az intracelluláris Ca^{2+} -szint függvénye (Dawson és mtsai, 1998). A neuronális intracelluláris Ca^{2+} -szint növekedése származhat az NMDA-receptor vagy a feszültségfüggő Ca^{2+} -csatorna aktivációja révén az extracelluláris térből, de felszabadulhat az I-es típusú metabotrop glutamát-receptorok aktivációját követően az intracelluláris inozitol-trifoszfát hírvivő közvetítésével az endoplazmás retikulumból is. Az intracelluláris Ca^{2+} -szint emelkedése aktiválja az nNOS-t, azonban az enzim csak rövid ideig marad aktív (főleg a hatásosan működő Ca^{2+} -pumpamechanizmusok miatt), így a termelt NO mennyisége kisebb.

Az nNOS a neuronokban citoplazmatikusan és membránkötött formában fordul elő. Az enzimaktivitás magas a cerebellumban, a bulbus olfactoriusban, a hídban (Bredt és mtsai, 1991a), a hippocampusban (gyrus dentatus), a nucleus supraopticusban és a colliculus superiorban, valamint a colliculus inferiorban. Izolált NOS-tartalmú idegsejteket az agykéregben és a striatumban is kimutattak (Bredt és mtsai, 1991a; Dawson és mtsai, 1991a).

2.3.3. Az NMDA-receptorok és az NO kölcsönhatása

Általánosan elfogadott az a tény, hogy az NMDA-receptoraktivációt követően az agyszövetben megemelkedik az NO-szintézis. Más adatok azt bizonyítják, hogy az nNOS-t tartalmazó neuronok lényegesen magasabb koncentrációban expresszálnak NMDAR1 és NMDAR2 alegységeket, mint azonos agyterületen a NOS-t nem tartalmazó idegsejtek (Price és mtsai, 1993). További immunhisztokémiai eredmények azt erősítik meg, hogy az nNOS a posztszinaptikus sejtek szinaptikus régiójában halmozottan az NMDA-receptorok közelében helyezkedik el. Az nNOS-t a plazmamembránhoz horgonyzó fehérjék (a PDZ-93 és -95) szintén a posztszinaptikus régióban találhatók meg (Aoki és mtsai, 1998). Mindezek az NMDA-receptor és az nNOS közötti szoros funkcionális kapcsolat létét támasztják alá. A különböző NO-donorokkal végzett kísérletek eredményei azt bizonyítják, hogy az NO gátolja az NMDA-receptor által közvetített intracelluláris Ca^{2+} -szint emelkedését (Lei és mtsai, 1992; Manzoni és mtsai, 1992a,b; East és mtsai, 1991; Hoyt és mtsai, 1992). Az NMDA-receptorcsatornán a neuronba beáramló Ca^{2+} aktiválja az nNOS-t, így a keletkező NO potenciális hatással van számos, NMDA-receptor-mediált, Ca^{2+} által szabályozott idegi működésre. Negatív visszacsatolás révén pedig az NMDA-receptoron keresztül az NO gátolhatja önmaga szintézisét is (Mayer és Westbrook, 1987; MacDermott és mtsai, 1986; Jahr és Stevens, 1987; Ascher és Nowak, 1988). Arra vonatkozóan, hogy az NMDA-receptor által kiváltott intracelluláris Ca^{2+} -szint emelkedését milyen módon szabályozza az NO, eltérő mechanizmusokat tételeznek fel. Egér striatális és kisagyi szemcsesejttenyészetben a 3-morfolino-szidonimin SIN-1 és az 1-nitrozo-pyrrolidin (1-NP) reverzibilisen csökkentette az NMDA-receptor közvetítette ionáramot, a csatornák nyitási valószínűségét, és gátolták az intracelluláris Ca^{2+} -szint emelkedését (Manzoni és mtsai, 1992b). Ezek az eredmények azt sugallják, hogy az NO közvetlenül az NMDA-receptorokon fejt ki hatását, mégpedig a receptor-ionofór komplexben helyet foglaló „redox modulációs helyen” keresztül. Patkány kortikális idegsejttenyészetben az NO és az izoszorbiddinitrát (ISDN) koncentrációfüggő módon és reverzibilisen gátolta az NMDA-stimulálta kalciumáramot, de a hatást akkor is észlelték, ha a sejteket DTNB-vel vagy N-etilmaleimiddel (NEM) előkezelték (Hoyt és mtsai, 1992). Ebből azt a következtetést vonták le, hogy az NO nem közvetlenül a receptormolekulán, hanem a Ca^{2+} -homeosztázis megváltoztatásával befolyásolja az NMDA-választ. Ez utóbbi feltételezést alátámasztják Pasqui

és mtsai (1991), Stoyanovsky és mtsai (1997), Brorson és mtsai (1997) ideg- és más sejteken végzett kísérletei is. Lei és csoportja (1992) arról is beszámolt, hogy a nitroglicerín (NTG) és a nátrium nitroprusszid (SNP) erősen gátolta az NMDA-val kiváltott intracelluláris Ca^{2+} -akkumulációt, azonban az NTG és az SNP hatása spontán módon megfordult az esetek mintegy 40%-ában. Ők ezt a jelenséget azzal magyarázták, hogy az NO S-nitrozotiol intermediert képez a receptor cisztein oldalláncának szulfhidrilcsoportjával, amely intermedier gyorsan lebomlik. Az egymásnak látszólag ellentmondó eredményeket Lipton és mtsai (1993a) úgy értelmezték, hogy a különböző NO-donorokból más-más redox állapotú NO szabadul fel (lásd később), és azokból más-más intermedier vegyület(ek) vagy termék(ek) képződhet(nek).

Az NO és az NO-ekvivalensek közvetlenül is kölcsönhatnak az idegsejtek NMDA-receptoraiival, a receptor működését szabályozó modulátorhelyekkel, a receptor-ioncsatornákkal, de az intracelluláris Ca^{2+} -homeosztázis és egyéb intracelluláris jelátviteli mechanizmusok befolyásolásával is kialakíthatják hatásukat (Choi és Lipton, 2000).

2.3.4. A Janusz-arcú nitrogén-monoxid: celluláris hatásmechanizmus

Már a hetvenes években leírták, hogy az NO sejten belüli hatását a guanil-ciklázon fejt ki (Arnold és mtsai, 1977; Miki és mtsai, 1977; Murad és mtsai, 1977). A guanil-cikláz hem tartalmú heterodimer felépítésű fehérje. Az NO a hem porfirinyűrűjében lévő Fe^{2+} -hoz kötődik, a Fe^{2+} a porfirinváz síkjából kiemelkedik, ezáltal konformációváltozás jön létre, és a guanil-cikláz aktiválódik (Wolin és mtsai, 1982). A cGMP-szint következményes emelkedése aktiválja a cGMP-függő protein-kinázt, és a foszforiláció révén befolyásolja az ioncsatornák működését, valamint a foszfodiészteráz aktivitását. Simaizomsejtekben az NO által kiváltott cGMP-szint növekedése aktiválja a cGMP-függő protein-kinázt, és simaizom-relaxációt okoz. A cGMP csökkenti az intracelluláris Ca^{2+} -szintet, így ezáltal is hozzájárulhat a simaizom-relaxációhoz (Rashatwar és mtsai, 1987). A makrofágokban és neutrofil granulocitákban az NO szuperoxid-anionokhoz kapcsolódva peroxinitritet (ONOO^-) formál. A peroxinitrit hidroxil-anionra és NO_2 szabadgyökökre bomlik, amelyek az aktivált makrofágok és a neutrofil granulociták baktériumölő hatásáért felelőssé tehetőek (Beckman és mtsai, 1990).

A nitrogén-monoxid három különböző redox módosulatát izolálták: a nitrogén-monoxidot (NO^\bullet), a nitrozónium-iont (NO^+) és a nitroxilont (NO^-) (Stamler és mtsai, 1992). A *nitrozóniumion* (NO^+) exogén NO-donorból (pl. nitroglicerinnél vagy endogén nitrozotiolból) származhat. Endogén nitrozotiolokat (pl. S-nitrozoglutation) néhány mikromólos koncentrációban a tüdőben és az agyban is kimutattak (Hogg és mtsai, 1996, Kluge és mtsai, 1997). Az NO^+ szabad tiolcsoportokkal való reakcióját nitrozilációnak nevezzük. A nitrozotiolok reakciója: $R\text{-SH} + R'\text{-SNO} \leftrightarrow R\text{-SNO} + R'\text{-SH}$. A nitrozotiolok az NMDA-receptorok redox modulációs helyével kölcsönhatva nitrozocisztein intermedier képződésén keresztül csökkentik a receptoraktivitást, tehát protektív hatásúak lehetnek (Lei és mtsai, 1992; Lipton és mtsai, 1993a; Arnelle és mtsai, 1995). Rekombináns NR1/NR2 alegységeken az NO^+ az NR2A alegység 399-es ciszteinjén fejt ki hatását. A redox modulációban természetesen részt vehetnek az NR1 alegység 744-es és 798-as ciszteinjei is abban az esetben, ha azok redukált állapotban vannak (Choi és Lipton, 2000). Azonban az NO^+ a Zn^{2+} -kötőhelyekhez is bekötődhet, így kompetíció jön létre az NO^+ és a Zn^{2+} között a kötőhelyekért. Ezáltal a receptorfehérje működésében is kettős moduláció valósulhat meg, az enzimaktivitás szabályozásában leírtakhoz hasonlóan (Gergel és mtsai, 1996).

Az NO^- magas energiájú (singlet) és alacsony energiájú (triplet) állapotban fordul elő. A magas energiájú a tiolcsoportokkal közvetlenül reagálhat, míg az alacsony energiájú nem (Bonner, 1996). Mindkét energiájú módosulat kölcsönhatásba léphet azonban szuperoxid anionnal ($\text{O}_2^{\bullet-}$), így peroxinitrit képződik, ami a szabad tiolcsoportokat oxidálhatja (Kim és mtsai, 1999). Tehát a peroxinitrit közvetlenül és közvetve is kölcsönhatásba léphet az NMDA-

receptoron lévő tiolszoportokkal, és csökkentheti a receptorok aktiválhatóságát. Az NO^{\bullet} szintén könnyen reagál szuperoxiddal, és szintén peroxinitritet hoz létre. A protonált peroxinitrit vagy bomlásterméke, a nitrit, amely maga is igen reakcióképes molekula, a fehérjék tirozincsoportját nitrozotirozinná oxidálják. Ez a folyamat számos fontos intracelluláris fehérje (pl. a Cu/Zn-SOD, a Mn-SOD, az akonitáz, a citokróm oxidáz (mitokondriális komplex IV)) aktivitásának megváltozásához vezet.

Az NO fokozhatja a fehérjék ADP-ribozilációját közvetlenül (Brune és Lapetina, 1989, Dimmeler és Brune, 1992; Kots és mtsai, 1992) vagy a poli-ADP-ribóz polimeráz (PARP) serkentésén keresztül (Williams és mtsai, 1992). Az ADP-riboziláció pedig többek között az enzimek aktivitását és fehérjék funkcióját módosítja.

2.3.5. A nitrogén-monoxid szerepe a neurotoxicitásban

Az akut és a krónikus neurológiai és pszichiátriai megbetegedésekben fontos szerepet játszik a glutamaterg neurotransmisszió. Felismerték, hogy a KIR-ben a neuronpusztulás legfőbb oka a glutamát lehet, elsősorban az NMDA-receptorok aktiválása révén (Choi, 1988; Meldrum és Garthwaite, 1990). Az excitotoxicitás tanulmányozásakor igen fontos lépés volt annak felismerése, hogy az NO szerepet játszhat az NMDA-receptor-mediált neurotoxicitásban csakúgy, mint az NMDA-receptorok élettani működésében (Garthwaite és Boulton, 1995). Azonban az NO szerepe az NMDA-receptorok által közvetített neurotoxicitásban nagyon ellentmondó. Már a korai tanulmányokban fontos szerepet tulajdonítottak az NO-nak az NMDA-kiváltotta idegsejtpusztulásban (Dawson és mtsai, 1991a,b, 1993). Más tanulmányok azonban ezt nem erősítették meg sem *in vitro*, kortikális neurontenyészetben (Demerle-Pallardy és mtsai, 1991; Hewett és mtsai, 1993), sem pedig *in vivo* érelzáródás utáni állapotban (Buchan és mtsai, 1994). Huang és mtsai (1994) szerint az agyi vérellátási zavarokban az NMDA-mediált idegsejtpusztulás során a sejthalál fő okozója az NO fokozott termelődése. Knock-out egerekből származó sejt kultúrákban, ahol az nNOS nem expresszálódott, azt találták, hogy az idegsejtek *in vitro* rendkívüli mértékben ellenállóak voltak az NMDA károsító hatásával szemben (Dawson és mtsai, 1996).

Ezek a tanulmányok más, például az NO-t megkötő, a NOS-t gátló anyagokkal, vagy NOS tartalmú idegsejtek kiiktatásával végzett kísérletekkel együtt arra mutattak, hogy az NO fontos szerepet játszik a neurotoxicitásban (Dawson és mtsai, 1991a,b, 1993, 1996). Néhány modellben az antioxidánsok blokkolják az excitotoxicitást (Lafon-Casal és mtsai, 1993; Chiueh, 1999). Transzgenikus állatokon végzett kísérletek bizonyítják, hogy az NO és az $O_2^{\bullet-}$ együttes jelenléte szükséges a neuronális toxicitáshoz. Ha fokozták a szuperoxid-dizmutáz (SOD) expresszióját, amely a szuperoxidgyököket eltávolítja és megakadályozza a peroxinitrit képződését, csökkenteni lehetett az iszkémiás neuronpusztulást (Kinouchi és mtsai, 1991). A SOD hiányában viszont fokozódik a peroxinitrit-képződés, csökken a mitokondriális respiráció, nem működik a mitokondriális protonpumpa, megszűnik a belső membránpotenciál, nincs ATP-szintézis a mitokondriumokban (Bonfoco és mtsai, 1995; Lipton és mtsai, 1997). Úgy tartják, hogy a sejthalál bekövetkezésének legfőbb oka a sejt energiakészletének kimerülése valamilyen okból, például iszkémia, hipoxia, hipoglikémia miatt. Az NO súlyosbítja az energiahiányt, mert csökkenti az oxidatív foszforilációt és a mitokondriális enzimek (a NADH-ubikinon oxidoreduktáz, a szukcinát-koenzim Q oxidoreduktáz, a citokróm oxidáz) aktivitását gátolja (Bredt, 1999, Stamler, 1994, Drapier és Hibbs, 1996, Brown, 1995). Az indukálható NOS jelen van a mikrogliaiban és az asztrocitákban, így patológias körülmények között (pl. agyi iszkémiában) jelentős mennyiségű NO szabadulhat fel ezekből a sejtekből is (Nowicki és mtsai, 1991). Mindezek a tények azt sugallják, hogy a fokozott NO-szintézis szerepet játszik a neurodegeneratív kórképek patogenezisében is. Azonban az NMDA-receptorok által közvetített sejtpusztulás a nitrogén-monoxid hatása nélkül is létrejön, és a nitrogén-monoxid termelődés

önmagában nem elegendő az idegsejtek elpusztításához. Tokita és mtsai (1996) agykérgi neuronok tenyésztésén végzett kísérleteik eredményeiből is arra az álláspontra jutottak, hogy az NO toxikus hatásának kifejtéséhez az NMDA-receptorok párhuzamos aktiválása szükséges.

2.3.6. A nitrogén-monoxid neuroprotektív hatásai

Az agyi vérellátásban és a sejtek közötti kommunikációban betöltött szerepe mellett *in vitro* és *in vivo* eredmények bizonyítják, hogy az NO hatásos antioxidáns. A fém-ionok generálta hidroxilgyökök (OH^\bullet) Fenton-reakción keresztüli szupresszálásával, a lipidperoxidáció láncreakciójának felfüggesztésével, a redukált glutation antioxidáns potenciáljának megemelésével és a cisztein proteázok gátlásával az NO leállítja az oxidatív stresszt az agyban. Az NO hatástalanítja az igen reaktív gyököket a szuperoxid-aniont: ($\text{O}_2^{\bullet-}$), [$\text{O}_2^{\bullet-} + \text{NO}^\bullet = (\text{ONOO}^-) \rightarrow \text{NO}_3^-$], a már említett hidroxilgyököt [$\text{OH}^\bullet + \text{NO}^\bullet = (\text{HONO}) \rightarrow \text{NO}_2^-$], a peroxil-lipidgyököt [$\text{LOO}^\bullet + \text{NO}^\bullet = \text{LOONO}^\bullet$] és a tiilgyököket (pl. GS^\bullet), [$\text{GS}^\bullet + \text{NO}^\bullet = \text{GSNO}$]. Reakciójukból különböző nitrogénvegyületek (nitrit, nitrát), S-nitrozoglutation és peroxinitrit képződhet. A GSNO sokkal hatásosabb antioxidáns, mint a GSH, és képes a peroxinitrit peroxidatív hatásának teljes megszüntetésére (Chiueh, 1999). Az NO azáltal is protektív lehet, hogy megváltoztatja a ras-proteinek GTP-GDP kicserélő mechanizmusát, így a MAP-kináz útvonala aktiválódik, amely a sejtek túlélését segíti elő (Lander és mtsai, 1997, Xia és mtsai, 1995).

2.3.7. A nitrozoglutation

Az NO mint neurotransmitter vagy neuromodulátor a képződés helyéről a koncentrációgradiensnek megfelelően könnyen diffundál a sejtmembránon keresztül. Az NO a korábban bemutatott adatok alapján közvetlenül reakcióba léphet fehérjék és peptidek cisztein oldalláncával, a vas-hemmel, a szuperoxid anionnal és az oxigénnel (Stamler és mtsai, 1992b). Mivel féleletideje nagyon rövid, gyorsan inaktiválódik. Ezért már korábban feltételezték, hogy az NO hosszantartó hatásának kifejtéséhez valamilyen intermedier szükséges, ami az NO-t megköti és a célsejtekhez szállítja (Stamler és mtsai, 1994). Úgy vélik, hogy a sejtekben ezt a funkciót a nitrozotiolok látják el. Ezt a feltevést igazolja, hogy az NO kötött formában legnagyobb mennyiségben nitrozotiolok, főleg S-nitrozoprotein (pl. S-nitroso-szérum-albumin) formájában van jelen (Stamler és mtsai, 1992b). Az S-nitrozoglutationt izolálták az emberi tüdőbronchusok mosófolyadékából is, ahol koncentrációja elérheti a mikromólos tartományt (Gaston és mtsai, 1995). Ha neutrofil leukocitákat gáz halmazállapotú NO-val kezeltek, akkor a sejtfeltárás után szintén GSNO-t lehetett izolálni. Feltételezik, hogy a GSNO intermedier részt vesz a leukociták aktiválásában (Clancy és mtsai, 1994).

Az NMDA-receptorok aktiválása NO-felszabadulást vált ki kisagyi szemcsesejtekben és más NOS-t tartalmazó neuronokban (Garthwaite és mtsai, 1988). Mivel az intracelluláris szabad tiolok koncentrációja meglehetősen magas, például a GSH-é idegsejtekben és az asztrocitákban millimólos (Chen és mtsai, 1989), extracellulárisan pedig mikromólos koncentrációban van jelen (Zängerle és mtsai, 1992), az NO ismert reakciói révén nagy eséllyel reagálhat a GSH-val. Így az NMDA-receptoraktivációt követően extra- és intracellulárisan is képződhet GSNO. Kluge és mtsai (1997) valóban kimutatták a GSNO-t cerebellumból. Azt is bizonyították, hogy a GSNO mennyisége megnövekedett, amikor glutamáttal vagy NMDA-val kisagyi szövetszeletet inkubáltak. Ezek az adatok azt igazolják, hogy a központi idegrendszerben is képződik GSNO, és feltételezhetjük, hogy a GSNO a GSH-hoz hasonlóan felszabadulhat idegsejtekből, illetve az extracellulárisan képződött GSNO közvetlenül kapcsolódhat extracelluláris fehérjékhez.

A GSNO aerob körülmények között az NO és a GSH reakciójából jön létre. A GSNO GSH-val reagálhat, amiből dinitrogén-oxid és GSSG keletkezik. Mind aerob, mind anaerob

feltétel mellett a nitroxil-ion intermedier lehet a dinitrogén-oxid szintézisében, de aerob körülmények között a nitroxil-ion peroxinitritet is generálhat. GSNO azonban transznitrozilációs folyamatok végterméke is lehet. Feltételezik, hogy a foszforilációs és a defoszforilációs mechanizmusokhoz hasonlóan, a transznitroziláció is szerepet játszhat a fehérjék poszttranszlációs szabályozásában.

Az S-nitrozotiolok széleskörű biológiai aktivitással rendelkeznek, ilyenek az antimikrobiális hatás (De Groote és mtsai, 1995), a vazodilatáció (Kowaluk és Fung, 1990), a vérlemezke-aggregáció gátlása (Hirayama és mtsai, 1999), a bronchodilatáció (Bannenberg és mtsai, 1995) és a bélmotilitás gátlása (Slivka és mtsai, 1994). A GSNO hatásos antioxidáns tulajdonsága miatt *in vivo* megvédi a dopaminerg neuronokat a hidroxilgyök által indukált oxidatív stressztől. A GSNO és az NO az átmeneti fémek által stimulált hidroxil- és más szabadgyök képződését akadályozhatja meg. A lipidperoxidáció leállításával, a glutation antioxidatív potenciáljának megemelésével, az agyi neurotrop faktor (BDNF) protektív hatásának közvetítésével és a cisztein-proteázok gátlásával megakadályozhatja a neurodegenerációt. Így a GSNO sokkal erősebb antioxidáns, mint a klasszikus antioxidáns GSH (Chiueh és Rauhala, 1999). Ezek mellett a cisztein-oldallánc GSNO általi S-nitrozilálása inaktíválja a kaszpáz-3-at és a HIV-1 proteázokat, amellyel véd az apoptózis és a neurotoxicitás káros hatásai ellen is (Chiueh és Rauhala, 1999). Talán ezzel magyarázható az is, hogy az idegrendszerben az NO-t szintetizáló idegsejtek a legellenállóbbak.

A fehérjék transznitrozilációja mellett azonban egy másik mechanizmus, az úgynevezett S-tioláció ($\text{GSNO} + \text{R}_1\text{S}^- \Rightarrow \text{RSSG} + \text{NO}^-$) is fontos szerepet játszhat a fehérjék működésének módosításában. Ebben a reakcióban a GSNO-ból származó glutation vegyes diszulfidot képez például a fehérje cisztein oldalláncával, és nitroxil anion képződik. A fehérjék S-tiolációját először az oxidatív stressz egyik intracelluláris válaszreakciójának tekintették. Újabb kísérletekkel azonban azt mutatták ki, hogy ha nitrozotiolal inkubáltak enzimeket, akkor az S-nitroziláció mellett S-tioláció is lejátszódik. Ha NO-val inkubáltak sejteket, akkor is jelentősen megnövekedett az intracelluláris fehérjék S-tiolációja (Ji és mtsai, 1999; Padgett és Whorton, 1998). Az S-tioláció stabilabb módosítás, mint az S-nitroziláció, és irreverzibilis oxidatív változásokat alakíthat ki a fehérjék szulfhidril oldalláncán. Emellett az NMDA-receptorok hosszantartó gátlását is okozhatja, ezen keresztül pedig a toxikus hatások elleni védelem egyik fontos pillére lehet.

2.4. A CISZTEIN

A cisztein a fehérjék endogén építőeleme és számos biológiailag aktív peptid prekursora, például az arginin-vazopresszinnek, az oxitocinnak, a szomatosztatinnak és a glutationnak (Sagara és mtsai, 1993; Dringen és mtsai, 1999). Inorganikus szulfátot szolgáltat a detoxifikációs reakciókhoz (Heafield és mtsai, 1990), így neuroprotektív hatása is lehet (Miyamoto és mtsai, 1989). Az idegsejteket azáltal is megvédi, hogy komplexálja a nehézfém-ionokat, így meggátolja azok vér-agy gáton keresztüli bejutását az agyba (Bradbury és Deane, 1993). Mivel a cisztein agyszövetekből depolarizációval Ca^{2+} -függő módon felszabadul, neuromodulátorként is működhet (Keller és mtsai, 1989; Zängerle és mtsai, 1992) serkentve a neuronok működését (Olney és mtsai, 1990c). Azonban nagy mennyiségben juttatva az agyszövetbe a glutamához hasonlóan az L-cisztein is toxikus. Agykárosító hatása az egyedfejlődés olyan szakaszában lévő állatoknál jelentkezik elsősorban, amelyeknél a vér-agy gát még nem fejlődött ki teljes mértékben (Karlsen és mtsai, 1981). *In vitro* már mM-os koncentrációban idegsejttölő hatással rendelkezik (Klingman és Choi, 1989). A cisztein

viselkedési zavarokat is kivált (Sharpe és mtsai, 1975). A cisztein toxikus hatásai szerepet játszhatnak számos neurológiai kórkép patogenezisében, így az amiotrófiás laterál szklerózisban (ALS), a Parkinson- és az Alzheimer-kórban (Heafield és mtsai, 1990) és a Hallervorden-Spatz betegségében (Perry és mtsai, 1985), valamint a hipoxiás, a hipoglikémiás és az iszkémiás állapotokban keletkező sérülésekben (Olney, 1993; Lehmann és mtsai, 1993; Schurr és mtsai, 1993; Slivka és mtsai, 1993). Annak ellenére, hogy az L-cisztein idegsejtkárosító hatásai több, mint két évtizede ismertek, a toxicitás pontos mechanizmusát még ma sem ismerjük (Olney és mtsai, 1990c). Toxikus hatása feltehetően csak túlzott felszabadulása esetén mutatkozik, hiszen fiziológiás koncentrációban minden élő sejtben előforduló építőelem. Az L-cisztein agyi iszkémiában főleg a gliából kerülhet nagy mennyiségben az extracelluláris térbe, a glutation felszabadulását és hidrolízisét követően a γ -glutamil-transzferáz enzim (γ -GT) hatására (Li és mtsai, 1999). Ilyen esetben a cisztein gyorsan kialakuló idegsejtkárosodást hozhat létre viszonylag nagy agyterületeken (Olney és mtsai, 1990c). Paradox módon a kisebb koncentrációban adagolt L-cisztein egy lassabban kifejlődő, de sokkal pusztítóbb és az agy számos területén megjelenő (agykéreg, hippocampus, nucleus caudatus és talamusz) károsodást idéz elő. A legsebezhetőbbek az agykéreg és a hippocampus idegsejtjei (Puka-Sundvall és mtsai, 1995). Vemhes patkányoknak a vemhesség utolsó szakaszában adagolva Olney és mtsai (1990c) a magzati agyban szintén mikroszkópos elváltozásokat tapasztaltak. Mivel a cisztein okozta idegsejtpusztulást az NMDA-receptor-antagonista D-2-amino-5-foszfopentanoát (D-AP5) adagolása kivédte, azt feltételezték, hogy az L-cisztein neurotoxikus hatását az NMDA-receptorokon fejti ki. Farmakológiai vizsgálatok alapján viszont a cisztein csak gyenge NMDA-receptor-agonista hatással rendelkezik, éppen ezért az NMDA-szerű toxicitása nem magyarázható teljes mértékben. Feltételezték, hogy az L-cisztein redukálja az NMDA-receptor-ionofórokban lévő funkcionális diszulfidcsoportokat, és ezáltal módosítja az NMDA-receptorok működését (Olney és mtsai, 1990c; Olney, 1993). Ezek alapján egyfajta szinergizmus létezik az L-cisztein és a glutamát hatása között (Puka-Sundvall és mtsai, 1995). Mások adatai alapján az L-cisztein fémionokkal alkotott komplexei szabad oxigénradikálok és hidrogén-peroxid keletkezését katalizálhatják (Plaitakis és mtsai, 1988). A cisztein a GSH-hoz hasonlóan reagálhat az NO-val, és S-nitrozocisztein (cys-NO) képződhet. A cisztein-NO nitrogén-monoxidot szabadíthat fel, amely szabadgyökökkel (pl. szuperoxiddal) reagálva toxikus peroxinitritet (OONO^-) generál kóros körülmények között. Ezt a feltételezést az támasztja alá, hogy szuperoxid-dizmutáz jelenlétében lényegesen kisebb mérvű a cys-NO sejtkárosító hatása (D'Emilia és Lipton, 1999), mivel a SOD megakadályozza, hogy a cys-NO hasadásából keletkezett NO^\bullet a reaktív oxigénnel toxikus hatású reakcióba lépjen. Továbbá SOD jelenlétében a cys-NO gátolja az NMDA-val kiváltott neuronális Ca^{2+} -áramot, ami az NMDA-receptor közvetítette toxicitás előfeltétele (Brorson és Zhang, 1997; Lipton és mtsai, 1993a). Élettani körülmények között, SOD jelenlétében, ha az NMDA-receptorok ingerlése Ca^{2+} -beáramlást vált ki és a NOS aktiválásával NO keletkezik, akkor cys-NO képzésével, kis koncentrációban az L-cisztein protektív hatású lehet. Fiziológiás esetben tehát finom egyensúly áll fenn a neuronális glutamát és az NO, valamint az idegi és a gliális L-cisztein mint kotranszmitter vagy neuromodulátor felszabadulása között, ami hozzájárul az NMDA-receptorok normális aktivációjához az idegsejtek károsítása nélkül.

A fenti lehetséges mechanizmusok mellett az L-cisztein toxikus oxidált termékeké alakulhat, például ciszteinszulfinsavvá (CSA), ciszteinsavvá és S-szulfociszteinné (Olney és mtsai, 1975). Ezek a ciszteinszármazékok mind az ionotrop, mind a metabotrop glutamát-receptorokon hathatnak (Lehmann és mtsai, 1993; Patneau és Mayer, 1990; Porter és Roberts, 1993), és közvetíthetik az L-cisztein toxikus hatásait (Olney és mtsai, 1972). Más excitotoxikus vegyületek (pl. az L-cisztein-S-szulfát) csak nagy koncentrációban válhatnak ki toxikus hatásokat (Olney és mtsai, 1990c). Az L-ciszteinszulfinsav effektív agonista hatással rendelkezik a serkentő aminosav ionotrop és metabotrop receptorokon (Récasens és mtsai, 1981;

Griffiths, 1990). Gátolja a glutamát felvételét (Récasens és mtsai, 1981, Griffiths és mtsai, 1989), vagy foszfolipáz-D-hez kapcsolt saját receptorain keresztül is hathat (Boss és mtsai, 1994).

Munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy a cisztein (1 mM) jelentősen fokozta a radioaktív glutamátfelszabadulást hippocampális szövetszeletből, amelyet előzetesen triciált glutamáttal inkubáltunk. A K^+ -depolarizációval kiváltott glutamátfelszabadulást szintén tovább fokozta (**V./ 5.ábra**). A kisagyi szemcse sejteken szintén növelte a glutamát, a D-aszpartát, de nem befolyásolta a glicin felszabadulását. Potenciózta a K^+ és a glutamát által kiváltott D-aszpartát felszabadulását. A glutamát és a cisztein által kiváltott D-aszpartát felszabadulását az NMDA- és a nem-NMDA-receptor-antagonisták csökkentették. A cisztein tehát önmagában is kiválthat glutamát- vagy aszpartát-felszabadulást, és potenciózza az NMDA-receptor-ligandumok transzmitter felszabadító hatását.

3. CÉLKITŰZÉSEK

A GSH általános szabadgyökfogó molekula, számos redox reakcióban és detoxifikáló mechanizmusban vesz részt, amelyek révén fontos sejtvédő funkcióval rendelkezik. A központi idegrendszerben az ionotrop glutamát receptorokkal kölcsönhatva az intercelluláris jelátvitel módosításával számos élettani folyamatot modulálhat. A GSH reagálhat a rövid életidejű, gáz halmazállapotú neuromodulátor és neurotranszmitter NO-val is és glutation-nitrozotiol (GSNO) képződik belőle. Mivel a GSNO leadja az NO-t, így annak életideje lényegesen meghosszabbodhat. Feltételezzük, hogy a GSNO a GSH-hoz hasonlóan a glutamát receptorokhoz kötődhet és ott az NO-t „célzottan” leadhatja a receptorokon. Ehhez azonban bizonyítani kell azt, hogy a GSNO kölcsönhat a glutamát receptorokkal. Kísérleti eredmények arra is rámutatnak, hogy a GSH nemcsak a glutamát receptorokkal képes kölcsönhatni, hanem más, talán saját receptoron keresztül is befolyásolhatja az idegsejtek működését. Nincs azonban megnyugtatóan bizonyítva a GSH-receptor létezése. Nem ismert a feltételezett glutationreceptorok szerkezete és működése sem. Nincs kellően karakterizálva a receptorfehérje és a GSH-ligandum kölcsönhatása. Az sem tisztázott teljes mértékben, hogy a GSH-t alkotó cisztein, hogyan és miért fejt ki toxikus hatást a központi idegrendszerben.

Ezért az alábbi kérdések megválaszolását tűztem ki célul:

- 1.) *Szerepet játszhat-e a GSH és az NO[•] reakciója során keletkező endogén nitrozotiol GSNO az ionotrop glutamát receptorok szabályozásában?*
- 2.) *Hogyan jellemezhető a GSH feltételezett kötőhelyének és ligandumának kölcsönhatása az agykérgi szinaptikus plazmamembránban ?*
- 3.) *Kölcsönhatnak-e az ionotrop és metabotrop glutamát receptorok ligandumai a feltételezett glutationreceptorral?*
- 4.) *Kölcsönhat-e a GSNO a feltételezett glutationreceptorokkal?*
- 5.) *A GSH-molekulában található aminosavak közül melyik/ek játszik/ának szerepet a peptid és a receptor kölcsönhatásában?*
- 6.) *A receptorfehérje mely aminosav-oldalláncai vesznek részt a receptor és a peptid kölcsönhatásában?*
- 7.) *Hogyan befolyásolja a glutation e saját feltételezett receptoraihoz való kötődését a membránproteinek ciszteinil-oldalláncainak redox állapota?*
- 8.) *Miként fejt ki az L-cisztein idegsejt-károsító hatását?*
 - a.) *Befolyásolja-e az ionotrop glutamát receptorok aktiválásával kiváltott neuronális választ?*
 - b.) *A cisztein tiolcsoportjának redukáló és fémionokat komplexáló sajátos szerepet játszik-e az ionotrop glutamát receptorok által közvetített neurotoxicitásában?*

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. PREPARATÍV ELJÁRÁSOK

4.1.1. Kísérleti állatok

A kötődésvizsgálatokhoz vágóhídi sertések agykérgét használtuk fel szinaptikus plazmamembrán preparálásához. Kisgyi szemcsesejteket 7 napos Wistar patkányok agyából tenyésztettünk. A kísérleti állatok felhasználását és a kísérleteket az egyetemek Etikai Bizottságának előzetes engedélyével végeztük.

4.1.2. Szinaptikus plazmamembrán preparálása

A vágóhídi sertések agyszövetének disszekcióját, szállítását és a különböző szubfrakciók preparálását 0-4°C-on végeztük. A friss agyszövetről az agyhártyákat eltávolítottuk és az agykérget elválasztottuk a fehérállománytól. A kérget tízszeres térfogatú 0,32 M-os szacharóz oldatban üveg-teflon potterrel 800 rpm-mel homogenizáltuk. A homogenizátumot 1000 g-vel 10 percig centrifugáltuk. Ezzel a centrifugálással az agyhártyamaradványokat, a vérereket, valamint a fehérállomány és a mitokondriumok egy részét távolítottuk el. A felülúszót összegyűjtöttük és 20 000 g-vel 20 percig centrifugáltuk, majd az üledéket (P2) 40 ml 0,32 M-os szacharózban finoman felfuszpendáltuk és -20 °C-on tároltuk a plazmamembrán preparálásának napjáig (Cotman és Taylor, 1972). A szinaptikus plazmamembrán előállításához a P2 frakciót lassan felolvasztottuk, 0,8 M-os szacharózoldatra rétegeztük és 8 000 g-vel 20 percig centrifugáltuk. A 0,8 M-os frakciót, amely a szinaptoszóma-frakciót tartalmazta, fecskendővel leszívtuk, majd 0,9%-os KCl-oldattal összekevertük és 30 000 g-vel 20 percig centrifugáltuk. Az így kapott üledéket negyvenszeres térfogatú desztillált vízben felfuszpendáltuk (ozmotikus sokk) és 48 000 g-vel 20 percig centrifugáltuk. A kapott üledéket 50 mM-os Tris-acetát pufferben (pH 7,4) felfuszpendáltuk és a már előzőleg elkészített 1,2-1,0-0,8 M-os diszkontinuus szacharóz-grádiensre rétegeztük, majd kilengőrotorban 63 000 g-vel 45 percig centrifugáltuk. Az 1,0 és 1,2 M-os szacharózréteg határán összegyűlt szinaptikus frakciót fecskendővel leszívtuk és -20°C-on tároltuk a kísérlet napjáig. A kísérlet napján a szinaptikus plazmamembránt tartalmazó oldatot lassan felolvasztottuk. Először 0,9 %-os KCl-oldattal összekevertük, és 48 000 g-vel 20 percig centrifugáltuk, majd az így kapott üledéket desztillált vízben szuszpendáltuk fel, és 20 000 g-vel 20 percig centrifugáltuk. Az üledéket 50 mM-os Tris-acetát pufferben (pH 7,8) homogenizáltuk, és 37°C-on 20 percig inkubáltuk. Az oldatot hűtés után lecentrifugáltuk (48 000 g, 20 perc), majd az üledéket immár a kísérlethez használt pufferben homogenizáltuk és kétszer centrifugáltuk (48 000 g, 20 perc). Ez a kezelés azért volt szükséges, hogy az endogén ligandumokat (glutamát, aszpartát, glicin) eltávolítsuk.

4.1.3. Kisgyi szemcsesejttenyésztés

A kisgyi szemcsesejteket 7 napos Wistar patkányokból tenyésztettük Holopainen és Kontro (1988) módszere szerint. A sejteket tripszinnel izoláltuk, majd tripszin inhibitort és deoxiribonukleázt tartalmazó oldatban (a sérült sejtek DNS-ének lebontására) disszociáltuk. Centrifugálás után a sejteket Dulbecco eszenciális médiumban szuszpendáltuk, ami FCS-t (fetal calf serum, 10%), K⁺-ot (a sejtek megfelelő szaporodásához, 25 mM), glükózt (30 mM), p-amino-benzoátot (7 µM), inzulint (100 mU/l) és gentamicint tartalmazott. A sejteket ezután polilizinnel bevont edényben tenyésztettük (a gliasejtek szaporodásának gátlására). A

tenyészethez 48 óra elteltével 40 μM citozin-arabinózt adtunk 24 órára. A kalciumfelvételt 8 nap múlva vizsgáltuk.

4.1.4. A membránfehérjék kémiai módosítása

A fehérjék kémiai módosításának alapja az aminosav-oldalláncok funkció csoportjai és a módosítószer közti kovalens kötés kialakulásával járó specifikus reakció. A módosítást sejtenyészeteken, expresszált receptoralegységeken és az általunk használt tisztított szinaptikus plazmamembránon is el lehet végezni. Ez utóbbi azért lehet alkalmas, mert a P2 (mitokondriális-szinaptoszomális) frakcióból nyert szinaptikus plazmamembrán-preparátumban található legnagyobb számban a neurotransmitter-receptorok. A módosítás hatását elektrofiziológiai vizsgálatokkal és radioaktív ligandumokkal végzett kötődésvizsgálatokkal lehet ellenőrizni. Ha a módosítás után a vizsgálatban kötődésgátlás vagy kötődésfokozódás figyelhető meg, akkor arra következtethetünk, hogy az adott oldallánc részt vehet a ligandum kötésében. Teljes bizonyosságot azonban akkor kaphatunk, ha ún. protektív kísérletekben a módosítást a specifikus ligandum jelenlétében végezzük el.

Ha a kérdéses oldallánc közvetlenül részt vesz a ligandum kötésében, akkor a ligandum elfoglalja a kötőhelyet, a módosítószer már nem fér hozzá, így a kötődésgátlás elmarad vagy csökken. Ha a specifikus ligandum jelenlétében is fennáll a kötődésgátlás, akkor a vizsgált aminosav módosítása allosztérikusan hat. Nagyon fontos azonban a reakciókörülmények (módosítószer-koncentráció, fehérjekoncentráció, inkubálási idő és hőmérséklet, pH, pufferek) pontos meghatározása, ugyanis egy adott módosítószer más körülmények között más aminosavval is kialakíthat kovalens kötések. A módszer előnye, hogy a natív receptorok szerkezetét vizsgáljuk vele. A natív receptorokon végzett vizsgálatok és a molekulárbiológiai eredmények együttesen teszik lehetővé a receptorok szerkezet-funkció összefüggéseinek pontosabb feltárását.

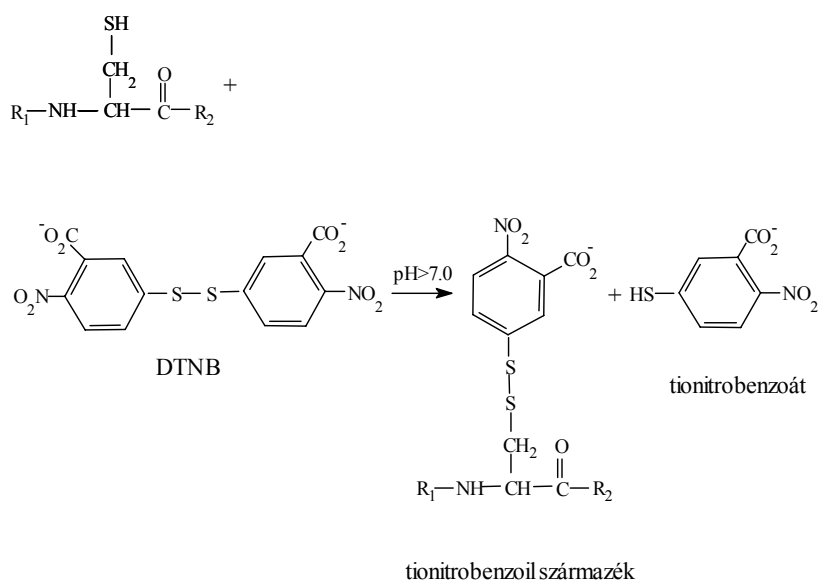
4.1.4.1. A ciszteinil-oldalláncok kémiai módosítása

A ciszteinil-oldalláncok oxidálásához a szinaptikus plazmamembránt 1,0-1,5 mg/ml koncentrációban használtuk. Az oxidálást különböző koncentrációjú DTNB-vel és dittiodipiridinnel (DDP) végeztük 37°C-on, 15 percig, rázóinkubátorban. A módosítószereket frissen készített abszolút etanolos törzsoldatból mértük be. A kontroll membránfrakciót módosítószer hozzáadása nélkül, azonos mennyiségű alkohollal inkubáltuk. A plazmamembrán DTNB-vel való módosítását a kötődési vizsgálathoz használt pufferben (50 mM Tris-acetát, pH 7,4) végeztük (Ellman, 1959), a DDP esetén 50 mM $\text{KHCO}_3\text{-HCl}$ (pH 8) puffert használtunk (Grassetti, 1967). A kémiai reakciót hideg puffer hozzáadásával és centrifugálással (48 000 g, 20 perc) állítottuk le, majd további két centrifugálással eltávolítottuk a feleslegben maradt módosítószert. A protektív kísérletekben a receptor kötőhelyeinek lefedésére a módosítószer hozzáadása előtt a plazmamembrán-frakciót 1 mM GSSG-vel előkezeltük.

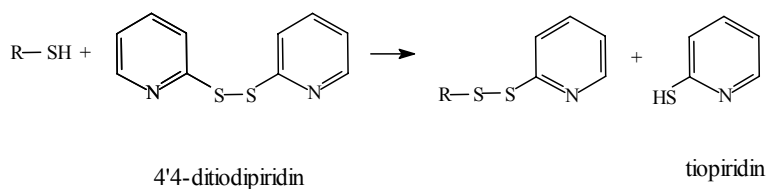
A ciszteinil-oldalláncok alkilálását különböző koncentrációjú NEM-mel végeztük 30°C-on, 30 percig, rázóinkubátorban, a kötődésvizsgálathoz használt pufferben (pH 7,4) (Matthews és mtsai, 1991). A NEM-et frissen készített 100 mM-os desztilláltvízes törzsoldatból mértük be. Az alkilálási reakciót hideg puffer hozzáadásával és centrifugálással (48 000 g, 20 perc) állítottuk le. Az alkilálószer feleslegét további puffer hozzáadásával és kétszeri centrifugálással távolítottam el. A protektív kísérletekben a módosítást megelőző 15 percig 1mM GSSG-vel előinkubáltuk a membránfrakciót.

A ciszteinil-oldalláncok módosítását fenilizotiocianáttal (PITC) a DDP-vel történő módosításhoz hasonlóan végeztük. A PITC-et alkoholos törzsoldatból mértük be. A módosítást 50 mM $\text{KHCO}_3\text{-HCl}$ (pH 8) pufferben 37°C-on, 15 percig, rázóinkubátorban végeztük (Edman,

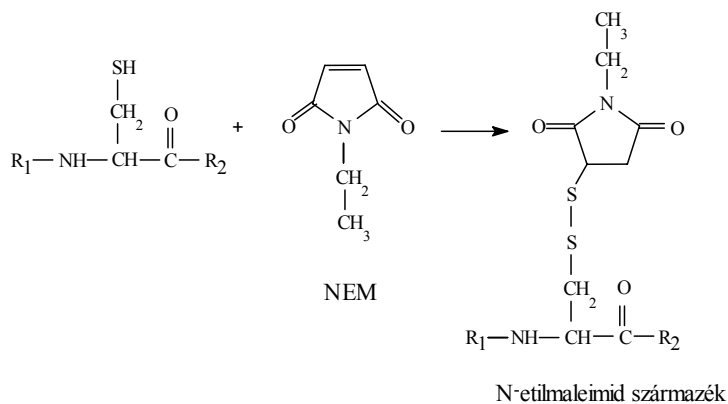
1959). A reakciót centrifugálással állítottuk le, majd a módosítószer feleslegét további kétszeri centrifugálással távolítottuk el.



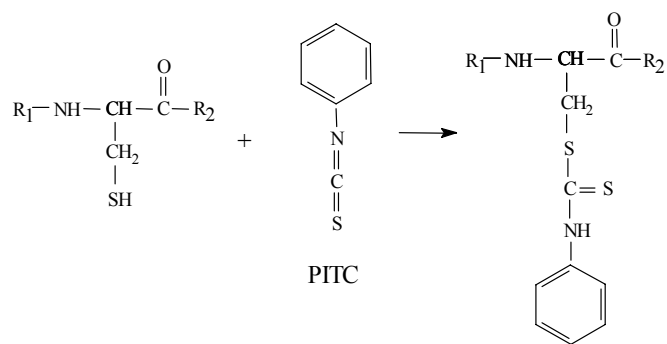
4. ábra. Az 5'5-dithio-bis-nitrobenzoát (DTNB) reakciója ciszteinnel.



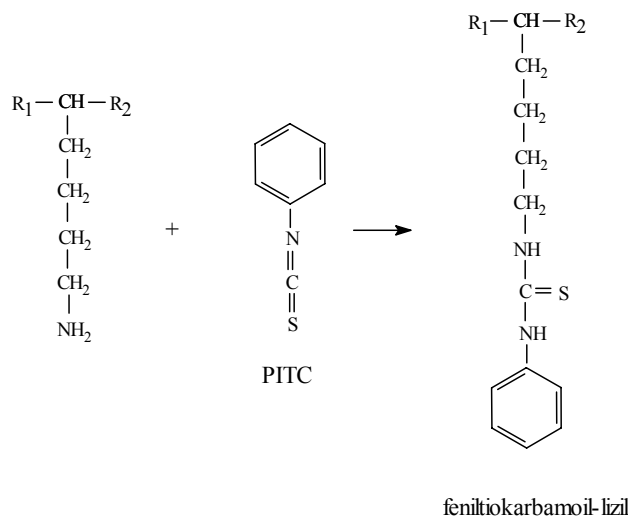
5. ábra. A DDP reakciója ciszteinnel.



6. ábra. N-etilmaleimid reakciója ciszteinnel.



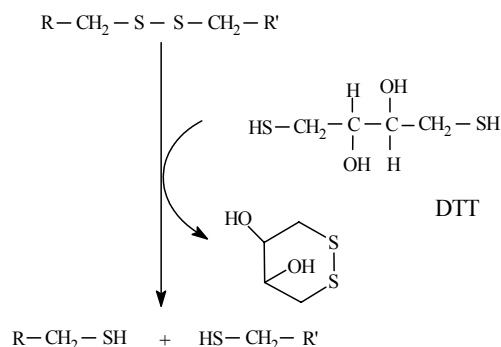
7. ábra. A PITC reakciója ciszteinnel.



8. ábra. A PITC reakciója lizillel.

4.1.4.2. A diszulfidhidak redukálása

A plazmamembránban lévő diszulfidhidak redukálására ditiotreitolt (DTT) alkalmaztunk. A DTT-t desztilláltvizes törzsoldatból mértük be. A DTT-vel 37°C-on, 15 percig, rázóinkubátorban végeztük az inkubálást, a kötődésvizsgálatokhoz használt 50 mM-os Tris-acetát (pH 7,4) pufferben (Cleland, 1964). A reakciót puffer hozzáadása után centrifugálással állítottuk le, majd a folyamatot háromszor megismételtük a DTT feleslegének eltávolítására. Egyes kísérletekben a DTT-vel és a DTNB-vel történő membránkezeléseket egymást követően, különböző sorrendben kombináltuk.



9. ábra. A diszulfidhidak DTT általi felbontása.

4.1.4.3. Az arginil-oldalláncok módosítása

Az arginil-oldalláncok kémiai módosításakor a szinaptikus plazmamembránt (1,0-1,5 mg/ml) 50 mM $\text{KHCO}_3\text{-HCl}$ (pH 8) pufferben szuszpendáltuk fel. A különböző koncentrációban használt fenilglioxált (PGO) frissen készített abszolút alkoholos törzsoldatból mértük be, és a membránt 25°C -on, 40 percig, rázóinkubátorban, sötétben inkubáltuk azzal (Takahashi, 1968). A kontroll kísérletekben a membránt azonos mennyiségű alkohollal inkubáltuk. A reakciót puffer hozzáadása után centrifugálással állítottuk le, majd a PGO feleslegét további két centrifugálással távolítottuk el.

4.1.4.4. A karboxilcsoportok módosítása

A karboxilcsoportok módosításakor a plazmamembránt (1,0-1,5 mg/ml) foszfát pufferben (pH 6) szuszpendáltuk fel. Az etil-dimetil-aminopropil karbodimidet (EDC) desztilláltvízes törzsoldatból mértük be. A módosítást 37°C -on, 15 percig, rázóinkubátorban végeztük (Yamada, 1981). A reakciót puffer hozzáadása után centrifugálással állítottuk le, majd az EDC feleslegét további kétszeri centrifugálással távolítottuk el.

4.2. VIZSGÁLÓMÓDSZEREK

4.2.1. Kötődésvizsgálatok

A kötődésvizsgálatokban a receptor-ionofór és a specifikus ligandumok kölcsönhatását vizsgáljuk. A vizsgálatokban egy adott tríciummal jelölt specifikus ligandum kötődését befolyásoljuk különböző anyagokkal. A kötődési eredményekből elsősorban azt tudjuk megállapítani, hogy az illető vegyület liganduma-e a receptornak. Bizonyos kísérletekben ezenkívül azt is meg tudjuk határozni, hogy a kérdéses vegyület milyen hatásossággal aktiválja vagy gátolja a receptorok működését, illetve hogy allosztérikus gátlást vagy serkentést hoz-e létre. Megfelelően tervezett vizsgálatokkal az esetleges gátlás kompetitív vagy nem-kompetitív jellegére is következtethetünk. A kötődésvizsgálatokat az általánosan elfogadott módszer szerint (Enna és Snyder, 1975) tisztított szinaptikus plazmamembránon végezhetjük.

4.2.1.1. $[^3\text{H}]$ Glutamátkötődés

A kötődési kísérletekhez a szinaptikus plazmamembránt (200-300 μg /teszteső) az endogén ligandumok eltávolítása után (mosás, inkubálás, centrifugálás) 50 mM Tris-acetát pufferben (pH 7,4) szuszpendáltuk fel a tesztesővekben, és jeges vízfürdőben 10 percig előinkubáltuk a tesztelni kívánt anyagokkal. Az előinkubálás után a plazmamembránt 20 nM $[^3\text{H}]$ glutamáttal, jeges vízfürdőben, rázóinkubátorban, 60 percig inkubáltuk. A nem-specifikus kötődés meghatározására 1 mM jelöletlen glutamátot használtunk. A receptor és a ligandumok közti dinamikus egyensúly beállta után a kötődött és a szabad ligandumot centrifugálással vagy szűrési technikával választottuk el. Centrifugálás esetén (27 000 g, 15 perc) (Compton és mtsai, 1990) a felülúszót leszívtuk, az üledéket kétszer 4 ml hideg pufferrel leöblítettük. Az üledéket Triton X-100-zal felszuszpendáltuk és desztillált víz, valamint szcintillációs oldat hozzáadásával készítettük elő a mérésre. A szűrés esetén Brandel (Gaithersburg, MD) filtrációs rendszert használtunk. A kísérleti elegyet Whatman B üvegszálás szűrőpapírra szűrtük, majd háromszor 5ml hideg pufferrel öblítettük. A szűrőpapírhoz tapadt fehérjét szintén desztillált víz és szcintillációs oldat hozzáadásával készítettük elő a mérésre.

4.2.1.2. $[^3\text{H}]$ Kainátkötődés

A plazmamembránt a $[^3\text{H}]$ glutamátkötődés vizsgálatához hasonlóan 50 mM Tris-acetát pufferben (pH 7,4), 200-300 μg /teszteső mennyiségben inkubáltuk elő jeges vízfürdőben, 10 percig a vizsgálandó anyagokkal. A nem-specifikus kötődés meghatározására 100 μM jelöletlen kainátot használtunk. A 20 nM $[^3\text{H}]$ kainát hozzáadása után a membránt jeges vízfürdőben, 60 percig inkubáltuk tovább London és Coyle (1979) módszerével, majd centrifugálással (27 000 g, 15 perc) állítottuk le a kötődést. Az üledéket kétszer öblítettük hideg pufferrel, majd Triton X-100-zal szuszpendáltuk fel. A fehérjeszuszpenziót itt is desztillált víz és szcintillációs folyadék hozzáadásával készítettük elő a mérésre.

4.2.1.3. $[^3\text{H}]$ Fluorowillardiin-kötődés

Az AMPA-receptorok specifikus liganduma kötődésének vizsgálata során a membránt (200-300 μg /teszteső) 50 mM Tris-HCl pufferben (pH 7,4) a vizsgálandó anyagokkal jeges vízfürdőben, 10 percig előinkubáltuk, majd 20 nM $[^3\text{H}]$ FWD hozzáadása után ugyancsak 0°C-on 40 percig inkubáltuk Hawkins és mtsai (1995) módszere szerint. A nem-specifikus kötődés meghatározásához 1mM glutamátot használtunk. A kötődést centrifugálással (27 000 g, 15 perc) állítottuk le, majd az üledéket jéghideg pufferrel kétszer öblítettük. Az üledék tritonos kezelése után a fentiekkel megegyezően készítettük elő a mérésre.

4.2.1.4. $[^3\text{H}]$ CPP-kötődés

Az NMDA-receptorok szelektív kompetitív antagonistájának kötődési vizsgálatához a plazmamembránt (200-300 μg /teszteső) 50 mM Tris-acetát pufferben (pH 7,4) a vizsgált anyagokkal jeges vízfürdőben, 10 percig előinkubáltuk, majd 10 nM $[^3\text{H}]$ CPP hozzáadása után 25 °C-on 15 percig inkubáltuk. A nem-specifikus kötődés meghatározására 1 mM nem jelölt glutamátot használtunk. A kötődést centrifugálással (27 000 g, 15 perc) állítottuk le. A fentiekkel megegyező kétszeri hideg pufferrel való öblítés és tritonos kezelés előzte meg a szcintillációs számlálást.

4.2.1.5. $[^3\text{H}]$ Dizocilpin-kötődés

A glutamát által aktivált nyitott NMDA-receptor-ionofórhoz kötődő nonkompetitív antagonistá dizocilpin kötődésének vizsgálatakor a plazmamembránt (200-300 $\mu\text{g}/\text{tesztcső}$) 5 mM HEPES-Tris (pH 7,6) pufferben, jeges vízfürdőben, 10 percig előinkubáltuk a vizsgált anyagokkal, és a nem-specifikus kötődés meghatározására szolgáló 30 μM dizocilpinnel. Az előinkubálás után 1 nM $[^3\text{H}]$ dizocilpint alkalmaztunk, majd 23°C-on, 30 percig, rázóinkubátorban inkubáltuk Reynolds és mtsai (1987) szerint. A kötődést szűrővel állítottuk le. A Whatman B típusú üvegszálás szűrőpapírt a szűrés előtt 30 perccel 0,1%-os polietilénimin oldatba áztattam be a nem-specifikus kötődés csökkentése érdekében.

4.2.1.6. $[^3\text{H}]$ Glutation-kötődés

A fentiekkel megegyező, endogén ligandumoktól megtisztított szinaptikus plazmamembránt (200-300 $\mu\text{g}/\text{tesztcső}$) Tris-acetát pufferben (pH 7,4) számos tesztelendő vegyülettel, valamint a nemspecifikus kötődés meghatározására szolgáló GSH-val (1 mM) jeges vízfürdőben, 10 percig előinkubáltuk. 10 nM $[^3\text{H}]$ glutation hozzáadása után, a membránt jeges vízben, 60 percig, rázóinkubátorban tovább inkubáltuk. A kötőhely és a ligandumok közti dinamikus állandóság beállta után szűrési technikával állítottuk le a kötődést. A szűrést a fentiekkel megegyezően végeztük.

Natív, kezeletlen membránokon kívül olyan plazmamembránokon is végeztünk glutationkötődést, amelyeknek egyes fehérjeoldallancait különböző kémiai módosítószerekkel előzőleg módosítottuk, majd a feleslegben maradt módosítószert többszöri centrifugálással eltávolítottuk (lásd a membránfehérjék kémiai módosítását). A továbbiakban a kémiai módosításon átesett plazmamembránon a natív membránokkal megegyező módszert alkalmaztunk.

A fenti kötődésvizsgálatokban a membránhoz kötődött (szűrővel vagy centrifugálással elkülönített) radioligandum mennyiségét folyadékszintillációs számlálással határoztuk meg. A minták fehérjetartalmát Lowry és mtsai (1951) módszerével mértük.

4.2.2. A kalciumfelvétel vizsgálata

A sejtek $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -felvételét Krebs-Ringer-Hepes pufferben vizsgáltuk, ami a következőket tartalmazta (mM): NaCl 126; KCl 5,1; CaCl_2 0,81; MgSO_4 0,1; NaH_2PO_4 1,3; HEPES 15; D-glükóz 10; pH 7,4 (NaOH-dal beállítva). Ebben a médiumban a sejteket 10 percig 37 °C-on előinkubáltuk, majd 44 MBq/l $^{45}\text{CaCl}_2$ -ot (0,37-1,5 PBq/kg) adtunk a médiumhoz. Az 1 mM NMDA-t vagy a 0,1 mM glutamátot a $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -mal együtt adtuk. A Zn^{2+} hatásának vizsgálatakor 1 perccel az agonisták (NMDA, NMDA+cisztein) és a radioaktív Ca^{2+} hozzáadása előtt 1 mM ZnCl_2 -ot kevertünk a médiumba. Egy másik kísérlet sorozatban a sejteket 10 percig 1 mM ZnCl_2 -dal előkezeltük, a médiumot lecseréltük, és ezután alkalmaztuk az agonistákat és a $^{45}\text{CaCl}_2$ -ot. A sejteket mindkét kísérlet sorozatban 5 percig inkubáltuk a $^{45}\text{Ca}^{2+}$ hozzáadása után, majd leszívtuk a médiumot és a sejteket Ca^{2+} -mentes, 2 mM EDTA-t tartalmazó KRH oldattal kétszer leöblítettük. Végül 0,4 M NaOH-ban feloldottuk őket, az oldatot 2N sósavval neutralizáltuk és 200 μl -es térfogatokból radioaktivitást határoztunk meg folyadékszintillációs módszerrel. A fehérjetartalmat Lowry és mtsai (1951) módszerével mértük.

4.2.3. Az intracelluláris Ca^{2+} -szint mérése

Az intracelluláris Ca^{2+} -szint mérését Holopainen és mtsai, (1989) módszerével üveglemezen tenyésztett kisagyi szemcsesejteken végeztük. A sejteket BSS pufferral öblítettük át, amely a következőket tartalmazta (mM): NaCl 137; KCl 5,0; CaCl_2 1,0; KH_2PO_4 0,44; NaHCO_3 4,2; 2-(3-hidroxi-1,1-bis(hidroximetil)etil)aminoetán-szulfonát (TES) 20; glükóz 10 és 0,1 % BSA, (pH 7.4; 37°C), majd DMSO-ban (2mg/ml) oldott 10 μl fura-2 acetoximetil-észtert (fura-2/AM) adtunk az 5 ml médiumhoz és 40 percig 37°C-on inkubáltuk vele. A fluoreszcens méréshez a sejteket lemostuk BSS-oldattal, majd 2 ml BSS-oldatot tartalmazó hőmérséklet-szabályozott (37°C) küvétába helyeztük, és folyamatos mágneses keverés közben mértük a fluoreszcenciát 340 (ex.) és 505 (em.) nm-en. Kalibrációhoz a kísérlet végén 1 μM ionomicint és 0,1 mM MnCl_2 -ot alkalmaztunk a maximális, illetve a minimális fluoreszcencia eléréséhez. A fura-2- Ca^{2+} -komplekre megállapított 220 nM K_d értéket használtuk (Grynkiewicz és mtsai, 1985) és a szabad Ca^{2+} -koncentráció meghatározását a Tsien és mtsai (1982) által kidolgozott módszer alapján végeztük.

4.3. SZÁMOLÁSI MÓDSZEREK ÉS STATISZTIKAI ANALÍZIS

A kötődésvizsgálatokat mindig három párhuzamos mintán végeztük, és az eredmények ezek átlagát \pm S.E.M.-t jelentik. Az átlagértékek közti statisztikailag szignifikáns különbségeket Student's t-test segítségével adtuk meg.

Az IC_{50} értékeket a 95 %-os megbízhatósági határokkal, a maximális aktivációt, a K_D és a B_{max} értékeket Markwardt-algoritmus használatával, iteratív optimalizációval határoztuk meg.

5. EREDMÉNYEK

5.1. A NITROZOGLUTATION KÖLCSÖNHATÁSA AZ IONOTROP GLUTAMÁTRECEPTOROKKAL

Annak eldöntésére, hogy a GSNO kölcsönhat-e a glutamát receptorokkal, mindenekelőtt azt kellett bizonyítanunk, hogy sertés agykéregből izolált szinaptikus plazmamembrán-frakció glutamát receptorot tartalmaz. Ezért először a membránpreparátumban a glutamát, illetve a glutamát receptor-család specifikus ligandumainak receptor kötődését vizsgáltuk meg.

Kimutattuk, hogy a trícíált ligandumok: a glutamát, a kainát, az AMPA-analóg fluorowillardiin, az NMDA-nonkompetitív antagonistá CPP már nanomólos koncentrációban is kötődnek a plazmamembrán receptoraihoz. A ligandumok kötődése reverzibilis, nem jelölt glutamáttal, illetve glutamát-analógokkal a kötőhelyekről leszoríthatók. A specifikus kötődés a ligandum koncentrációjának növelésével egy bizonyos koncentráció felett nem fokozható, azaz a kötőhelyek telítődési kinetikát mutatnak. A kötődésvizsgálatok eredményeinek kinetikai analízise alapján nagy affinitású (K_D : 20-750 nM) és kis kapacitású (B_{max} : 1-15 $\mu\text{mol/kg}$ fehérje) specifikus NMDA- és nem-NMDA-kötőhelyeket detektáltunk a preparátumban (**I./ 2. ábra és II. táblázat**).

Korábbi vizsgálatainkban bizonyítottuk, hogy a GSH és a GSSG kölcsönhat a glutamát receptorokkal. Jelen munkában a GSNO mellett alkalmaztuk a peptid redukált és oxidált formáját is annak eldöntésére, hogy a GSNO-molekulában az NO milyen mértékben változtatja meg a GSH affinitását az egyes glutamát receptorokhoz. A GSNO, a GSH és a GSSG gátolta [^3H]GLU, a [^3H]CPP és [^3H]KA glutamát receptor-specifikus ligandumkötődését. Az effektív 50 %-os gátló koncentrációértékek (IC_{50}) az alacsony mikromólos koncentráció tartományban találhatóak (**I./ 1. ábra és I. táblázat**). A glutamátot mindhárom peptid, a GSNO, a GSH és a GSSG hatásosan szorította le a kötőhelyekről. Ezekben a vizsgálatokban érthető módon a legnagyobb affinitást maga a glutamát mutatta, és azt a GSNO>GSH>GSSG követte (IC_{50} értékek: 0,34; 1,50; 1,74; 5,07 μM a felsorolás sorrendjében). A specifikus antagonistá CPP-kötőhelyhez szintén hasonló sorrendben mutattak affinitást a glutamát és a peptidok (IC_{50} értékek: 0,76; 2,14; 2,52 és 4,76 μM). A kainátot viszont a glutamát kb.10-szer hatásosabban szorítja le, mint a jelölt glutamátot, azaz ebben a preparátumban a ligandum affinitása a kainát receptorokhoz magasabb, mint más receptorokhoz. A GSNO 4,5-szer hatásosabban szorítja le a glutamátot a kötőhelyekről, mint a kainátot. Ugyanakkor a kainát receptorokhoz 225-ször kisebb az affinitása, mint a glutamáté. A peptidok még mM-os koncentrációban sem szorítják le a kötőhelyeikről a szelektív AMPA-receptor-agonista [^3H]FWD-t. Mindezek alapján megállapíthatjuk, hogy a GSNO - hasonlóan a GSH-hoz és a GSSG-hez - legnagyobb affinitást az NMDA-, illetve a kainát receptorokhoz mutat. A három peptid közül minden esetben a GSNO rendelkezett a legnagyobb affinitással a glutamát receptorokhoz.

Amint korábban már leírtam, az egyes specifikus kötőhelyek telítési kinetikát mutattak. A további vizsgálatokban kinetikai analízist végeztünk annak eldöntésére, hogy a GSNO azonos kötőhelyekért verseng-e a glutamát receptor-agonistákkal, illetve -antagonistákkal. Ezekben a vizsgálatokban 10 μM GSNO jelenlétében a radioaktív ligandumok koncentrációját emelve a receptorok szintén telítődést mutatnak. Nem változott az egyes ligandumokra specifikus kötőhelyek száma (B_{max}), azonban csökkent a kötőhelyek affinitása (K_D). A K_D érték a radioaktív glutamatra nézve 3,2-szeresére, a CPP-re 1,5-szörösére, a kainatra pedig 2,2-szeresére nőtt a kontrollhoz képest; a gátlás tehát kompetitív jellegű (**I./ II. táblázat**). Mindez arra utal, hogy a GSNO a [^3H]glutamát-, a [^3H]CPP- és a [^3H]kainát receptorok ligandumfelismerő vagy ahhoz közeli helyeihez kötődik. Ezt igazolja az is, hogy a 10 μM GSNO sokkal hatásosabban szorítja le a jelölt ligandumokat az alacsonyabb, mint a magasabb koncentráció tartományban (**I./ 2. ábra**).

A GSNO tehát legnagyobb affinitással az NMDA-receptorokhoz kötődik. Az NMDA-receptorral való kölcsönhatást az is igazolhatja, ha a peptid fokozza vagy csökkenti a nyitott NMDA-receptor-ioncsatornához a nonkompetitív antagonistá [³H]dizocilpin kötődését. A GSNO -hasonlóan a GSH-hoz és a GSSG-hez- koncentrációfüggő módon fokozta a [³H]dizocilpin kötődését. Ebben az esetben is a GSNO bizonyult a leghatásosabbnak. Az NMDA-receptor-koagonista glicin (10 μM) szintén aktiválta a tríciummal jelölt dizocilpin kötődését. Továbbá, ha a peptideket a glicinnel együtt adtuk az inkubáló elegybe, akkor a peptidek a glutamáthoz hasonlóan tovább fokozták a glicin hatását. A GSNO és a GSH, illetve a GSSG (100 μM) és a glicin (10 μM) hatása additív volt (**I./ 3. ábra**). Ezekben a kísérletekben szintén a GSNO bizonyult a leghatásosabbnak (**I./ 3. ábra**).

Az NO-donorok: a SNAP, a SIN-1 és a nitroglicerín viszont nem befolyásolták szignifikánsan a [³H]dizocilpin kötődését. A GSNO hatását nem befolyásolta az inkubálás alatti lebomlása. Igazoltuk, hogy a kötődési vizsgálatok körülményei között az inkubálás ideje alatt csak minimális mennyiségű GSH képződött a GSNO-ból. Amennyiben a kötődésvizsgálatokhoz hasonló körülmények között plazmamembrán nélkül inkubáltuk a GSNO-t, akkor a reakcióelegyben nem tudtuk detektálni sem a GSH-t, sem pedig a peptidet alkotó aminosavakat. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy a szinaptikus plazmamembrán és a magas inkubálási hőmérséklet elősegíti ugyan az NO felszabadulását, de -tekintve a minimális GSH-felszabadulást - a fent leírt hatásokért elsősorban maga a GSNO-molekula tehető felelőssé (**I.**).

5.2. A SZINAPTIKUS PLAZMAMEMBRÁN GLUTATIONSPECIFIKUS KÖTŐHELYEINEK JELLEMZÉSE

A GSH glutamát-receptorokon kifejtett neuromodulátor szerepének tisztázása során korábbi eredményeink és más munkacsoportok elektrofiziológiai kísérletei alapján felmerült, hogy a GSH más, esetleg saját jelátviteli úton/utakon keresztül is képes a neuronális aktivitást befolyásolni. A neurotranszmitterekkel szemben támasztott követelmények nagy részének a GSH is megfelel. Vizsgálataink kezdetén azonban nem álltak rendelkezésünkre egyértelmű bizonyítékok arra nézve, hogy a GSH önálló receptorral rendelkezik a központi idegrendszerben. Az sem volt ismeretes, hogy a feltételezett GSH-kötőhelyek különböznek-e más ionotrop és metabotrop glutamát-receptoroktól.

5.2.1. A [³H]GSH-kötődés jellemzői

Sertés agykéregből izolált szinaptikus plazmamembrán-preparátumon a [³H]GSH Na⁺-független specifikus kötődését mutattuk ki. A kötődés reverzibilis, nemtriciált GSH-val leszorítható a kötőhelyekről. A triciált ligandum koncentrációjának emelésével –1 és 1000 nM között- a specifikusan kötődött GSH telítési kinetikát mutatott. Kinetikai analízissel két, egymástól jelentősen különböző kötőhelyet különítettünk el. Egy nagy affinitású (K_D: 9,60 ± 2,26 μM), kis kapacitású (B_{max}: 0,208 ± 0,070 μmol/kg fehérje), és egy kis affinitású (K_D: 1880 ± 330 μM), nagy kapacitású (B_{max}: 13,8 ± 1,3 μmol/kg fehérje) kötőhelyet (**II./ 1. táblázat**). A CaCl₂ (2,5 mM) mintegy 50 %-kal növelte a specifikus kötődést 0 °C-on, és 180 %-kal 37 °C-on. Az inkubáló elegy hőmérsékletének 37 °C-ra történő emelése 120 %-kal növelte a triciált GSH kötődését. Megállapítható tehát, hogy a GSH kötődése Na⁺-mentes közegben függ a hőmérséklettől, és amennyiben CaCl₂ is jelen van az inkubálás során, akkor a kötődés mértéke fokozódott.

Kinetikai analízist végezve, a 10 nM triciált GSH kötődését a nemjelölt GSH hasonló effektivitással gátolja 0 és 37 °C-on CaCl₂ nélkül, és 37 °C-on CaCl₂ jelenlétében is (IC₅₀: 2,5; 3,9; 7,4 μM) (**II./ 1. ábra**).

5.2.2. Glutamátszármazékok és glutamátreceptor-ligandumok hatása a [³H]GSH kötődésére

Mivel a GSH az ionotrop glutamátreceptorokkal kölcsönhat, felvetődött, hogy a glutamátreceptor-agonisták, illetve -antagonisták befolyásolják a GSH kötődését. A különböző ligandumok specifikus kötődésének tanulmányozásában nagy segítséget jelent a ligandum analóg vegyületekkel való leszoríthatóságának vizsgálata. Különösen alkalmas ez a módszer abban az esetben, amikor azt kívánjuk eldönteni, hogy két ligandum azonos vagy két különböző helyhez kötődik. A továbbiakban ismertetésre kerülő vizsgálatainkban a glutamát, a glicin és a cisztein, illetve analóg vegyületeiknek a triciált GSH kötődésére gyakorolt hatását teszteltük.

A glutamátanalógok közül az L- és D-aszpartát, a D-glutamát, az L-glutamin és a kviszkalát 1 mM-os koncentrációban nem befolyásolta lényegesen a [³H]GSH kötődését. Gyenge, de szignifikáns gátló hatása volt az L-glutamátnak, a kinurenátnak és a piroglutamátnak **(II./ 2. táblázat)**. Az NMDA-receptorok ligandjai közül csak a kvinolinát (1 mM) gátolta szignifikánsan a [³H]GSH kötődését. Az NMDA (1 mM), az 1-aminociklobután-cisz-1,3-dikarboxilát (0,5 mM), a 3-[(R)-2-karboxipiperazin-4-il-]propil-1-foszfónát (1 mM) és az L(+)-2-amino-5-foszfónopentanoát (1 mM) nem voltak hatásosak. A glicin (0,5 és 1 mM) és az NMDA-receptorok glicin-koaktivátor helyén ható vegyületek [a (+)-1-hidroxi-3-amino-2-pirrolidion, az 1-aminociklobután-karboxilát, a 7-klorokinurenát és az (RS)-(tetrazol-5-il)glicin] szintén hatástalanok voltak. Egyedül a D-szerin (0,5 mM) gátolta gyengén a kötődést **(II./ 3. táblázat)**. A nem-NMDA-receptor ligandumai: a kainát, az AMPA, a 6-ciano-7-nitrokvinoxalin-2,3-dion (CNQX), a 6,7-dinitrokvinoxalin-2,3-dion (DNQX), a 6,7-diklorokvinoxalin-2,3-dion (DCQX) és az 5,6-dinitrokvinoxalin-2,3-dion (MNQX) alig vagy egyáltalán nem szorították le a GSH-t kötőhelyeiről. Az (S)-5-fluorowillardiin és a 6-nitro-7-szulfamoilbenzol[³H]kvinoxalin-2,3-dion (NBQX) 0,5 mM koncentrációban is csak gyengén gátolta a [³H]GSH kötődését **(II./ 4. táblázat)**. Bár a 0,5 mM koncentrációjú kvinoxalinok és a GYKI-53655 növelték a kötődést, azonban ez a kötődésfokozó hatás nagy valószínűséggel a dimetilszulfoximinnel (DMSO) tulajdonítható, mivel a szerves oldószer az alkalmazott koncentrációban önmagában is 43 %-kal növelte a kötődést. A metabotrop glutamátreceptorok az I., II. és III. csoportjának agonista és antagonistá vegyületei közül csak az L(+)-2-amino-3-foszfónopropionátnak (L-AP3) volt némi affinitása 0,5 mM koncentrációban, az összes többi metabotrop glutamátreceptor-ligand hatástalan volt.

A glutamáttranszporterén ható egyik glutamátanalóg, az 1-aminociklobután-transz-1,3-dikarboxilát (trans-ACBD) hatástalan volt, míg egy másik, az ugyancsak glutamáttranszportergátló L-transz-pirrolidin-2,4-dikarboxilát (L-trans-2,4-PDC) pedig 36%-kal növelte a kötődést **(II./ 5. táblázat)**.

Összefoglalva tehát elmondhatjuk, hogy a glutation kötődését sem a glutamátreceptor-agonisták, -koagonisták, illetve -antagonisták, sem pedig a glutamáttranszportert gátló vegyületek nem befolyásolják lényegesen.

5.2.3. A glicin- és a GABA-receptor-ligandumok hatása a [³H]GSH kötődésére

Elektrofiziológiai vizsgálatokban az aminosav típusú receptoragonisták és -antagonisták közül a GABA csökkentette GSH depolarizáló hatását, ami a GABA direkt vagy indirekt kölcsönhatását jelentheti a GSH feltételezett receptoraival. Ezért megvizsgáltuk, hogy a GABA-receptoron ható vegyületek befolyásolják-e a GSH kötődését. Emellett számos glicinreceptor-ligandum hatását is teszteltük. Ezen vegyületek közül a GABA, az 5-amino-pentanoát, a β-alanin, az L-alanin, az L-szerin, a prolin, illetve maga a glicin sem szorította le a triciált GSH-t a kötőhelyekről. Ezek az eredmények arról tanúskodnak, hogy a glutationkötőhely nem lehet azonos sem a GABA-, sem a glicinkötőhelyekkel.

További kérdés volt, hogy a peptidet alkotó más aminosavak milyen szerepet játszanak a kötődésben, van-e kitüntetett szerepe például a ciszteinek a GSH és a plazmamembrán kölcsönhatásában. Ezért a továbbiakban azt vizsgáltuk meg, hogy a cisztein és más kéntartalmú analógok hogyan befolyásolják a GSH kötődését.

5.2.4. A cisztein, a ciszteinszármazékok és a szulfhidril vegyületek hatása a [³H]GSH kötődésére

Az L-cisztamin, az L-ciszteamin, az L-cisztein, a ditiotreitól, a homocisztein, az aminometán-szulfonsav 1 mM-os koncentrációban (ebben a sorrendben) szignifikánsan gátolta a kötődést (**II./ 6. táblázat**). Azonban a cisztein kb. 40-szer gyengébb leszorítószerek bizonyult, mint a GSH. Annak ellenére, hogy a vegyületek hatásos gátló koncentrációja (IC₅₀ értéke) a magas mikromólos koncentrációtartományban található, affinitásuk nagyobb a GSH-kötőhelyhez, mint a glutamát-receptor-antagonistáké. A ciszteinnél egy szénatommal hosszabb L-homocisztein 38 %-kal gátolt. Az SH-csoport oxidálása révén nyert vegyületek közül az amino-metán-szulfonsav 35%-kal csökkentette a kötődést, az egy szénatommal hosszabb, de karboxilcsoportot nélkülöző taurin, illetve a két szénatommal hosszabb taurinanalóg homotaurin, a cisztationin, az L-ciszteinsav és az L-cisztin hatástalan volt. A hipotaurin gyengén, de szignifikánsan növelte a kötődést. A cisztamin viszont igen hatásos leszorítószerek bizonyult. A ciszteinanalóg vegyületnek is felfogható tiokinurenát viszont szembetűnő, koncentrációfüggő aktiváló hatást gyakorolt a [³H]GSH kötődésére (**II./ 6. táblázat és 2. A. ábra**).

Mivel a cisztein és a ciszteamin, a redukáló DTT és a tiokinurenát mind tartalmaz SH-csoportot így valószínű, hogy ezek a vegyületek a tiolcsoportjaik révén befolyásolják a GSH és a felismerőhelyek kölcsönhatását. Tehát a ciszteinit-öldallanc vagy az amino-etán-tio struktúra lehet fontos a GSH kötődésében. További kérdésünk az volt, hogy elegendő-e önmagában a cisztein, vagy a glutamát, illetve a glicin is szükséges a kötődéshez.

5.2.5. Dipeptidek hatása a [³H]GSH kötődésére

A γ -L-glutamilcisztein és a cisztein azonos koncentrációban hasonló mértékben csökkenti a GSH-kötődést. Az L-ciszteinit-glicin viszont kevésbé hatásos. Úgy tűnik tehát, hogy a glutamát és a glicin nem befolyásolja lényegesen a GSH kölcsönhatását a feltételezett receptoral. Ugyanakkor, ha a γ -L-glutamilciszteinben a ciszteint az SH-csoporton oxidált ciszteinsavra cseréljük, akkor kissé fokozódik a triciált GSH kötődése, ami arra utal, hogy a cisztein SH-csoportja mellett a glutamát szerepe sem elhanyagolható. Ezt az is alátámasztja, hogy a γ -L-glutamil-GABA és a γ -L-glutamil-leucin ugyancsak jelentősen és koncentrációfüggő módon növelik a kötődést (**II./ 2.A. ábra**). A GABA és a leucin önmagában viszont hatástalan volt. Ez az eredmény azt sugallja, hogy a GSH-kötő fehérjén esetleg több kötőhely is létezik, amelyek egymással kölcsönhatva befolyásolhatják a ligandumok kötődését. Az egyes kötőhelyekkel a peptidet alkotó aminosavak mindegyike vagy csak egy-egy oldallanc játszhat szerepet. A kötőhelyeket alkotó aminosavoldallancok csak megfelelő térszerkezetű peptid befogadására képesek, és ezek szerkezetüktől függően fejtik ki hatásukat a kötőfehérjén (pl. a γ -D-glutamilglicin gyengén gátló hatású, de az L-módosulatú peptidnek jóformán nincs hatása a GSH kötődésére (**II./ 7. táblázat**)).

5.2.6. A glutationszármazékok hatása a [³H]GSH kötődésére

Az összes általunk vizsgált GSH-származék leszorította a [³H]GSH-t kötőhelyéről (**II./ 8. táblázat**). A GSH és a GSNO volt a leghatásosabb, IC₅₀ értékeik az alacsony mikromólos

tartományban található. A GSNO kb. 5-ször magasabb koncentrációban volt ugyanolyan hatásos, mint a GSH. Az oxidált glutation affinitása 152-szer alacsonyabb, mint a redukált GSH-é. Ez az adat, valamint az S-alkil-glutation-származékokkal nyert eredmények arra utalnak, hogy a GSH-molekulában a cisztein szabad SH-csoportja alapvetően fontos szerepet tölt be a peptid és a receptor kölcsönhatásában. Azonban nem tekinthető kizárólagosnak az SH-csoport szerepe, mert például a GSNO affinitása is magas a kötőhelyekhez (**II./ 9. táblázat**). A GSNO hatásosságában azonban valószínűleg más, a már korábban részletezett kémiai modifikációs mechanizmusok is szerepet játszanak, de ennek a kölcsönhatásnak a természete további vizsgálatokat kíván.

A glutation S-származékok közül a hidrofób oldalláncú vegyületek hatásosabbak, mint a hidrofil oldalláncúak, amiből arra következtethetünk, hogy a GSH-kötőhely közvetlen közelében hidrofób aminosav-oldallancok találhatóak. Mivel a különböző hidrofób tioéter-oldallancot tartalmazó GSH-analógok változó effektivitással szorítják le a GSH-t a kötőhelyekről, ezért ezek az adatok is a térszerkezet fontosságára utalnak a GSH és a fehérje kölcsönhatásában.

5.3. A MEMBRÁNFEHÉRJE AMINOSAV-OLDALLÁNCAINAK SZEREPE A GLUTATION KÖTŐDÉSÉBEN

A kompetíciós kísérletek eredményei alapján feltételezzük, hogy a GSH-molekulában a ciszteinnek van kitüntetett szerepe a peptid és a kötőhelyek kölcsönhatásában. Ez azonban nem ad felvilágosítást a membránfehérje szerkezetéről és tulajdonságairól, de arról sem, hogy a receptorligandum felismerésében a membránfehérje milyen aminosavoldallancai vesznek részt. Mivel nem ismeretes a fehérje primer szerkezete és az azt kódoló DNS-szekvenciája sem, ezért nem tervezhetők olyan kísérletek, amelyekben a fehérje primer szerkezetét változtatjuk meg, azaz mutációkkal vizsgáljuk az egyes aminosavak szerepét a receptor funkciójában. A problémát leggyorsabban a fehérjét alkotó aminosavak szerkezetének kémiai módosításával közelíthetjük meg. Az alábbiakban bemutatásra kerülő kísérleteinkben a membránfehérjék cisztein-, lizin-, arginin-, aszparaginsav- és glutaminsav-oldallancait kémiaileg módosítottuk és azután vizsgáltuk a [³H]GSH kötődését.

5.3.1. A tiolcsoportokat és a diszulfidhidakat módosító vegyületek hatása a glutation kötődésére

A fehérjék térszerkezetének kialakításában az aminosavsorrend mellett a poszttranszlációs modifikáció révén kialakult diszulfidhidak játszik a legfontosabb szerepet. A redukálószerrek a diszulfidkötések felszakításával térszerkezeti változásokat okozhatnak.

A kortikális szinaptikus plazmamembrán előkezelése a redukáló DTT-vel szignifikánsan és koncentrációfüggő módon csökkenti a [³H]GSH kötődését. 5 mM DTT mintegy 30 %-kal gátolta a ligandum kötődését (**III./ 3. ábra**). Mivel a gátlás mértéke nem tekinthető jelentősnek, ezért feltételezzük, hogy a fehérje térszerkezete nem változik jelentősen a kezelés hatására. Lehetséges azonban az is, hogy a kezelés hatására nem redukálható valamennyi olyan diszulfidkötés, amely a kötőhely térszerkezeti stabilitásáért felelős.

Annak eldöntésére, hogy a tiolcsoportok szerepet játszanak-e a GSH és a fehérje kölcsönhatásban, a membránfehérjék tiolcsoportjait oxidáló, illetve alkiláló vegyületekkel módosítottuk. Az oxidáló és vegyes diszulfidkötést létrehozó DTNB koncentrációfüggő módon, jelentős mértékben fokozta a [³H]GSH kötődését (**III./ 1. ábra**). A fenti kísérletben a [³H]GSH-t egy koncentrációban (10 nM) alkalmaztuk, így nem kaptunk információt a kötődésnövekedés okáról. Ezért kinetikai analízist végeztünk kontroll és 1 mM DTNB-vel kezelt membránfrakció felhasználásával úgy, hogy a triciált GSH koncentrációját 1 és 1000 nM között változtattuk. A

membránfrakció előkezelése 1 mM DTNB-vel jelentősen megemelte a specifikus és a nonspecifikus kötődést (**III./ 2. ábra**). Ez a kezelés hatszorosára növelte a maximális kötődési kapacitást (B_{max}), de nem változtatta meg szignifikáns mértékben a kötőhely affinitást (K_D). (**III./ 1. táblázat**). A DTNB-előkezelés tehát a kötőhelyek számát növeli meg, de nem befolyásolja lényegesen a GSH affinitását a kötőhelyekhez. A szintén tiolsoportokat módosító DDP-előkezelés- a DTNB-hez hasonlóan- koncentrációfüggő módon, jelentősen, de kisebb mértékben növelte a [3H]GSH kötődését (**III./ Eredmények**). Ez arra utal, hogy a két módosítószer által létrehozott vegyes diszulfidkötések számának növekedése okozza a GSH-kötődés fokozódását. Ezt a feltételezést az is alátámasztja, hogy a membránelőkezelés DTT-vel- azaz újabb szabad SH-csoportok kialakítása a fehérjén- tovább növelte a DTNB kötődésfokozó hatását (**III./ 5. ábra**).

Ha viszont a DTNB-előkezelés után DTT-vel módosítottuk a membránfrakciót, akkor a DTT-módosítás teljesen megszüntette a DTNB kötődésfokozó hatását (**III./ 5. ábra**). Ha a [3H]GSH-kötődés alatt az inkubáló elegybe 1 mM DTT-t tettünk, akkor 30 perces kezelés után 46 %-kal, míg 60 perc után 80 %-kal csökkent a DTNB-fokozta kötődés (**III./ 4. ábra**). A redukálószer a kontroll membránfrakcióban szintén csökkentette a GSH-kötődést, de kisebb mértékben, mint a kezelt membránon.

A tiolsoportokat irreverzibilisen alkiláló NEM (amely tio-éter-kötést alakít ki a membrán ciszteinjével) gátolta a [3H]GSH kötődését. A gátlás 0,1, valamint 1, és 5 mM NEM-előkezelés után hasonló mértékű (54, 59, és 60 %-os). Erre az a magyarázat, hogy jelen körülmények között már a 0,1 mM koncentrációjú NEM közel valamennyi SH-csoporttal reagál (**III./ Eredmények**).

A szintén tiolsoportokat módosító fenil-izotiocianát (PITC) 1 mM-ban 32%-kal csökkentette a [3H]GSH kötődését. Ha a membránfrakción NEM-mel és PITC-cel egymás után végeztünk módosítást, akkor gátló hatásuk összeadódott, mintegy 72%-al gátoltak. Ebből az következik, hogy a NEM és a PITC két különböző aminosav-oldalláncot módosít. Valóban, a PITC jelen kísérleti körülmények között feltehetően a lizin és az arginin terminális aminosoportját is módosítja.

A korábbiakban láttuk, hogy a GSSG más analóg peptidekhez hasonlóan lezorítja a triciált GSH-t a kötőhelyekről. A fenti adatok tükrében a GSSG hatása kétféle módon érvényesülhet: a) bekötődik a GSH kötőhelyhez, b) reagálhat a fehérje szabad SH-csoportjaival a GSH kötőhelyein vagy ahhoz közel eső más cisztein oldalláncokkal. Ha a membrán frakciót 1 mM GSSG-vel előkezeltük (protektív kísérlet), akkor az gátolta a DTNB kötődésfokozó hatását (de nem szüntette meg teljes mértékben) (**III./ 1. ábra**), de egyáltalán nem befolyásolta a NEM hatását. Mindez arra utal, hogy a két utóbbi vegyület (a DTNB és a NEM) nem azonos SH-csoportokkal lép kölcsönhatásba.

5.3.2. Az arginil-oldalláncok kémiai módosításának hatása a [3H]GSH kötődésre

Fiziológiás körülmények között a fehérjék két bázikus karakterű aminosav oldallánca pozitív töltéssel rendelkeznek. A töltés fontos szerepet játszik pl. a glutamátreceptor ligandum felismerő sajátságában és a receptor-ioncsatorna komplexum ionpermeabilitásának szabályozásában. Az arginil-oldallánc módosítása jelentősen csökkenti az NMDA-receptor ligandumok kötődését. Ezért jelen vizsgálatainkban arra kerestünk választ, hogy ezen aminosavak oldalláncainak módosítása hogyan befolyásolja a GSH kötődését. Amennyiben itt is különbség mutatkozik, akkor erősítheti azt a feltevésünket, hogy a GSH-kötőhely és a glutamátreceptor nem lehet azonos.

Az arginil oldalláncok guanidincsoportjának módosítása fenilglioxállal (PGO) $23,7 \pm 4,1$ %-kal csökkentette a [3H]GSH specifikus kötődését. A gátló hatás közel azonos mértékű volt 1, 5 és 10 mM PGO-kezelés után (**III./ Eredmények**).

5.3.3. A glutamil- és aszpartil-oldalláncok módosításának hatása a [³H]GSH-kötődésre

A glutamil- és aszpartiloldalláncok karboxilcsoportjának módosítása etil-dimetil-aminopropil-karbodimiiddal (EDC) nem befolyásolta a [³H]GSH kötődését (III./ Eredmények).

5.4. AZ L-CISZTEIN HATÁSA A GLUTAMÁTTAL ÉS NMDA-VAL KIVÁLTOTT NEURONÁLIS Ca²⁺-BEÁRAMLÁSRA ÉS AZ INTRACELLULÁRIS Ca²⁺-SZINT EMELKEDÉSÉRE

A cisztein természetes endogén aminosav, a GSH és a fehérjék építőanyaga, ezért toxikus hatása csak akkor következhet be, amikor koncentrációja megemelkedik az extracelluláris térben. Ez feltehetően csak agyi iszkémiás állapotokban vagy cisztein adagolása során fordulhat elő. Az agyi intracelluláris szabad cisztein koncentrációja 0,7 mM körül van. Azonban a GSH-ból- amely 1-10 mM koncentrációban fordul elő a sejtekben- felszabadulva a γ -GT és a dipeptidázok hatására jelentős mennyiségű cisztein szabadulhat fel az extracelluláris térben. A továbbiakban a toxikus hatások molekuláris mechanizmusának tisztázására irányuló kísérleteket ismertettem.

5.4.1. A cisztein kölcsönhatása az NMDA-receptorral

Az NMDA-receptor aktiválása Ca²⁺-beáramlást hoz létre a receptorfehérje-alegységek által alkotott ioncsatornán keresztül. Amennyiben a cisztein a receptorral kölcsönhat, akkor az befolyásolhatja a kalcium beáramlását a neuronokba, illetve az intracelluláris szabad Ca²⁺-szint változását idézheti elő. Ezért vizsgáltuk tenyésztett kisagyi szemcsesejteken, hogy hogyan befolyásolja a cisztein önmagában és a glutamát-receptor-agonisták által kiváltott Ca²⁺-beáramlást (felvételt a sejten kívüli térből) illetve az intracelluláris Ca²⁺-szintet.

Az L-cisztein önmagában koncentrációfüggő módon, gyengén fokozta a ⁴⁵Ca²⁺ beáramlását tenyésztett kisagyi szemcsesejtekbe. 1 mM cisztein mindössze 15%-os növekedést okozott. Azonban jelentősen és koncentrációfüggő módon megnövelte a 0,1 mM glutamáttal és az 1 mM NMDA-val kiváltott Ca²⁺-beáramlást. Az NMDA hatását már 50 μ M cisztein is potenciozta (30 %-kal) (IV./ 1. ábra).

Ismeretes, hogy az NMDA-receptor modulációs helyein keresztül a Zn²⁺ feszültségfüggő módon szabályozza az ioncsatorna nyitási frekvenciáját és a nyitvatartás időtartamát. A sejtenyészetet 1 mM ZnCl₂-dal előkezelve vagy a ZnCl₂-ot a ciszteinnel együtt alkalmazva az alap Ca²⁺-beáramlás nem változott lényegesen. Viszont teljesen megszűnt az NMDA-kiváltotta Ca²⁺-beáramlás. A Zn²⁺ jelenléte vagy a Zn²⁺-kel történő előkezelés jelentősen csökkentette az együttesen adott NMDA és cisztein hatását is (IV./ 2. ábra). Az NMDA és a cisztein együttes hatását a kompetitív NMDA-antagonista D-2-amino-5- foszfonopentanoát (D-AP5) és a nyitott csatornát blokkoló dizocilpin teljesen megszüntette (IV., V./ 2. ábra). Mindez arra utal, hogy a cisztein az NMDA-receptor komplexen hatva kelálhatja a Zn²⁺-t, azaz megszünteti a fiziológias csatornablokkot.

5.4.2. A cisztein hatása a Ca²⁺-homeosztázisra

Az NMDA-receptorokon belépő és az intracelluláris raktárakból felszabaduló Ca²⁺ a neuronális jelátvitelben tölt be fontos szerepet. Az intracelluláris Ca²⁺-koncentráció túlzott növekedése azonban olyan kaszkádmekanismusokat indíthat el, amelyek a neuronok

pusztulásához vezetnek. Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció mérése fontos információkat nyújthat egyes ligandumok hatásának és molekuláris hatásmechanizmusának tisztázásához. Ezért a továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy a ciszteinek milyen hatása van az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció változásaira.

Az inkubáló elegybe adagolt glutamát (0,5 mM) a kisagyi szemcsesejtekben kismértékű, de szignifikáns intracelluláris Ca^{2+} -szint emelkedést idézett elő. Abban az esetben, ha ismételt adagolással a glutamát koncentrációját növeltük, akkor a Ca^{2+} -szint fokozatosan emelkedett. A cisztein önmagában emelte az intracelluláris Ca^{2+} -szintet, de kisebb mértékben, mint az azonos koncentrációjú glutamát. Mind a glutamát után alkalmazott cisztein, mind a cisztein után alkalmazott glutamát, egymás hatását erősítve, az intracelluláris Ca^{2+} -tartalom további növekedését eredményezte (**IV./ 3. ábra**). Az ilyen mértékű emelkedés arra utalhat, hogy a cisztein mM-os koncentrációban -feltehetően az NMDA-receptorok stimulációja révén - olyan mértékben fokozhatja az intracelluláris Ca^{2+} -szintet, hogy az már toxikussá válik.

6. DISZKUSSZIÓ

6.1. A GSNO KÖLCSÖNHATÁSA AZ IONOTROP GLUTAMÁTRECEPTOROKKAL

Kísérleteink alapján megállapítottuk, hogy a GSNO nagy affinitással leszorítja a glutamátot és a receptorcsalád specifikus ligandumait. A GSNO az NMDA- és a kainátreceptorokhoz mutat legnagyobb affinitást. Ez a kapcsolat nagy valószínűséggel a γ -glutamil oldalláncon keresztül játszódik le, mivel számos más γ -glutamil dipeptid, amelyek nem tartalmaztak sem ciszteint, sem glicint, hasonló affinitással szorítják le a glutamátot és analóg vegyületeit a receptorokról (Varga és mtsai, 1994). Ezt a feltételezést erősíti az a tény is, hogy azok az NO-donorok (SNAP, SIN-1 és nitroglicerín), amelyek nem tartalmaznak γ -glutamil oldalláncot, nem szorították le a specifikus ligandumokat a kötőhelyeikről, és nem növelték a dizocilpin kötődését sem. A GSH, a GSSG és a GSNO viszont egyaránt hatásos volt az NMDA- és a kainátreceptorokon. További bizonyítéku szolgál az is, hogy a dizocilpin kötődésében a glicin hatása összeadódott a GSH, a GSSG és a GSNO hatásával. A GSH és a GSNO hasonló affinitással rendelkezik a receptorokhoz. Nagyon valószínű, hogy a glutamátoreceptorral való kölcsönhatásban maga a GSNO molekula, és nem a belőle esetlegesen felszabaduló GSH tehető felelőssé.

A GSNO fiziológiai hatása azonban nyilvánvalóan sokkal bonyolultabb, mint egyszerű kötődés a glutamátoreceptorokhoz. Fiziológias körülmények között a GSNO-ból bizonyos mennyiségű GSH szabadul fel, ami feltételezi, hogy egyidejűleg NO is felszabadul. A GSNO kötődése szinaptikus plazmamembrán glutamátoreceptorokhoz azt jelentheti, hogy a felszabaduló NO az adott helyen specifikus hatásokkal rendelkezhet. Az NO gátolja az NMDA-receptor közvetítette válaszokat (Manzoni és mtsai, 1992; Butler és mtsai, 1985; Hoyt és mtsai, 1992; Fagni és mtsai, 1995). Joggal feltételezhetjük, hogy a GSNO által szállított NO az adott helyen relatíve nagy koncentrációban felszabadul és reagál például az NMDA-receptorokkal. A nitrozotiolokból felszabaduló nitrozóniumion nitrozilációs reakcióban az NMDA-receptorok redox modulációs helyével kölcsönhatva, nitrozociszteín intermedier képződésén keresztül csökkentik a receptoraktivitást (Lei és mtsai, 1992; Lipton és mtsai, 1993a; Arnelle és mtsai, 1995). Kísérleteinkben tehát a GSNO-ból felszabadult NO^+ a receptoralegységek ciszteinjein fejtheti ki nitroziláló hatását, amellyel a receptor-ionofór működését befolyásolhatja.

In vitro a GSNO a GSH-t GSSG-vé oxidálja aerob körülmények között (Hogg és mtsai, 1996). In vivo is kialakíthat diszulfidhidakat a membránfehérje cisztein-oldalláncai között, vagy vegyes diszulfidokat hozhat létre a GSH-val. A receptorfehérjéken tehát jelentős konformációváltozás következhet be, ami a receptor-ioncsatorna aktivitását módosítja. A diszulfidkötések oxidatív stressz hatására is kialakulhatnak, amely egyfajta védekező mechanizmust biztosít a fehérjék számára. A diszulfidkötések intracellulárisan viszonylag könnyen visszaredukálhatók a diszulfidokat redukáló enzimekkel (pl. tioredoxin, glutaredoxin), vagy ha a sejt redoxpotenciálja megengedi azt (Klatt és Lamas, 2000, Prinz és mtsai, 1997).

A diszulfidkötések kialakulhatnak a fehérje-ciszteín kénatomján és a GSNO-ból felszabaduló glutationil szabadgyökön keresztül is. A glutationil gyök reakciója a glutatioláció, amely révén glutationil-fehérje vegyes diszulfid alakul ki. Ha például az NMDA-receptoron játszódik le ez a folyamat, akkor ez hosszútávon megváltoztathatja a receptorfehérje működését. Hasonló folyamat lejátszódhat akkor is, amikor a nitrozilált fehérje adja le az NO-t, és a fehérjén alakul ki ciszteinil gyök, amely szabad ciszteinnel és GSH-val könnyen reagálhat. Érdekes módon ez utóbbi reakció során a ciszteinilgyök nem ugyanolyan specificitással alakít ki diszulfidhidat, mint a glutatioláció során (Klatt és mtsai, 2000). Feltételezhető, hogy a GSNO-ban a glutamát α -karboxil- és α -amino-csoportja döntő szerepet játszik a GSNO és a fehérje kölcsönhatásában, ezáltal a glutatioláció és a nitroziláció specificitásának meghatározásában is

szerepe lehet. Összegezve tehát a GSNO kísérleteinkben a belőle felszabaduló nitrozóniumion és glutationilgyök által hozhatja létre hatását az NMDA- és a kainátreceptorokon.

Endogén nitrozotiolokat (pl. S-nitrozoglutationt) néhány mikromólos koncentrációban a szérumban, a tüdőben és az agyban is kimutattak (Hogg és mtsai, 1996; Kluge és mtsai, 1997). Az agyban az NMDA-receptorok aktiválásával párhuzamosan megemelkedik a GSNO koncentrációja (Kluge és mtsai, 1997). Arról is beszámoltak (Balanos és mtsai, 1996), hogy az NO és egyes NO-donorok csökkentik az idegsejtek GSH-tartalmát, és neurodegenerációt okozhatnak (Froissard és mtsai, 1997). Egyes toxinok fokozzák a cisztein felvételét, amivel serkentik a GSH szintézisét az asztrocitákban, de egyúttal elősegítik a karrier-mediált GSH-felszabadulást is (Sagara és mtsai, 1996). A GSH-felszabadulás a gliából azáltal, hogy a GSH az NO-t sejten belül és kívül is megköti, védő hatást fejthet ki a túlzott mennyiségben felszabadult NO káros hatásaival szemben (Hogg és mtsai, 1996). A GSNO a GSH-val és a GSSG-vel együtt, az NMDA-receptorokhoz kötődve megelőzheti azok túlzott aktiválását, a túlzott Ca^{2+} -beáramlást (Janáky és mtsai, 1993), az NO-szintázok Ca^{2+} -függő stimulációját és az NO további képződését. Így az asztrocitákból származó GSH további védő funkciót tölthet be az idegszövetben: megkötheti a feleslegben keletkezett NO-t és védhet a tartós NO-képződés ellen. Ezáltal mind a GSH, mind a GSNO neuroprotektív lehet (Werns és Lucchesi, 1990; Jain és mtsai, 1991).

Taguchi és mtsai (1995) a [^3H]GSNO specifikus kötődéséről számoltak be szinaptikus plazmamembránon, amelyre glutamát-receptor-agonisták nem hatottak. Úgy tűnik tehát, hogy a szinaptikus plazmamembránban több kötőhely is létezik a GSNO számára.

6.2. A GLUTATION KÖTŐDÉSE SZINAPTIKUS PLAZMAMEMBRÁNHOZ

Már több, mint 50 évvel ezelőtt, a hidrák GSH-val kiváltott sajátos táplálkozási reakciója alapján feltételezték, hogy specifikus GSH-receptorfehérjével rendelkeznek. Azonban a mai napig nem azonosítottak olyan fehérjét, amelyhez egyértelműen lehetne a receptorfunkciót kötni. Munkánkban a GSH specifikus kötőhelyének karakterizálása volt a célunk.

Patkány agyszövet-preparátumon a GSH koncentrációfüggő depolarizációt vált ki (Shaw és mtsai, 1996, Pasqualotto és mtsai, 1998). Ez a depolarizáció Na^+ -függő, és sem NMDA- és sem nem-NMDA-receptor-antagonisták (DNQX, L-AP5) nem csökkentik. Ezek alapján feltételeztük, hogy a GSH az emlős idegrendszerben olyan receptorokon keresztül fejti ki depolarizáló hatását, amelyek nagy valószínűséggel nem azonosak az eddig ismert egyetlen glutamát-receptorral sem.

Eredményeink alapján sertés agykéregből izolált szinaptikus plazmamembránban a GSH a kötőhelyek két populációjához kötődik. Ogita és Yoneda eredményeivel egyezően a [^3H]GSH kötőhelyeinek egyike nagy, a másik alacsony affinitású. Szelektív GSH-kötőhelyek létezését az agyban más kutatók eredményei is alátámasztják (Ogita és Yoneda, 1987, 1988, 1989; Ogita és mtsai, 1988; Guo és Shaw, 1992; Guo és mtsai, 1992; Lanius és mtsai, 1993, 1994). Immunocitokémiai módszerekkel kimutatták, hogy a GSH mind az idegsejtekben, mind a gliasejtekben megtalálható (Hjelle és mtsai, 1998). Autoradiográfiás vizsgálatok a [^3H]GSH kötőhelyek eltérő és változatos agyi eloszlását mutatják (Shaw, 1998). GSH-kötőhelyeket kimutattak elsődleges patkány kortikális asztrocitatenyészetben is.

Annak alátámasztására, hogy ezek a megfigyelt kötőhelyek valóban neurotranszmitter receptorok (Pasqualotto és mtsai, 1998; Shaw és mtsai, 1996; Bains és mtsai, 1998) olyan körülményeket kellett választanunk, amelyekkel kizárható volt a GSH kötődése más fehérjékhez. Emlősök központi idegrendszerében a radioaktívan jelölt GSH a membrán nem-receptor fehérjéihez is kötődhet, így például Na^+ -függő és -független GSH-transzportfehérjékhez (Kannan és mtsai, 1998) és membránkötött felületi enzimekhez (glutacion-

transzferázok, γ -GT). Számos neurotranszmitter és aminosav transzmembrán szállításához Na^+ és Cl^- koncentrációgrádiens szolgáltatja a hajtóerőt. A kötődésvizsgálatokat ezért Tris-acetát pufferben végeztük, amely nem tartalmazta ezeket az ionokat, így azok hiányában a [^3H]GSH feltételezhetően nem kötődik transzportfehérjékhez. A Na^+ -függő, nagy affinitású glutamáttranszportereket szelektíven gátló vegyületek közül az 1-aminociklobután-transz-1,3-dikarboxilát nem befolyásolta (Fletcher és mtsai, 1991), az L-transz-pirrolidin-2,4-dikarboxilát pedig gyengén fokozta a kötődést (Mitrovic és Johnston, 1994). Mindez arra utal, hogy a [^3H]GSH a glutamátot transzportáló fehérjékhez sem kötődik, azoktól eltérő helyeket jelölt meg.

Pasqualotto és mtsai (1998) kimutatták, hogy a [^3H]GSH a glutation S-transzferázokat sem jelöli meg. Kísérleti körülményeink között a γ -GT hatásos inhibitora, az acivicin sem szorította le a [^3H]GSH-t. A γ -GT számos γ -glutamil dipeptid szubsztrátja sem hatott a GSH kötődésére. Ezek az adatok azt jelzik, hogy vizsgálati körülményeink között a [^3H]GSH a γ -GT aktív centrumához sem kötődött. Mivel a [^3H]GSH az inkubálás alatt nem bomlott le, a radioaktív ligandum által hordozott jelölés a GSH kötődését jelenti és nem a jelölést hordozó glicinét. Ezt az is megerősíti, hogy a GSH-kötődést sem a glicin, sem glicinerg vegyületek nem befolyásolták.

Mivel a GSH mikromólos koncentrációban az összes ionotrop glutamátreceptor-ligandumot leszorítja kötőhelyeiről, és millimólos koncentrációban a glicint is az NMDA-receptor koagonista kötőhelyről (Oja és mtsai, 1988; Varga és mtsai, 1989, 1997; Ogita és mtsai, 1995, 1998; Janáky és mtsai, 1993, 1998; Jenei és mtsai, 1998), feltételezhetjük, hogy a [^3H]GSH glutamátreceptorokat is megjelölhet. A GSH glutamátreceptorokhoz való kötődése azonban a peptid neuromodulátor és nem neurotranszmitter szerepére utal. A lehetséges átfedéseket kizárandó, glutamátanalógokat, kevert típusú glutamátreceptor- és NMDA-receptor-ligandokat, glicin- és glicin koaktivátorhely-specifikus vegyületeket, nem-NMDA-receptor-ligandokat, I., II. és III. típusú metabotrop receptor-agonistákat és –antagonistákat, valamint más gátló aminosavakat is teszteltünk. Ezek a vegyületek vagy teljesen inaktívak voltak, vagy csak alig és csak nagy koncentrációban hatottak. Egyedül az NMDA-receptor altípus-specifikus agonista kvinolinátnak (Monaghan és Beaton, 1991; Prado de Carvalho és mtsai, 1996) volt jelentősebb hatása. A specifikus kötőhelyről a GSH tehát leszorítja a glutamátot, de a glutamát a GSH-t nem. A ciszteinszármazéknak is nevezhető tiokinurenátnak erős, koncentrációfüggő, aktiváló hatása volt, szemben a hatástalan kinurenáttal. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a GSH-nak olyan kötőhelyei léteznek a szinaptikus plazmamembránban, amelyek nem azonosak egyik ismert glutamátreceptorral sem. Ezt elektrofiziológiai eredmények is alátámasztják (Shaw és mtsai, 1996; Pasqualotto és mtsai, 1998; Bains és mtsai, 1998; Janáky és mtsai, 1999). Az említett elektrofiziológiai tanulmányok szerint a GSH-kötődés erős aktivációjával összhangban, a tiokinurenát potenciózza a GSH-kiváltotta depolarizációt is. Ha a GSH kötődésének farmakológiai tulajdonságait különböző fajokból és agyterületekből preparált szinaptikus plazmamembránokban összehasonlítjuk (Janáky és mtsai, 1999), akkor közös tulajdonságokat fedezhetünk fel; nevezetesen a glutamátanalógokkal és a glutamátreceptor-ligandokkal szembeni érzéketlenséget. Ez újfent megerősíti azt a nézetet, miszerint nincs átfedés az ismert glutamátreceptorok és a feltételezhető GSH receptorok között. A különböző fajokban és agyterületekben fellelhető farmakológiai eltérések arra utalnak, hogy a GSH-kötőhelyek több altípusa is létezhet. Meggyőző különbséget jelent a GSH-kötődés érzékenysége a metabotrop glutamátreceptor-ligandokra (pl. kviszkalátra és L-(+)-2-amino-4-butirátra) egész agyból preparált szinaptikus membránpreparátumon. A szubkortikális régióban található GSH-kötőhelyek farmakológiai tulajdonságai így eltérőek lehetnek az általunk vizsgált kortikális receptorokétól. A kötődés nagy L-glutamát koncentrációval való részleges leszoríthatósága arra utalhat, hogy a GSH-receptorfehérje szerkezeti hasonlóságokat mutat a glutamátreceptorokkal annak ellenére, hogy lényegesen különbözik minden eddig ismert glutamátreceptortól. Két glutamátreceptor-csatorna alegység funkcióját ($\delta 1$ és $\delta 2$ „orphan” alegységek) eddig még nem

derítették ki és nem azonosítottak semmilyen ligandumot, amelyek ezen alegységekhez kötődnének (Yamazaki és mtsai, 1992; Seeburg, 1993; Lomeli és mtsai, 1993). Ezeknek esetleg szerepük lehet a GSH kötésében (Pasqualotto és mtsai, 1998; Janáky és mtsai, 1999). Kísérleti adataink egyeznek Pasqualotto és mtsai (1998) patkány agykéregben kapott eredményeivel. A patkány kortikális szeleteken végzett elektrofiziológiai kísérletekkel együtt ezek az adatok azt a hipotézist támasztják alá, hogy a GSH mint neurotranszmitter saját receptorpopulációján keresztül fejtheti ki hatását.

Kimutattuk, hogy a glutamáttal ellentétben a különböző tioltartalmú vegyületek, a ciszteinanalógok és a glutationszármazékok leszorítják a [³H]GSH-t kötőhelyeiről. E vegyületek hatását vizsgálva számos jelentős felépítésbeli és hatásbeli összefüggést állapíthatunk meg. A leghatásosabb leszorítószernek a cisztein, míg a ciszteinszármazékok közül a cisztamin és a ciszteamin bizonyultak. A dipeptidek közül pedig csak azok voltak hatásosak, amelyek ciszteint is tartalmaztak. Ezzel egyezően csak az ilyen felépítésű dipeptidek hoztak létre GSH-szerű potenciálváltozást kortikális wedge preparátumon (Pasqualotto és mtsai, 1998). Ennek alapján feltételeztük, hogy a GSH-molekula ciszteinil-oldallánca mindenképpen szükséges a kötődéshez. A redukáló ditiotreitől is erős leszorítószerként hatott. Ez szintén a szabad tiolcsoport fontosságára utal. A GSH-molekula szabad tiolcsoportjának oxidálása vagy alkilálása csökkenti a molekula affinitását a [³H]GSH-kötőhelyhez. Amíg a glutamátreceptorokhoz való kötődésében a GSH γ -glutamil oldallancának van kitüntetett szerepe (Varga és mtsai, 1989, 1997; Jenei és mtsai, 1998), addig a GSH specifikus kötőhelyeihez való kötődésében a ciszteinil oldalláncnak. Mindezek alapján azt állíthatjuk, hogy a GSH-molekula neuromodulátor és neurotranszmitter szerepe más-más összetevőknek tulajdonítható (Lipton és Stamler, 1994; Janáky és mtsai, 1998; Ogita és mtsai, 1998).

A tiokinurenát okozta erős aktiválás, ugyanakkor a kinurenát hatástalansága azt jelzi, hogy a GSH-receptorfehérje tartalmazhat olyan modulátorhelyet, amelyhez koagonisták kötődhetnek, és allostérikusan aktiválhatják a GSH kötődését. Feltehetően léteznek olyan endogén koagonisták, amelyek szerkezete a szintetikus tiokinurenátéhoz hasonló, és amelyek allostérikusan aktiválják a GSH-kötődést. Azonban az aktiváció természete és az endogén GSH-koagonisták, illetve antagonisták létezése tisztázásra vár.

Eredményeinket az irodalmi adatokkal összevetve megállapíthatjuk, hogy a GSH antioxidáns és méregtelenítő ősi szerepe mellett megőrizte a mediátor funkcióját is a filogenetikus fejlődés során (Lenhoff, 1998). A GSH specifikus, nagy affinitású receptorfehérjén/fehérjéken keresztül fejtheti ki depolarizáló hatását az emlősök agyszövetében. Eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy a GSH saját receptorain, neurotranszmitterként is működhet a központi idegrendszerben. A GSH specifikus kötőhelyei különböznek minden eddig ismert serkentő vagy gátló aminosaverg receptortól. A GSH specifikus kötőhelyei fontos, nagyban ismeretlen komponensét képezhetik a központi idegrendszer jelátviteli folyamatainak.

6.3. EGYES AMINOSAV-OLDALLÁNCOK SZEREPE A GLUTATION KÖTŐDÉSÉBEN

A szinaptikus plazmamembránok aminosav-oldalláncainak kémia módosításával nyert eredmények azt jelzik, hogy a membránfehérje glutationkötődésében mind a diszulfidhidak, mind a szabad tiolcsoportok részt vesznek. A membrán ciszteinil-oldalláncok szabad tiolcsoportjainak oxidálása DTNB-vel vagy DDP-vel vegyes diszulfidkötések létrejöttéhez vezet. Mindkét vegyület koncentrációfüggő módon, erősen fokozta a GSH kötődését. A redukáló DTT, amely a diszulfidkötéseket felhasítja, gátolta a GSH kötődését, de növelte a DTNB kötődésfokozó hatását. Azonban ha a DTT-t a DTNB-módosítás után alkalmaztuk, akkor az teljesen visszafordította a DTNB-hatást. Ezen adatok alapján azt feltételezhetjük, hogy a

redukált glutation a cisztein-oldalláncával képes a szinaptikus plazmamembránok vegyes diszulfidkötéseinek felszakítására. A membránfehérje ciszteinil-oldalláncainak kénatomjai között és a glutationmolekula között új diszulfidkötés jön létre. Emellett, a GSH kovalens kötődés nélkül is megtámadhatja a membránfehérje diszulfidkötéseit, mint redukáló ágens. Ebben az esetben két glutationmolekula ciszteinilcsoportjai protont adnak át a kénatomoknak, így azok redukálódnak. Ily módon új, szabad tiolcsoportok jönnek létre, miközben a GSH-molekulák GSSG-molekulává oxidálódnak. Ez az oxidációs folyamat azonban [³H]GSSG-molekulák létrejöttét eredményezi, amelyek aztán szabad tiolcsoportokhoz is hozzákötődhetnek. Ez a kötődés gátolható volt, ha a tiolcsoportokat irreverzibilisen alkiláló NEM-et vagy a fenilcsoportot tartalmazó PITC-et alkalmaztuk, amelyek S-C kötést alakítanak ki. A [³H]GSH-kötődés ilyenkor csökkent, mivel sem a GSSG, sem a GSH nem tudta felbontani az így kialakult szén-kén kötést. A GSSG és a NEM ebben az esetben valószínűleg ugyanazért a ciszteinil-tiolcsoportért verseng, mivel mindkettő csökkentette a kötődést és a GSSG-előkezelés nem módosította a NEM hatását.

A DTNB- és a DDP-kezelés után a [³H]GSH az újonnan képződött vegyes diszulfid „kötőhelyekhez” kötődhet, amelyek a membrán hozzáférhető, szabad SH-csoportjaiból alakulnak ki. Ezek a kötőhelyek mesterségesek, nem azonosak a fiziológias kötőhelyekkel, és az ezekhez történő kötődés okozhatja a nemtelíthető kötődés jelentős fokozódását. Ha a membránfrakciót DTT-vel előkezeljük, akkor a DTNB és a DDP által újonnan kialakított vegyes diszulfid „GSH-kötőhelyek” száma nőtt, míg GSSG-előkezeléssel csökkent. Ez azért lehetséges, mert a DTT több szabad SH-csoportot tett hozzáférhetővé a diszulfidkötéseket kialakító DTNB és DDP számára, míg a GSSG lefedte a már meglévőket. Az a tény, hogy kísérleti körülményeink között a NEM és a PITC hatása additív volt, azt valószínűsíti, hogy a PITC a ciszteinil-tiolcsoportokon kívül más funkciós csoporton is hat. Ez felveti annak lehetőségét, hogy a GSH kötődésében nem csak a felszakított diszulfidhidak kénatomjai és a szabad tiolcsoportok játszanak szerepet. Irodalmi adatok megerősítik, hogy lúgos kémhatásnál a ciszteinil-szulfhidrilcsoportok mellett (Edman, 1950) a lizil- és az arginil-oldalláncok aminocsoportjai is reakcióba léphetnek a PITC-cel és feniltiokarbamoil-lizil oldalláncot hozhatnak létre (Ott és mtsai, 1994).

Az arginil-oldalláncok PGO-val történő módosítása is csökkentette a kötődést. A PGO és a PITC gátló hatása azt jelzi, hogy a lizil-oldalláncok amino- és az arginil-oldalláncok guanidincsoportjai részt vehetnek a GSH-kötődés stabilizációjában. A GSH-molekula flexibilitása lehetővé teszi, hogy a vegyes diszulfidkötés mellett -szabad karboxilcsoportjai révén- egyidejűleg a közelben lévő aminocsoportokhoz is kötődjön. Ugyanakkor a cisztein tiolcsoportja és a lizin aminocsoportjai részt vesznek a fehérjék harmadlagos szerkezetének kialakításában. Ezért együttes módosításuk olyan konformációváltozást hozhat létre, amely külön-külön a szulfhidril- vagy az aminocsoportok módosításával nem érhető el. Ezért nem zárható ki annak lehetősége, hogy a NEM-mel és a PITC-cel való módosítás által létrehozott additív gátló hatás konformációváltozás eredménye. Az additív gátlás így nem jelenti feltétlenül a lizil-aminocsoportok közvetlen szerepét a [³H]GSH kötődésében. Emellett, a membránok aminocsoportjainak módosításakor kapott gátló hatás újfent megerősíti, hogy a GSH nem kötődött ionotrop vagy metabotrop glutamát-receptorokhoz, amelyekhez a GSH általában γ -karboxilcsoportján keresztül kötődik, feltehetőleg a glutamáthoz hasonlóan sókötés létrehozásával a receptor egy arginil-oldalláncán keresztül (Laube és mtsai, 1997). Különböző ionotrop glutamát-receptorok agonista és antagonist felismerőhelyeiről kimutatták, hogy bennük filogenetikus megőrzött arginil-oldallánc vesz részt a ligandumkötődésben (Jenei és mtsai, 1997; Kawamoto és mtsai, 1997) és a receptoraktivációban (Uchino és mtsai, 1992; Wafford és mtsai, 1994; Hirahi és mtsai, 1996). Kísérleti körülményeink között nem valószínű, hogy a kortikális szinaptikus plazmamembrán-preparátumban a [³H]GSH glutamát- vagy GABA-receptorokhoz, transzportfehérjékhez vagy enzimekhez kötődött. A szinaptikus plazmamembrán

azon kötőhelyeinek jellemzése és fiziológiás jelentőségének meghatározása, amelyekhez a [³H]GSH kötődik, további molekuláris biológiai módszerekkel történő vizsgálatokat igényel.

6.4. AZ L-CISZTEIN HATÁSA AZ NMDA-RECEPTOR-MEDIÁLT Ca^{2+} -BEÁRAMLÁSRA ÉS AZ INTRANEURONÁLIS Ca^{2+} -SZINTRE

Az NMDA-receptor aktiválása Ca^{2+} -beáramlást hoz létre a receptorfehérje alegységek által alkotott ioncsatornán keresztül. Amennyiben a cisztein a receptorral kölcsönhat, akkor az befolyásolhatja a kalcium beáramlását a neuronokba, illetve az intracelluláris szabad Ca^{2+} -szint változását idézhet elő.

Kimutattuk, hogy a cisztein közvetlenül aktiválja az NMDA-receptorokat kisagyi szemcsesejttenyészetben. Ez a megfigyelés összecseng Olney és mtsai (1990) más idegsejt-preparátumon végzett megfigyeléseivel. Megállapítottuk, hogy a cisztein fokozza a glutamáttal és az NMDA-val kiváltott kalcium-beáramlást. Zn^{2+} jelenléte vagy Zn^{2+} -kel történő előkezelés azonban megszüntette az NMDA és a cisztein együttes hatását. Mindez arra utal, hogy a cisztein az NMDA-receptor diszulfidhídjait redukálja, és a receptor komplexen kelálhatja a Zn^{2+} -t, megszüntetve a fiziológiás csatornablokkot. A cisztein potenciózta a glutamát intracelluláris Ca^{2+} -szintemelő hatását is, ez pedig arra utal, hogy nagy koncentrációban a cisztein az NMDA-receptorok redox modulációs helyein keresztül hat. Az sem zárható ki azonban, hogy a cisztein hatására a sejtbe jutott Ca^{2+} megváltoztatja az intracelluláris pumpamechanizmusokat és az endoplazmatikus retikulum Ca^{2+} -tároló kapacitását, vagy az endoplazmatikus retikulumból Ca^{2+} -ot szabadít fel (Ca^{2+} -indukált Ca^{2+} -felszabadulás). Az NMDA-receptor működését gátló nitrozóniumion megkötésével (cys-NO) protektív hatást fejthet ki, de egyúttal a Ca^{2+} beáramlását is fokozza. Feltételezhető, hogy fiziológiás körülmények között finom egyensúly áll fenn a neuronális glutamát és az NO, valamint az idegi és a gliális L-cisztein felszabadulása között, ami elősegíti az NMDA-receptorok normális aktivációját az idegsejtek károsítása nélkül.

A cisztein önmagában is kiválthat glutamát- és aszpartát-felszabadulást, de az NMDA-receptor-ligandumokkal együtt hatva a ligandum által kiváltott transzmitter felszabadulását tovább fokozza. Ennek következtében a Ca^{2+} -szint megemelkedik, ami toxikus folyamatokat indíthat el. Mindezeket a folyamatokat erősítheti az is, hogy a cisztein gátolja a glutamát és a D-aszpartát felvételét kisagyi szemcsesejteken és szövetszeleten is.

Az L-cisztein excitotoxikus hatásának valószínűleg jelentős szerepe van különböző neurodegeneratív megbetegedésekben. Agyi iszkémiában az idegszövet és az extracelluláris tér L-cisztein koncentrációja megemelkedik. Bizonyos neurodegeneratív betegségek a plazma L-cisztein koncentrációjának növekedésével járnak (Wallin és mtsai, 1999). A glutamát közvetítette túlaktiválás mögött az L-cisztein agyi koncentrációjának és eloszlásának változása állhat.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A.) A nitrozoglutation és az ionotrop glutamát-receptorok kölcsönhatásának tanulmányozásával hozzájárultunk a GSNO neuromodulátor szerepének tisztázásához.

A GSNO nagy affinitással kötődik az NMDA- és a kainát-receptorokhoz. Kötőhelyeiről leesorítja az ionotrop receptor specifikus ligandjait: a glutamátot, a kainátot és a CPP-t. A GSNO gátló hatása kompetitív jellegű volt a [³H]kainát és a [³H]CPP kötődésén. Koncentrációfüggő módon fokozta az NMDA-receptor nemkompetitív liganduma, a [³H]dizocilpin kötődését. A GSNO γ -glutamil oldalláncán keresztül kötődik a glutamát-receptorokhoz.

B.) A GSH specifikus receptorainak kimutatásával, valamint a receptor és a ligandum kölcsönhatásának tanulmányozásával nagymértékben hozzájárultunk a GSH neurotranszmitter szerepének tisztázásához.

Kimutattam és jellemeztem a GSH nagy affinitású Na⁺-független specifikus kötődését. Megállapítottam, hogy a GSH egy nagy affinitású, kis kapacitású és egy kis affinitású, de nagy kapacitású receptorpopulációhoz kötődik. A glutamát, a glutamátszármazékok és a glutamát-receptor-ligandumok, valamint a glutamát-transzportert gátló analóg vegyületek nem, vagy csak alig befolyásolták a GSH kötődését. Az L-cisztein, az L-ciszteamin, az L-cisztamin, a ciszteintartalmú dipeptidek és a GSNO erősen leesorították a GSH-t kötőhelyéről. A tiokinurenát koncentrációfüggő módon, erősen aktiválta a kötődést. Megállapítottam, hogy a GSH kötődésében a ciszteinil-oldallánc alapvető fontosságú. Igazoltam, hogy a GSH saját kötőhelyekkel rendelkezik kortikális szinaptikus plazmamembránban, amelyek különböznek minden eddig ismert serkentő vagy gátló glutamáterg receptortól.

A szinaptikus plazmamembránok oldalláncainak kémiai módosításából kapott eredmények alapján megállapítottam, hogy a GSH a membrán diszulfidhídjaihoz és szabad SH-csoportjaihoz kötődik. A GSH kötődésében részt vesz a membránfehérje arginil-oldallánc és feltehetően a lizin-oldallánc is. A membránok glutamil és aszpartil oldalláncai nem befolyásolják a GSH kötődését.

C., A cisztein NMDA-receptort módosító hatásának vizsgálatával hozzájárultunk a ciszteintoxicitás molekuláris hatásmechanizmusának tisztázásához.

A cisztein fokozza a glutamát és az NMDA-ligandumok által kiváltott Ca²⁺-felvételt neuronokba. Megszünteti az NMDA-receptorok feszültségfüggő Zn²⁺-blokkját. Az L-cisztein önmaga gyengén fokozza a Ca²⁺ intracelluláris szintjét, de hatványozottan erősíti a glutamát Ca²⁺-szint emelő hatását.

Vizsgálataim elsősorban alap kutatás jellegűek. A felhasznált módszerekkel kapott eredmények a neurotranszmisszió folyamatainak pontosabb megismerését szolgálják, és elősegítik a központi idegrendszer fiziológiás és patológias működésének feltárását.

8. IRODALOMJEGYZÉK

AZ ÉRTEKEZÉSBEN FELHASZNÁLT SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Téziseim az alábbi eredeti közleményeken alapulnak, amelyekre a szövegben római számokkal hivatkozok.

- I.** Hermann, A., Varga, V., Janáky, R., Dohovics, R., Saransaari, P. and Oja, S.S. (2000) Interference of S-nitrosoglutathione with the binding of ligands to ionotropic glutamate receptors in pig cerebral cortical synaptic membranes. *Neurochem. Res.* 25:1119-1124.
- II.** Janáky, R., Shaw, C.A., Varga, V., Hermann, A. Dohovics, R., Saransaari, P. and Oja, S.S. (2000) Specific glutathione binding sites in pig cerebral cortical synaptic membranes. *Neuroscience* 95:617-624.
- III.** Hermann, A., Varga, V., Saransaari, P., Oja, S.S. and Janáky, R. (2001) Involvement of amino-acid side chains of membrane proteins in the binding of glutathione to pig cerebral cortical membranes. *Neurochem Res.*, in extenso közlésre elfogadva
- IV.** Janáky, R., Varga, V., Hermann, A., Saransaari, P. and Oja, S.S. (2000) Mechanisms of L-cysteine neurotoxicity. *Neurochem. Res.* 25:1397-1405.
- V.** Hermann, A., Janáky, R., Dohovics, R., Saransaari, P., Oja, S.S. and Varga, V. (1999) Potentiation by L-cysteine of N-methyl-D-aspartate receptor: effects on intracellular free Ca^{2+} in cultured cerebellar granule cells. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 42:25-26.

A TÉZISEKHEZ KAPCSOLÓDÓ EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

Cikkek:

1. Janáky, R., Varga, V., Hermann, A., Serfözö, Z., Dohovics, R., Saransaari, P. and Oja, S.S. (1997) Effect of glutathione on [³H]dopamine release from the mouse striatum evoked by glutamate receptor agonists, eds A. Teelken and J. Korf, Plenum Press, New York, pp. 733-736.
2. Janáky, R., Dohovics, R., Hermann, A., Oja, S.S. and Saransaari, P. (2001) Effects of metabotropic glutamate receptor agonists and antagonists on D-aspartate release from mouse cerebral cortical and striatal slices. *Neurochem. Res.* In press

Absztraktok:

1. Janáky, R., Varga, V., Hermann, A., Saransaari, P. és Oja, S.S. (1996) Glutamát agonistákkal kiváltott [³H]dopamin felszabadulás egér striátumból: a glutation és tiol-redox vegyületek hatása. Összefoglalók, XXIV. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, p. 60.
2. Hermann, A., Janáky, R., Saransaari, P., Oja, S.S. és Varga, V. (1996) Káliummal kiváltott [³H]dopamin felszabadulás egér striátumból: a glutation és tiol-redox vegyületek hatása. Összefoglalók, XXIV. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, p. 74.
3. Varga, V., Janáky, R., Hermann, A., Dohovics, R., Saransaari, P. and Oja, S.S. (1996) [³H]Dopamine release from mouse striatum evoked by glutamate receptor agonist: effect glutathione and thiol redox agents. *J. Neurochem.* 66, Suppl. 2, S31.
4. Janáky, R., Varga, V., Hermann, A., Dohovics, R., Saransaari, P. and Oja, S.S. (1998) Characterization of glutathione binding to specific receptors in pig cerebral cortical synaptic membranes. Abstracts of the 2nd International Symposium on Synaptic Transmission, Barcelona, p. 61.
5. Hermann, A., Janáky, R., Varga, V., Dohovics, R., Saransaari, P. and Oja, S.S. (1998) S-Nitrozoglutation hatása glutamát receptor ligandumok kötődésére agyi szinaptikus plazmamembrán preparátumon. Összefoglalók, XXVIII. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, p. 9.
6. Janáky, R., Varga, V., Hermann, A., Dohovics, R., Saransaari, P. and Oja, S.S. (1998) A [³H]glutation kötődés jellemzése kérgi szinaptikus plazmamembrán preparátumon. Összefoglalók, XXVIII. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, p. 10.
7. Janáky, R., Varga, V., Hermann, A., Dohovics, R., Saransaari, P. and Oja, S.S. (1998) A neurotranszmitter glutation specifikus receptorokhoz kötődik kérgi szinaptikus plazmamembrán preparátumban. Összefoglalók, XXVIII. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, p. 11.

8. Hermann, A., Janáky, R., Varga, V., Dohovics, R., Saransaari, P. and Oja, S.S. (1998) Displacement of glutamate receptor ligands by S-nitrosoglutathione in pig cerebral cortical synaptic membranes. Abstracts of the 3rd International Congress of Pathophysiology, Lahti, p. 208.
9. Janáky, R., Varga, V., Hermann, A., Dohovics, R., Saransaari, P. and Oja, S.S. (1998) Specific binding sites for neurotransmitter candidate glutathione in pig cerebral cortical synaptic plasma membrane. Abstracts of 3rd International Congress of Pathophysiology, Lahti, p. 208.
10. Janáky, R., Varga, V., Hermann, A., Dohovics, R., Saransaari, P. and Oja, S.S. (1998) Displacement of [³H]glutathione by cysteine and glutathione derivatives in pig cerebral synaptic membranes. Abstracts of the 3rd International Congress of Pathophysiology, Lahti, p. 209.
11. Hermann, A., Varga, V., Janáky, R., Dohovics, R., Saransaari, P. and Oja, S.S. (1998) Glutamate receptors and S-nitrosoglutathione. Abstracts of the 4th Congress of the Nordic Society for Research in Brain Aging, Tampere, p. 7.
12. Janáky, R., Varga, V., Shaw, C.A., Hermann, A., Dohovics, R., Saransaari, P. and Oja, S.S. (1998). Glutathione binding to specific receptors in cerebral cortical synaptic membranes. Abstracts of the Society for Neuroscience 28th Annual Meeting, Los Angeles, CA, part 2, p. 1835.
13. Hermann, A., Varga, V., Janáky, R., Dohovics, R., Saransaari, P. and Oja, S.S. (1998) Interference of S-nitrosoglutathione with the binding of ligands to ionotropic glutamate receptors in pig cerebral cortical synaptic membranes. Excitatory Amino Acid Meeting 98, Manaus, p. 95.
14. Dohovics, R., Varga, V., Janáky, R., Hermann, A., Saransaari, P. and Oja, S.S. (1999). cAMP dependent processes in glutamatergic corticostriatal neurotransmission. Abstracts of the Joint Meeting of the ISN and ESN, Berlin, p. 42.
15. Hermann, A., Varga, V., Janáky, R., Dohovics, R., Saransaari, P. and Oja, S.S. (1999) S-nitrosoglutathione is a potential endogenous ligand at ionotropic glutamate receptors. Abstracts of the Joint Meeting of the ISN and ESN, Berlin, p. 149.
16. Dohovics, R., Janáky, R., Varga, V., Hermann, A., Saransaari, P. and Oja, S.S. (1999). Presynaptic adenosine and metabotropic glutamate receptors in the regulation of glutamatergic cortico striatal neurotransmission. Abstracts of the 3rd International Meeting on Metabotropic Glutamate Receptors, Taormina, p. 43.
17. Oja, S.S., Hermann, A., Janáky, R., Dohovics, R., Saransaari, P. and Varga, V. (1999) S-Nitrosoglutathione interferes with the binding of ligands to ionotropic glutamate receptors in pig cerebral cortical membranes. Abstracts of the Society for Neuroscience 29th Annual Meeting, Miami Beach, FL, part 2, p. 1488.
18. Hermann, A., Janáky, R., Saransaari, P., Oja, S. S. and Varga, V. (2000) Roles of amino-acid side chains in the binding of glutathione to pig cerebral cortical membranes. Abstracts of the Forum of European Neuroscience, Brighton, p. 265.

19. Hermann, A., Janáky, R., Dohovics, R., Saransaari, P., Oja S.S., és Varga, V.(2001). A szinaptikus plazmamembrán glutation receptorok: az aminosav oldalláncok szerepe a specifikus kötődésben. Összefoglalók, XXXI. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, p. 32.
20. Hermann, A., Janáky, R., Dohovics, R., Saransaari, P., Oja, S.S. and Varga, V. (2001) Effects of chemical modification of putative glutathione receptors on the ligand binding to porcine cerebral cortical membranes. *J. Neurochem.* 78, Suppl. 1, 186.
21. Dohovics, R., Janáky, R., Varga, V., Hermann, A., Saransaari, P. and Oja, S.S. (2001) Interactions of presynaptic G-protein-linked receptors in the regulation of glutamatergic neurotransmission in the striatum. *J. Neurochem.* 78, Suppl. 1, 197.

HIVATKOZOTT KÖZLEMÉNYEK

Agrawal, S.G. and Evans, R.H. (1986) The primary afferent depolarizing action of kainate in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 87: 345-355.

Aizenman, E., Hartnett, K.A. and Reynolds, I.J. (1990) Oxygen free radicals regulate NMDA receptor function via a redox modulatory site. *Neuron* 5:841-846.

Aizenman, E., Lipton, S.A., and Loring, R.H. (1989) Selective modulation of NMDA responses by reduction and oxidation. *Neuron* 2:1257-1263.

Amsterdam, van F.T.M., Giberti, A., Mugnaini, M. and Ratti, E. (1992) 3-[(\pm) -2-Carboxypiperazin-4-yl]propyl-1-phosphonic acid recognizes two N-methyl-D-aspartate binding sites in rat cerebral cortex membranes. *J. Neurochem.* 59:1850-1855.

Andiné, P., Orwar, O., Jacobson, I., Sandberg, M. and Hagberg, H. (1991) Extracellular acidic sulfur-containing amino acids and γ -glutamyl peptides in global ischemia: postischemic recovery of neuronal activity is paralleled by a tetrodotoxin-sensitive increase in cysteine sulfinate in the CA1 of the rat hippocampus. *J. Neurochem.* 57:230-236.

Anis, N.A., Berry, S.C., Burton, N.R. and Lodge, D. (1983) The dissociative anesthetics ketamine and phencyclidine selectively reduce excitation of central mammalian neurons by N-methyl-D-aspartate. *Br. J. Pharmacol.* 79:565-575.

Arnelle, D.R. and Stamler, J.S. (1995) NO^+ , NO^\bullet and NO^- donation by S-nitrosothiols: implications for regulation of physiological functions by S-nitrosylation and acceleration of disulfid formation. *Arch. Biochem. Biophys.* 318: 279-285.

Arnold, W.P., Mittal, C.K., Katsuki, S. and Murad F. (1977) Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3'5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74:3203-3207.

Ascher, P. and Nowak, L. (1988) The role of divalent cations in the N-methyl-D-aspartate responses of mouse central neurones in culture. *J. Physiol.* 399:247-266

Bahn, S., Volk, B. and Wisden, W. (1994) Kainate receptor gene expression the developing rat brain. *J. Neurosci.* 14: 5525-5547.

Bains, J.S., Curry, K., Janáky, R., Ogita, K., Oja, S.S., Pasqualotto, B.A., Saransaari, P., Smith, C.A. and Yoneda, Y. (1998) A new model of the role of glutathione in signal transduction in mammalian CNS. *Soc. Neurosci. Abstr.* 24 1835.

Bains, J.S., Pasqualotto, B.A., Shaw, C.A. and Curry K. (1997) Localization of glutathione binding sites in the central nervous system of rat. *Soc. Neurosci. Abstr.* 23:1761

Balanos, J.P., Heales, S.J.R., Peuchen, S., Barker, J.E., Land, J.M. and Clarke, J.B. (1996) Nitric oxide mediated mitochondrial damage: a potential neuroprotective role of glutathione. *Free Radic. Biol. Med.* 21: 995-1001.

Bannenberg, G., Xue, J., Engman, L., Cotgreave, I., Moldeus, P. and Ryrfeldt, A. Characterization of bronchodilator effects and fate of S-nitrosothiols in the isolated perfused and ventilated guinea pig lung. (1995) *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics*. 272:1238-45.

Beckmann, J.S, Beckmann, T.W. Chen, J.Marshall, P.A. and Freeman, B.A. (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 87:1620-1624

Bennett, J.A. and Dingledine, R. (1995) Topology profile for a glutamate receptor: Three transmembrane domains and a channel-lining reentrant membrane loop. *Neuron* 14:373-384.

Bettler, B., Boulter, J., Hermans-Borgmeyer, I., O'Shea-Greenfield, A., Deneris, E.S., Moll, C., Borgmeyer, U., Hollmann, M. and Heinemann, S. (1990) Cloning of a novel glutamate receptor subunit. GluR5-expression in the nervous system during development. *Neuron* 5: 583-595.

Bettler, B., Egebjerg, J., Sharma, G., Pecht, G., Hermans-Borgmeyer, I., Moll, C., Stevens, C.F. and Heinemann, S. (1992) Cloning of a putative glutamate receptor: a low affinity kainate-binding subunit. *Neuron* 8:257-265.

Blaschke, M., Keller, B.U., Rivoscecchi, R., Hollmann, M., Heinemann, S. and Kennerth, A. (1993) A single acid determines the subunit-specific spider toxin block of α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate/kainate receptor channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6528-6532.

Bonfoco, E., Krainc, D., Ankarcona, M., Nicotera, P. and Lipton, S.A. (1995) Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92:7162-7166.

Bonner, F.T. (1996) Nitric oxide gas. *Methods in Enzymology*. 268:50-7.

Boss, V., Nutt, K.M. and Conn, P.J. (1994) L-cysteine sulphinic acid as an endogenous agonist of a novel metabotropic receptor coupled to stimulation of phospholipase D activity. *Mol. Pharmacol.* 45:1177-1182.

Bradbury, M.W.B. and Deane, R. (1993) Permeability of the blood-brain barrier to lead. *Neurotoxicology* 14:131-136.

Bredt, D.S. (1999) Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Rad. Res.* 31: 577-596.

Bredt, D.S. and Snyder S.H (1990) Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 87:682-685

Bredt, D.S., Glatt, C.E., Hwang, P.M. Fotuhi, M., Dawson T.M. and Snyder S.H. (1991a) Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the the mammalian CNS together with NADPH diaphorase.

- Bredt, D.S., Hwang, P.M, Glatt, C.E., Lowenstein, C., Reed R.R. and Snyder S.H. (1991b) Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 351:714-718
- Brorson, J.R, Sulit, R.A. and Zhang, H. (1997) Nitric oxide disrupts Ca^{2+} homeostasis in hippocampal neurons. *J. Neurochem.* 68:95-105
- Brorson, J.R. and Zhang, H. (1997) Disrupted $[Ca^{2+}]_i$ homeostasis contributes of homocysteine to the toxicity of nitric oxide in cultured hippocampal neurons. *J. Neurochem.* 69:1882-1889.
- Brown, G.C. (1995) Nitric oxide regulates mitochondrial respiration and cell functions by inhibiting cytochrome oxidase. *FEBS. Letts.* 369: 136-145.
- Brune, B. and Lapetina E.G. (1989) Activation of a cytosolic ADP-ribosyltransferase by nitric oxide generating agents. *J. Biol. Chem.* 264:8455-8458
- Buchan, A.M., Gertler, S.Z., Huang, Z.G., Li, H., Chaundy, K.E. and Xue, D. (1994) Failure to prevent selective CA1 neuronal death and reduce cortical infarction following cerebral ischemia with inhibition of nitric oxide synthase. *Neuroscience* 61:1-11.
- Buller, A.L., Larson, H.C., Morrisett, R.A. and Monaghan, D.T. (1995) Glycine modulates ethanol inhibition of heterometric N-methyl-D-aspartate receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Mol. Pharmacol.* 48:717-723.
- Burnashev, N., Schoepfer, R., Monyer, H., Ruppersberg, J.P., Günther, W., Seeburg, P.H. and Sakmann, B. (1992) Control by asparagine residues of calcium permeability and magnesium blockade in the NMDA receptor. *Science* 257:1415-1419.
- Butler, A.R., Flitney, F.W. and Williams, D.L. (1985) NO, nitrosonium ions, nitroxide ions, nitrosothiols and iron-nitrosyls in biology: a chemist's perspective. *Trends Pharmacol. Sci.* 16: 18-22.
- Cai, N.S., Kiss, B. and Erdo, S.L. (1991) Heterogeneity of N-methyl-D-aspartate receptors regulate the release of dopamine and acetylcholine from striatal slices. *J. Neurochem.* 57:2148-2151.
- Carter, C., Rivy, J.-P. and Scatton, B. (1989) Ifenprodil and SL82.0715 are antagonists at the polyamine site of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 164:611-612.
- Cartmell, J. and Schoepp, D.D. (2000) Regulation of neurotransmitter release by metabotropic glutamate receptors. *J Neurochem.* 75: 889-907.
- Chan, P., Kerlan, R. and Fishman, R.A. (1983) Reduction of γ -butiric acid and glutamate uptake and $(Na^+ - K^+)$ -ATPase activity in brain slices and synaptosomes by arachidonic acid. *J. Neurochem.* 40:309-316.
- Chen, G.-Q. and Gouaux, E. (1997) Overexpression of a glutamate receptor (GluR2) ligand binding domain in *Eschericia coli*: application of a novel protein folding screen. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 94: 13431-13436.

- Chen, L.S. and Huang, L.Y. (1992) Protein kinase C reduces Mg^{2+} block of NMDA-receptor channels as a mechanism of modulation. *Nature* 356:521-523.
- Chen, S.-C., Curran, T. and Morgan, J.I. (1995) Apoptosis in the nervous system: new revelations. *J. Clin. Path.* 48: 7-12.
- Chen, T.S., Richie, J.P., Jr. and Lang, C.A. (1989) The effect of aging on glutathione and cysteine levels in different regions of the mouse brain. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 190:399-402.
- Chittajallu, R., Vignes, M., Dev, K.K., Barnes, J.M., Collingridge, G.L. and Henley, J.M. (1996) Regulation of glutamate release by presynaptic kainate receptors in the hippocampus. *Nature* 379: 78-81.
- Chiueh, CC. (1999) Neuroprotective properties of nitric oxide. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 890:301-11.
- Chiueh, CC. and Rauhala, P. (1999) The redox pathway of S-nitrosoglutathione, glutathione and nitric oxide in cell to neuron communications. *Free Radical Research.* 31:641-50.
- Choi, D.W. (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1: 623-634.
- Choi, Y.-B. and Lipton, S.A. (2000) Redox modulation of the NMDA receptor. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 57: 1535-1541.
- Clancy, R.M, Levartovsky, J., Leszczynska-Piztak, Yegudin, J. and Abramson S.B. (1994) Nitric oxide reacts with intracellular glutathione and activates the hexose monophosphate shunt in human neutrophils: evidence for S-nitrosoglutathione as a bioactive intermediary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 91:3680-3684.
- Cleland, W.W. (1964) *Biochemistry* 3: 480.
- Collingridge, G.L. and Lester, A.J. (1989) Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol. Rev.* 40:143-210.
- Compton, R.P., Hood, W.F. and Monahan, J.B. (1990) Evidence for a functional coupling of the NMDA and glycine recognition sites in synaptic plasma membranes. *Eur. J. Pharmacol.* 188:63-70.
- Conn, P.J. and Desai, M.A. (1991) Pharmacology and physiology of metabotropic glutamate receptors in mammalian central nervous system. *Drug. Dev. Res.* 24:207-229.
- Conn, P.J. and [Pin, J.P.](#) (1997) Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37: 205-237.
- Corti, C., Restituito, S., Rimland, J.M., Brabet, I., Corsi, M., Pin, J.P. and Ferraguti, F. (1998) Cloning and characterization of alternative mRNA forms for the rat metabotropic glutamate receptors mGluR7 and mGluR8. *Eur. J. Neurosci.* 10: 3629-3641.
- Cotman, C.W. and Taylor, D. (1972) Isolation and structural studies on synaptic complexes from rat brain. *J. Cell Biol.* 55:696-711.

Coyle, J.T. (1983) Neurotoxic action of kainic acid. *J. Neurochem.* 41: 1-11.

D'Emília, D.M. and Lipton, S.A. (1999) Ratio of S-nitrosohomocyst(e)ine to homocyst(e)ine or other thiols determines neurotoxicity in rat cerebrocortical cultures. *Neurosci. Lett.* 265:103-106.

Dawson, B.L., Dawson, T.M., Bartley, D.A., Uhl, G.R. and Snyder, S.A. (1993) Mechanisms of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain cultures. *J. Neurosci.* 13: 2651-2661.

Dawson, T.M., Brecht, D.S, Fotuhi, M., Hwang, P.M. and Snyder, S.H. (1991a) Nitric oxide synthetase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:7797-7801

Dawson, T.M., Gonzales-Zulueta, M., Kusel, J. and Dawson, V. L. (1998) Nitric oxide: diverse action in the central and peripheral nervous system. *Neuroscientist* 4:96-112.

Dawson, V.L., Dawson, T.M., London, E.D., Brecht, D.S. and Snyder, S.H. (1991b) Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:6368-6371.

Dawson, V.L., Kizushi, V.M., Huang, P.L, Snyder, S.H. and Dawson, T.M. (1996) Resistance to neurotoxicity in cortical cultures from neuronal nitric oxide synthase-deficient mice. *J. Neurosci.* 16:2479-2487.

De Groote, M.A., Granger, D., Xu, Y., Campbell, G., Prince, R. and Fang, F.C. (1995) Genetic and redox determinants of nitric oxide cytotoxicity in a *Salmonella typhimurium* model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:6399-6403.

Demerle-Pallardy, C., Lonchamp, M.O, Chabrier, P.E. and Braquet, P. (1991) Absence of implication of L-arginine/nitric oxide pathway on neuronal cell injury induced by L-glutamate or hypoxia. *Biochem & Biophys. Res. Comm.* 181:456-464

Deneke, S.M and Fanburg, B.L. (1989) Regulation of cellular glutathione. *Am. J. Physiol.* 257:L163-173

Dimmeler, S. and Brune, B. (1992) Characterization of a nitric-oxide-catalyzed ADP-ribosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Eur. J. Pharmacol.* 210:305-310

Drapier, J.C. and Hibbs, J.B. (1996) Aconitases: a class of metalloproteins highly sensitive to nitric oxide synthesis. *Methods in Enzim.* 269: 26-32.

Dringen, R., Pfeiffer, B. and Humprecht, B. (1999) Synthesis of the antioxidant glutathione in neurons: supply by astrocytes of CysGly as precursor for neuronal glutathione. *J. Neurosci.* 19:562-569.

Dumuis, A., Sebben, M, Haynes, L., Pin, J.P. and Bockaert, J. (1988) NMDA receptors activate the arachidonic acid cascade system in striatal neurons. *Nature* 336:68-70.

- Edman, P. (1950) Method for determination of the amino acid sequence in peptides. *Acta Chem. Scand.* 4: 283-293.
- Egebjerg, J. and Heinemann, S.P. (1993) Ca^{2+} permeability of unedited and edited versions of the kainate selective glutamate receptor GluR6. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90:755-759.
- Egebjerg, J., Bettler, B., Hermans-Borgmeyer, I. and Heinemann, S. (1991) Cloning of a cDNA for a glutamate receptor subunit activated by kainate but not AMPA. *Nature* 351:745-748.
- Fagni, L., Olivier, M., Lafon-Cazal, M. and Bockaert, J. (1995) Involvement of divalent ions in the nitric oxide-induced blockade of N-methyl-D-aspartate receptors in cerebellar granule cells. *Mol. Pharmacol.* 47: 1239-1247.
- Fiorillo, C.D. and Williams, J.T. (1998) Glutamate mediates an inhibitory postsynaptic potential in dopamine neurons. *Nature* 394: 78-82.
- Fletcher, E.J., Mewett, K.N., Drew, C.A., Allan, D.R. and Johnston, G.A.R. (1991) Inhibition of L-glutamic acid uptake into rat cortical synaptosomes by the conformationally restricted analogue of glutamic acid, cis-1-aminocyclobutane-1,3-dicarboxylic acid. *Neurosci. Lett.* 121:133-135.
- Folbergrova, J., Rehncrona, S. and Siesjö, B.K. (1979) Oxidized and reduced glutathione in the rat brain under normoxic and hypoxic conditions. *J. Neurochem.* 32:1621-1670
- Froissard, P., Monroq, H. and Duval, D. (1997) Role of glutathione metabolism in the glutamate-induced programmed cell death of neuronal-like PC12 cells. *Eur. J. Pharmacol.* 326:93-99.
- Garthwaite, J. and Boulton, C.L. (1995) Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Ann. Rev. Physiol.* 57:683-706.
- Garthwaite, J., Charles, S.J. and Chess-Williams, R. (1988) Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intracellular messenger in the brain. *Nature* 336:385-388.
- Garthwaite, J. and Garthwaite, G. (1983) The mechanism of kainic acid neurotoxicity. *Nature* 305: 138-140.
- Gaston, B., Drazen, J.M., Jansen, A., Sugarbaker, D.A., Loscalzo, J. and Stamler, J.S. (1995) Relaxation of human bronchial smooth muscle by S-nitrosothiols in vitro. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 268:978-984.
- Geller, D.A., Lowenstein, C.J., Shapiro, R.A., Nussler, A.K., Di Silvio, M., Wang, S.C., Nakayama, D.K., Simmons, R.L., Snyder S.H. and Billar, T.R. (1993) Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:3491-3495.
- Gergel, D. and Cederbaum, A.I. (1996) Inhibition of the catalytic activity of alcohol dehydrogenase by nitric oxide is associated with S-nitrosylation and the release of zinc. *Biochemistry* 35: 16186-16194.

- Gill, R. and Lodge, D. (1997) Pharmacology of AMPA antagonists and their role in neuroprotection. In: Neuroprotective agents and cerebral ischaemia. *Int. Rev. Neurobiol.* 40:197-232.
- Grasseti, D.R. and Murray, J.F.Jr. (1967) Determination of sulhydryl groups with 2'2'- or 4'4'-dithiodipyridine. *Arch. Biochem. Biophys.* 119:41-49.
- Griffiths, R. (1990) Cysteine sulphinate (CSA) as an excitatory amino acid transmitter candidate in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 35:313-323.
- Griffiths, R., Grieve, A., Dunlop, J., Damgaard, I., Fosmark, D. and Schousboe, A. (1989) Inhibition by excitatory sulphur amino acids of the high-affinity L-glutamate transporter in synaptosomes and in primary cultures of cortical astrocytes and cerebellar neurons. *Neurochem. Res.* 14:313-323.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R.Y. (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry.* 260:3440-50.
- Guo, N. and Shaw, C. (1992) Characterization and localization of glutathione binding sites on cultured astrocytes. *Molec. Brain Res.* 15: 207-215.
- Guo, N., McIntosh, C. and Shaw, C. (1992) Glutathione: new candidate neuropeptide in the central nervous system. *Neuroscience* 51: 835-842.
- Harrison, M.L. and Simmonds M.A. (1985) Quantitative studies on some antagonist of N-methyl-D-aspartate in slices of rat cerebral cortex. *Br. J. Pharmacol.* 84:381-391.
- Hawkins, L.M., Beaver, D.E.J., Taylor, P.M., Sunter, D.C. and Roberts, P.J. (1995) Characterization of the pharmacology and regional distribution of (S)-[³H]-5-fluorowillardiine in rat brain. *Br. J. Pharmacol.* 116: 2033-2039.
- Heafield, M.T., Fearn, S., Steventon, G.B., Waring, R.H., Williams, A.C. and Sturman, S.G. (1990) Plasma cysteine and sulphate levels in patients with motor neuron, Parkinson's and Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 110:216-220.
- Henley, J.M. (1994) Kainate-binding proteins: phylogeny, structures and possible functions. *Trends Pharmacol. Sci.* 15:182-189.
- Herb, A., Burnashev, N., Werner, P., Sakmann, B., Wisden, W. and Seeburg, P.H. (1992) The KA-2 subunit of excitatory amino acid receptors shows widespread expression in brain and forms ion channels with distantly related subunits. *Neuron* 8:775-785.
- Herlitze, S., Raditsch, M., Ruppertsberg, J.P., Jahn, W., Monyer, H., Schoepfer, R. and Witzemann, V. (1993) Argiotoxin detects molecular differences in AMPA receptor channels. *Neuron* 10:1130-1140.
- Hewett, S. J., Corbett, J.A., McDaniel, M.L. and Choi, D.W. (1993) Inhibition of nitric oxide formation does not protect murine cortical cell cultures from N-methyl-D-aspartate neurotoxicity. *Brain. Res.* 625:337-341.

- Hibbs, J.B., Vavrin, Z. and Taintor, R.R. (1987) L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J. Immunol.* 138:550-556
- Hirahi, H., Kirsch, J., Laube, B., Betz, H. and Kuhse, J. (1996) The glycine binding site of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR1: identification of novel determinants of coagonist potentiation in the extracellular M3-M4 loop region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 6031-6036.
- Hirai, H., Kirsch, J., Laube, B., Betz, H. and Kuhse, J. (1996) The glycine binding site of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR1: Identification of novel determinants of co-agonist potentiation in the extracellular M3-M4 loop region. *Neurobiology* 93: 6031-6036.
- Hirayama, A., Noronha-Dutra, A.A., Gordge, M.P., Neild, G.H. and Hothersall, J.S. (1999) S-nitrosothiols are stored by platelets and released during platelet-neutrophil interactions. *Nitric Oxide.* 3:95-104.
- Hjelle, O.P., Rinvik, E., Huster, D., Reichelt, W. and Otterson, O.P. (1998) Antibodies to glutathione: production, characterization, and immunocytochemical application to the central nervous system. In *Glutathione in the Nervous System* (ed. Shaw C.A.), pp. 63-88. Taylor & Francis, Washington, D.C.
- Hjelle, O.P., Chaundry, F.A. and Ottersen, O.P. (1994) Antisera to glutathione: characterization and immunocytochemical application to the rat cerebellum. *Eur. J. Neurosci.* 6:793-804.
- Hogg, N., Singh, R.J. and Kalyanaraman, B. (1996) The role of glutathione in the transport and catabolism of nitric oxide. *FEBS Lett.* 382:223-228.
- Hollmann, M. and Heinemann, S. (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 17:31-108.
- Hollmann, M., Boulter, J., Maron, C., Beasley, L., Sullivan, J., Pecht, G. and Heinemann, S. (1993) Zinc potentiates agonist-induced currents at certain splice variants of the NMDA receptor. *Neuron* 10:943-954.
- Holopainen, I. and Kontro, P. (1988) Glutamate release from cerebellar granule cells differentiating in culture: modulation of the K⁺-stimulated release by inhibitory amino acids. *Neurochem. Int.* 12:155-161.
- Holopainen, I., Enkvist, M.O.K. and Akerman, K.E.O. (1989) Glutamate receptor agonists increase intracellular Ca²⁺ independently of voltage-gated Ca²⁺ channels in rat cerebellular granule cells. *Neurosci. Lett.* 98:57-62.
- Hoyt, K.R., Tang, L.-H., Aizenman, E. and Reynolds, I.J. (1992) Nitric oxide modulates NMDA-induced increases in intracellular Ca²⁺ in cultured rat forebrain neurons. *Brain. Res.* 592:310-316.
- Huang, Z., Huang, P.L., Panahian, N., Dalkara, T., Fischman, M.C and Moskowitz, M.A. (1994) Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. *Science* 265:1883-1885.

- Huettner, J.E. (1990) Glutamate receptor channels in rat DRG neurons: activation by kainate and quisqualate and blockade of desensitization by Con A. *Neuron* 5: 255-266.
- Hullebroeck, M.F, and Hampson, D.R. (1992) Characterization of the oligosaccharide side chains on kainate binding proteins and AMPA receptors. *Brain Res.* 590:187-192.
- Hume, R.I., Dingledine, R. and Heinemann, S.F. (1991) Identification of a site in glutamate receptor subunits that controls calcium permeability. *Science* 253:1028-1031.
- Huntley, G.W., Rogers, S.W., Moran, T., Jansen, W., Archin, N., Vickers, J.C., Cauley, K., Heinemann, S.F. and Morrison, J.H. (1993) Selective distribution of kainate receptor subunit immunoreactivity in monkey neocortex revealed by a monoclonal antibody that recognizes glutamate receptor subunits GluR5/6/7. *J. Neurosci.* 13: 2965-2981.
- Iino, M., Ozawa, S. and Tsuzuki, K. (1990) Permeation of calcium through excitatory amino acid receptor in cultured rat hippocampal neurones. *J. Physiol. (Lond.)* 424: 151-165.
- Ikeda, K., Nagasawa, H., Mori, H., Araki, K., Sakimura, K., Watanabe, M. Inoue, Y. and Mitshina, M. (1992) Cloning and expression of the e4 subunit of the NMDA receptor channel. *FEBS Lett.* 313:34-38.
- Ishii, T., Moriyoshi, K., Sugihara, H., Sakurada, K., Kadotani, H., Yokoi, M., Akazawa, C., Shigemoto, R., Mizuno, N., Masu, M. and Nakanishi, S. (1993) Molecular characterization of the family of the N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *J. Biol. Chem.* 268:2836-2843.
- Jahr, C.E. and Stevens, C.F. (1987) Glutamate activates multiple single channel conductances in hippocampal neurones. *Nature* 325:522-525
- Jain, A., Martenson, J., Stole, E., Auld, P.A.M. and Meister, A. (1991) Gultathione deficiency leads to mitochondrial damage in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 1913-1917.
- Janáky, R., Ogita, K., Pasqualotto, B.A., Bains, J.S., Oja, S.S., Yoneda, Y. and Shaw, C.A. (1999) Glutathione and signal transduction in mammalian CNS. *J. Neurochem.* 73: 889-902.
- Janáky, R., Varga, V., Jenei, Zs., Saransaari, P. and Oja, S.S. (1998) Glutathione and glutathione derivatives: possible modulators of ionotropic glutamate receptors. In *Glutathione in the Nervous System* (ed. Shaw, C.A.), pp. 163-196. Taylor& Francis, Washington, DC.
- Janáky, R., Varga, V., Saransaari, P. and Oja, S.S. (1993) Glutathione modulates the N-methyl-D-aspartate receptor-activated calcium influx into cultured rat cerebellar granule cells. *Neurosci. Lett.* 156: 153-157.
- Janssens, S.P., Shimouchi, A., Qertermous, T., Bloch, D.B. and Bloch, K.D. (1992) Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synhase. *J. Biol. Chem.* 267:14519-14522
- Jenei, Zs., Janáky, R., Varga, V., Saransaari, P. and Oja, S.S. (1998) Interference of S-alkyl derivatives of glutathione with brain ionotropic glutamate receptors. *Neurochem. Res.* 23: 1087-1093.

- Jenei, Zs., Varga, V., Janáky, R., Saransaari, P. and Oja, S.S. (1997) Ligand binding to porcine ionotropic glutamate receptors with chemically modified arginyl residues. *Neurosci. Lett.* 234: 83-86.
- Ji, Y., Akerboom, T.P., Sies, H. and Thomas, J.A. (1999) S-nitrosylation and S-glutathiolation of protein sulfhydryls by S-nitroso glutathione. *Arch. Biochem. Biophys.* 362:67-78.
- Johansen, T.H., Drejer, J., Watjen, F. and Nielsen, E.O. (1993) A novel non-NMDA antagonist shows selective displacement of low-affinity [³H]kainate binding. *Eur. J. Pharmacol.* 246: 195-204.
- Kanazawa, A., Kakimoto, Y., Nakajima, T. and Sano, I. (1965) Identification of γ -glutamylserine, γ -glutamylalanine, γ -glutamylvaline and S-methylglutathione of bovine brain. *Biochim. Biophys. Acta* 111:90-95.
- Kannan, R., Yi, J.-R., Zlokovic, B.V. and Kaplowitz, N. (1998) Carrier-mediated GSH transport at the blood-brain barrier and molecular characterization of novel brain GSH transporters. In *Glutathione in the Nervous System* (ed. Shaw, C.A.), pp. 45-62. Taylor & Francis, Washington, DC.
- Kaplita, P.V. and Ferkany, J.W. (1990) Evidence for direct interactions between the NMDA and glycine recognition sites in brain. *Eur. J. Pharmacol.* 188:175-179.
- Karlsen, R.L., Grofova, I., Malthe-Sorensen, D. and Fonnum, F. (1981) Morphological changes in rat brain induced by L-cysteine injection in newborn animals. *Brain Res.* 208:167-180.
- Kawamoto, S., Hattori, S., Oji, Í., Hamajima, K., Mishina, M. and Okuda, K. (1994) Ligand-binding properties and N-glycosylation of α 1 subunit of the α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate (AMPA)-selective glutamate receptor channel expressed in a baculovirus system. *Eur. J. Biochem.* 223:665-673.
- Kawamoto, S., Hattori, S., Sakimura, K., Mishina, M. and Okuda, K. (1995) N-Linked glycosylation of the α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate (AMPA)-selective glutamate receptor channel α 2 subunit is essential for the acquisition of ligand-binding activity. *J. Neurochem.* 64:1258-1266.
- Kawamoto, S., Uchino, S., Xin, K.-Q., Hattori, S., Hamajima, K., Fukushima, J., Mishina, M. and Okuda, K. (1997) Arginine-481 mutation abolishes ligand-binding of the AMPA-selective glutamate receptor channel α 1-subunit. *Mol. Brain Res.* 47: 339-344.
- Keller, H.J., Do, K.Q., Zollinger, M., Winterhalter, K.H. and Cuénod, M. (1989) Cysteine: depolarization-induced release from rat brain in vitro. *J. Neurochem.* 52:1801-1806.
- Kim, W.-K., Choi, Y.-B., Rayudu, P.V., Das, P., Asaad, W., Arnelle, D.R., Stamler, J.S. and Lipton, S.A. (1999) Attenuation of NMDA receptor activity and neurotoxicity by nitroxyl anion, NO⁻. *Neuron* 24:461-469.

- Kinouchi, H., Epstein, C.J., Mizui, T., Carlson, E., Chen, S.F. and Chan PH. Attenuation of focal cerebral ischemic injury in transgenic mice overexpressing CuZn superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:11158-11162.
- Kirstein, C.L., Coopersmith, R., Bridges, R.J. and Leon, M. (1991) Glutathione levels in olfactory and non-olfactory neural structures of rats. *Brain Res.* 543:341-346.
- Kiskin, N.I., Kristal, O.A., Tsyndrenko, A.Ya, and Akaike, N. (1986) Are sulfhydryl groups essential for function of the glutamate-operated receptor-ionophore complex? *Neurosci. Lett.* 66:305-310.
- Klatt, P. and Lamas, S. (2000) Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur. J. Biochem.* 267: 4928-4994.
- Klatt, P., Pineda, K., Molina, E., Perez-Sala, D. and Lamas, S. (2000) Novel application of S-nitrosoglutathione sepharose to identify proteins that are potential targets for nitrosoglutathione-induced mixed disulfide formation. *Biochem. J.* 271: 567-578.
- Klingman, J.G. and Choi, D.W. (1989) Toxicity of sulphur-containing amino acids on cultured cortical neurones. *Neurology* 39:397-398.
- Kluge, I., Gutteck, A.U., Zollinger, M. and Do, K.Q. (1997) S-nitrosoglutathione in rat cerebellum: identification and quantification by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Neurochem.* 69: 2599-2607.
- Knowles, R.G, Palacios, M., Palmer, R.M.G. and Moncada S. (1989) Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of soluble guanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:5159-5162.
- Köhler, M., Burnashev, N., Sakmann, B. and Seeburg, P.H. (1993) Determinants of Ca^{2+} permeability in both TM1 and TM2 of high affinity kainate receptor channels: diversity by RNA editing. *Neuron* 10:491-500.
- Köhr, G., Eckardt, S., Lüddens, H., Monyer, H. and Seeburg, P.H. (1994) NMDA receptor channels: subunit-specific potentiation by reducing agents. *Neuron* 12:1031-1040.
- Koller, K.J and Coyle, J.T. (1985) The characterization of the specific binding of [3 H]-N-acetylaspartylglutamate to rat brain membranes. *J. Neurosci.* 5:2882-2888.
- Kosower, N.S. and Kosower, E.M. (1978) The glutathione status of cells. *Int. Rev. Cytol.* 54: 109-160.
- Kots, A.Y., Skurat, A.V., Sergienko, E.A, Bulargina, T.V. and Severin, E.S. (1992) Nitroprusside stimulates the cysteine-specific mono (ADP-ribosylation) of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. *FEBBS. Lett.* 300:9-12
- Kowaluk, E.A. and Fung, H.-L. (1990) Spontaneous liberation of nitric oxide cannot account for in vitro vascular relaxation by S-nitrosothiols. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 255: 1256-1264.

- Krogsgaard-Larsen, P., Honore, T., Hansen, J.J., Curtis, D.R. and Lodge, D. (1980) New class of glutamate agonist structurally related to ibotenic acid. *Nature* 284: 64-66.
- Kullmann, D. M., Asztely, F. and Walker, M. C. (2000) The role of mammalian ionotropic receptors in synaptic plasticity: LTP, LTD and epilepsy. *Cell. and Mol. Life Sci.* 57:1551-1561.
- Kuner, T., Wollmuth, L.P., Karlin A., Seeburg, P.H. and Sakmann, B. (1996) Structure of the NMDA receptor channel M2 segment inferred from the accessibility of substituted cysteines. *Neuron* 17:343-352.
- Kuryatov, A., Laube, B., Betz, H. and Kuhse, J. (1994) Mutational analysis of the glycine-binding site of the NMDA receptor: structural similarity with bacterial amino acid-binding proteins. *Neuron* 12:1291-1300.
- Kutsuwada, T., Kashiwabuchi, N., Mori, H., Sakimura, K., Kushiya, E., Araki, K., Meguro, H., Masaki, H., Kumanishi, T., Arakawa, M. and Mishina, M. (1992) Molecular diversity of the NMDA receptor channel. *Nature* 358:36-41.
- Kuusinen, A., Arvola, M. and Keinänen, K. (1995) Molecular dissection of the agonist binding site of an AMPA receptor. *EMBO J.* 14:6327-6332.
- Lafon-Casal, M., Pietri, S., Culcasi, M. and Bockaert, J. (1993) NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature* 364:535-537.
- Lamas, S, Marsden, P.A. and Li, G.K. (1992) Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6348-6352.
- Lander, H.M., Hajjar, D.P., Hempstead, B.L., Mirza, U.A., Chait, B.T., Campbell, S. and Quilliam, L.A. (1997) A molecular redox switch on p21(ras). Structural basis for the nitric oxide-p21(ras) interaction. *J. Biol. Chem.* 272:4323-4326.
- Lanius, R.A., Krieger, C., Wagey, R. and Shaw, C. (1993) Increased [³⁵S]glutathione binding sites in spinal cords from patients with sporadic amyotrophic sclerosis. *Neurosci. Lett.* 163: 89-92.
- Lanius, R.A., Shaw, C., Wagey, R. and Krieger, C. (1994) Characterization, distribution, and protein kinase C-mediated regulation of [³⁵S]glutathione binding sites in mouse and human spinal cord. *J. Neurochem.* 63:155-160.
- Laube, B., Hirahi, H., Sturgess, M., Betz, H. and Kuhse, J. (1997) Molecular determinants of agonist discrimination by NMDA receptor subunits: analysis of the glutamate binding site on the NR2B subunit. *Neuron* 18:493-503.
- Lazarewicz, J.W., Wroblewski, J.T., Palmer, M.E. and Costa, E. (1989) Reduction of disulfide bonds activates NMDA-sensitive glutamate receptors in primary cultures of cerebellar granule cells. *Neurosci. Res. Comm.* 4:91-97.
- Le Bourdellés, B., Wafford, K.A., Kemp, J.A., Marshall, G., Bain, C., Wilcox, A.S., Sikela, J.M. and Whiting, P.J. (1994) Cloning, functional coexpression, and pharmacological

- characterisation of human cDNAs encoding NMDA receptor NR1 and NR2A subunits. *J. Neurochem.* 62:2091-2098.
- Lehmann, A., Hagberg, H., Orwar, O. and Sandberg, M. (1993) Cysteine sulphinate and cysteate: mediators of cysteine toxicity in the neonatal rat brain? *Eur. J. Neurosci.* 5:1398-1412.
- Lei, S.Z., Pan, Z.H., Aggarwal, S.H., Chen, H.S., Hartman, J., Sucher, N.J. and Lipton, S.A. (1992) Effect of nitric oxide production on the redox modulatory site of the NMDA receptor-channel complex. *Neuron* 8:1087-1099.
- Lenhoff, H.M. (1998) The discovery of the GSH receptor in hydra and its evolutionary significance. In *Glutathione in the Nervous System* (ed. Shaw, C.A.), pp. 25-43. Taylor & Francis, Washington, DC.
- Leslie, S.W., Brown, L.M., Trent R.D., Lee Y.-H., Morris, J.L., Jones T.W., Randall P.K., Lau S.S. and Monks T.J. (1992) Stimulation of N-methyl-D-aspartate receptor-mediated calcium entry into dissociated neurons by reduced and oxidized glutathione. *Mol. Pharmacol.* 41:308-314.
- Levy, D.I., Sucher, N.J. and Lipton, S.A. (1990) Redox modulation of NMDA receptor-mediated toxicity in mammalian central neurons. *Neurosci. Lett.* 110:291-296.
- Li, X., Orwar, O., Varga, V. and Sandberg, M. (1993b) Determination of acidic sulfur-containing amino acids, β -aspartyl and γ -glutamyl dipeptides in rat brain. *J. Neurochem. Suppl.* 61:S89A.
- Li, X., Wallin, C., Weber, S.G. and Sandberg, M. (1999) Net efflux of cysteine, glutathione and related metabolites from rat hippocampal slices during oxygen/glucose deprivation: dependence on γ -glutamyl transferase. *Brain Res.* 815:81-88
- Lipton, S.A. (1993) Prospects for clinically tolerated NMDA antagonists: open channel blockers and alternative redox states of nitric oxide. *Trends Neurosci.* 16:527-532.
- Lipton, S.A. and Stamler, J.S. (1994) Actions of redox-related congeners of nitric oxide at the NMDA receptor. *Neuropharmacology* 33: 1229-1233.
- Lipton, S.A., Choi, Y.B., Pan, Z.H., Lei, S.Z., Chen, H.S., Sucher, N.J., Loscalzo, J., Singel, D.J. and Stamler, J.S. (1993) A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso compounds. *Nature* 364:626-632.
- Lipton, S.A., Kim, W.K., Choi, Y.B., Kumar, S., D'Emilia, D.M., Raydu, P., Arnette, D.R. and Stamler, J.S (1997) Dual actions of homocysteine at the NMDA receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:5923-5928.
- Liu, L., Brown III, J.C., Webster, W.W., Morissett, R.A. and Monaghan, D.T. (1995) Insulin potentiates N-methyl-D-aspartate receptor activity in *Xenopus* oocytes and in rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* 192:5-8.
- Lodge, D. and Johnson, K.M. (1990) Noncompetitive excitatory amino acid receptor antagonists. *Trends Pharmacol. Sci.* 11:81-86.

- Lomeli, H., Sprengel, R., Laurie, D.J., Köhr, G., Herb, A., Seeburg, P.H. and Wisden, W. (1993) The rat delta-1 and delta-2 subunits extend the excitatory amino acid receptor family. *Fedn Eur. Biochem. Socs Lett.* 315: 318-322.
- Lomeli, H., Wisden, W., Köhler, M., Keinänen, K., Sommer, B. and Seeburg, P.H. (1992) High affinity kainate and domoate receptors in rat brain. *FEBS. Lett.* 307: 139-143.
- London, E.D. and Coyle, J.T. (1979) Specific binding of [³H]kainic acid to receptor sites in rat brain. *Mol. Pharmacol.* 15:492-505.
- Lothman, E.W. and Collins, R.C. (1981) Kainic acid induced limbic seizures: metabolic, behavioral, electroencephalographic and neuropathological correlates. *Brain Res.* 218:785-799.
- Lovinger, D.M., White, G. and Weight, F.F. (1989) Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons. *Science* 243:1721-1724.
- Lovinger, D.M., White, G. and Weight, F.F. (1990) Ethanol inhibition of neuronal glutamate receptor function. *Ann. Med.* 22:247-252.
- Lowenstein, C.J., Glatt, C.S., Bredt, D.S and Snyder S.H. (1991) Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA.* 89:6711-6715
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* 193:265-275.
- Lyons, C.R., Orloff, G.J. and Cunningham, J.M. (1992) Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from murine macrophage cell line. *J. Biol. Chem.* 267:6370-6374
- MacDermott, A.B., Mayer, M.L., Westbrook, G.L., Smith, S.J and Barker, J.L. (1986) NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurons. *Nature.* 321:519-522
- Malgaroli, A. (1994) LTP expression: hanging like a yo-yo? *Cell Biol.* 5:231-241.
- Malva, J.O., Ambrósio, A.F., Cunha, R.A., Ribeiro, J.A., Carvalho, A.P. and Carvalho, C.M. (1995) A functionally active pre-synaptic high-affinity kainate receptor in the rat hippocampal CA3 subregion. *Neurosci. Lett.* 185: 83-86.
- Manzoni, O., Prezeau, L., Desagher, L., Sahuquet, A., Sladaczek, F., Bockaert, J. and Fagni, L. (1992a) Sodium nitroprusside blocks NMDA receptors via formation of ferrocyanide ions. *Neuroreport.* 3:77-80.
- Manzoni, O., Prezeau, L., Marin, P., Deshager, L., F., Bockaert, J. and Fagni, L. (1992b) Nitric oxide-induced blockade of NMDA receptors. *Neuron* 8:653-662.
- Marsden, P.A., Schappert, K.T., Chen, H.S (1992) Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Lett.* 307:287-293.

- Martin, H. and MacIwain, H. (1959) Glutathione, oxidized and reduced in the brain and isolated cerebral tissue. *Biochem. J.* 71: 275-280.
- Matthews, K.S., Chakerian, A.E. and Gardner, J.A. (1991) Protein chemical modification as probe for structure-function relationships. *Methods Enzymol.* 208: 468-496.
- Max, B. (1989) This and that: the war on drugs and the evolution of sulfur. *Trends. Pharmacol. Sci.* 10: 483-486.
- Mayer, M.L. and Westbrook, G.L. (1987) Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse central neurones. *J.Physiol.* 394:501-528.
- Meguro, H., Mori, H., Araki, H., Kushiya, E., Kutsuwada, T., Yamazaki, M., Kumanishi, T., Arakawa, M., Sakimura, K. and Mishina, M. (1992) Functional characterization of a heteromeric NMDA receptor channel expressed from cloned cDNAs. *Nature* 357:70-74.
- Meister, A. (1988) Glutathione metabolism and its selective modification. *J. Biol. Chem.* 263: 17205-17208.
- Meister, A. and Anderson, M.E. (1983) Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.* 52: 711-725.
- Meldrum, B. and Garthwaite, J. (1990) Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 11:379-387.
- Miki, N., Kawabe, Y. and Kuriyama K. (1977) Activation of cerebral guanylate cyclase by nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 75:851-856.
- Miller, B., Sarantis, M., Traynelis, S.F. and Attwell, D. (1992) Potentiation of NMDA receptor currents by arachidonic acid. *Nature* 355:722-725.
- Mineff, E. and Valtschanoff, J. (1999) Metabotropic glutamate receptors 2 and 3 expressed by astrocytes in rat ventrobasal thalamus. *Neurosci. Lett.* 270(2): 95-98.
- Mitrovic, A.D. and Johnston, G.A. (1994) Regional differences in the inhibition of L-glutamate and L-aspartate sodium-dependent high affinity uptake systems in rat CNS synaptosomes by L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylic, threo-3-hydroxy-D-aspartate and D-aspartate. *Neurochem. Int.* 24: 583-588.
- Miyamoto, M., Murphy, T.H., Schnaar, R.L. and Coyle (1989) Antioxidants protect against glutamate-induced cytotoxicity in a neuronal cell line. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 250:1132-1140.
- Monaghan, D.T. (1989) The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 29:365-402.
- Monaghan, D.T. and Beaton, J.A. (1991) Quinolinate differentiates between forebrain and cerebellar NMDA receptors. *Eur. J. Pharmac.* 194: 123-125.

Monaghan, D.T., Bridges, R.J. and Cotman, C.W. (1989) The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 29:365-402.

Monaghan, D.T., Olverman, H.J., Nguyen, L., Watkins, J.C. and Cotman, C.W. (1988) Two classes of N-methyl-D-aspartate recognition sites: differential distribution and differential regulation by glycine. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85:9836-9840.

Monaghan, D.T. and Wenthold, R.J. (1997) *The Ionotropic Glutamate Receptors*. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey.

Monahan, J.B., Biesterfeldt, J.P., Hood, W.F., Compton, R.P., Cordi, A.A., Vazquez, M.I., Lanthorn, T.H. and Wood, P.L. (1990) Differential modulation of the associated glycine recognition site by competitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. *Mol. Pharmacol.* 37:780-784.

Monyer, H., Sprengel, R., Schoepfer, R., Herb, A., Higuchi, M., Lomeli, H., Burnashev, N., Sakmann, B. and Seeburg, P.H. (1992) Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* 256:1217-1221.

Moriyoshi, K., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R., Mizuno, N. and Nakanishi, S. (1991) Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature* 354:31-37.

Mulkey, R.M. and Malenka, R.C. (1992) Mechanisms underlying induction of homosynaptic long-term depression in area CA1 of the hippocampus. *Neuron* 9: 967-975.

Murad, F., Mittal, C.K., Arnold, W.P., Katsuki, S. and Kimura, H. (1977) Guanylate cyclase activation by azide, nitro compounds, nitric oxide and hydroxyl radical and inhibition by hemoglobin and myoglobin. *Adv. Cyclic Nucl. Res.* 9:145-158

Nakanishi, S. (1992) Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 258:597-603.

Nicoletti, F., Bruno, V., Copani, A., Casabono, G. and Knöpfel, T. (1996) Metabotropic glutamate receptors: a new target for the therapy of neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci.* 19:267-271.

Nicoll, R.A., Malenka, R.C. and Kauer, J.A. (1990) Functional comparison of neurotransmitter receptor subtypes in the mammalian central nervous system. *Physiol. Rev.* 70:513-565.

Nowak, L., Bregetovski, P., Ascher, P., Herbert, A. and Prochiantz, A. (1984) Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307:462-465.

Nowicki, J.P., Duval D., Poignet, H. and Scatton, B. (1991) Nitric oxide mediates neuronal death after focal cerebral ischemia in the mouse. *Eur. J. Pharmacol.* 204:339-340.

O'Hara, P.J., Sheppard, P.O., Thogersen, H., Venezia, D., Haldeman, B.A., McGrane, V., Houamed, K.M., Thomsen, C, Gilbert, T.L. and Mulvihill, E.R. (1993) The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins. *Neuron* 11:41-52.

- Ogita, K. and Yoneda (1986) Characterization of Na⁺-dependent binding sites of [³H]glutamate in synaptic membranes from rat brain. *Brain Res.* 397:137-144.
- Ogita, K. and Yoneda, Y. (1987) Possible presence of [³H]glutathione (GSH) binding sites in synaptic membranes from rat brain. *Neurosci. Res.* 4:486-496.
- Ogita, K. and Yoneda, Y. (1988) Temperature-dependent and -independent apparent binding activities of [³H]glutathione in brain synaptic membranes. *Brain Res.* 463:37-46.
- Ogita, K. and Yoneda, Y. (1989) Selective potentiation by L-cysteine of apparent binding activity of [³H]glutathione in synaptic membranes of rat brain. *Biochem. Pharm.* 38:1499-1505.
- Ogita, K., Enomoto, R., Nakahara, F., Ishitsubo, N. and Yoneda, Y. (1995) A possible role of glutathione as an endogenous agonist at the N-methyl-D-aspartate recognition domain in rat brain. *J. Neurochem.* 64:1088-1096.
- Ogita, K., Kitago, T., Nakamura, H., Fukuda, Y., Koida, M., Ogawa, Y. and Yoneda, Y. (1986) Glutathione-induced inhibition of Na⁺-independent and -dependent bindings of L-[³H]glutamate in rat brain. *Life Sci.* 39:2411-2418.
- Ogita, K., Ogawa, Y. and Yoneda, Y. (1988) Apparent binding activities of [³H]glutathione in rat central and peripheral tissues. *Neurochem. Int.* 13: 493-497.
- Ogita, K., Shuto, M., Maeda, H., Minami, T. and Yoneda, Y. (1998) Possible modulation by glutathione of glutamatergic neurotransmission. In *Glutathione in the Nervous System* (ed. Shaw, C.A.), pp. 137-161. Taylor & Francis, Washington, DC.
- Oja, S.S., Janáky, R., Saransaari, P., Jenei, Zs. and Varga, V. (1995) Interaction of glutathione derivatives with brain 2-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate (AMPA) receptors. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 38:9-11.
- Oja, S.S., Varga, V., Janáky, R., Kontro, P., Aarnio, T. and Marnela, K.-M. (1988) Glutathione and glutamatergic neurotransmission in the brain. In *Frontiers in Excitatory Amino Acid Research* (eds. Cavalheiro, E.A., Lehmann, J. and Turski, L.), pp. 75-78. Alan R. Liss, New York.
- Olney, J.W. (1993) Role of excitotoxins in developmental neuropathology. *APMIS Suppl.* 40 101: 103-112.
- Olney, J.W., Ho, O.L. and Rhee, V. (1971) Cytotoxic effects of acidic and sulphur-containing amino acids on the infant mouse central nervous system. *Exp. Brain Res.* 14:61-76.
- Olney, J.W., Ho, O.L., Rhee, V. and Schainker, B. (1972) Cysteine-induced brain damage in infant and fetal rodents. *Brain Res.* 45:309-313.
- Olney, J.W., Misra, C.H. and deGubareff, T. (1975) Cysteine-S-sulfate: Brain damaging metabolite in sulfite oxidase deficiency. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 34:167-176.

- Olney, J.W., Zorumski, C., Price, M.T. and Labruyere, J. (1990c) L-cysteine, a bicarbonate-sensitive endogenous excitotoxin. *Science* 248:596-599.
- Olney, J.W., Zorumski, C., Price, M.T. and Labruyere, J. (1990) L-Cysteine, a bicarbonate-sensitive endogenous excitotoxin. *Science* 248: 596-599.
- Orlowsky, M. and Karkowsky, A. (1976) Glutathione metabolism and some possible functions of glutathione in the nervous system. *Int. Rev. Neurobiol.* 19:75-121.
- Ott, R.J., Chan, J.K., Ramanathan, V.K., Hui, A.C. and Giacomini, K.M. (1994) Effect of phenylisothiocyanate on organic cation transport in opossum kidney cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 269: 204-208.
- Paas, Y. (1998) The macro- and microarchitectures of the ligand-binding domain of glutamate receptors. *Trends Neurosci.* 21: 117-125.
- Padgett, C.M. and Whorton, A.R. (1998) Cellular responses to nitric oxide: role of protein S-thiolation/dethiolation. *Arch. Biochem. & Biophys.* 358:232-42.
- Paoletti, P., Ascher, P. and Neyton, J. (1997) High-affinity zinc inhibition of NMDA NR1-NR2A receptors. *J. Neurosci.* 17: 5711-5725.
- Partin, K.M., Patneau, D.K., Winters, C.A., Mayer, M.L. and Buonanno, A. (1993) Selective modulation of desensitization at AMPA vs kainate receptors by cyclothiazide and concanavalin A. *Neuron* 11(6): 1069-1082.
- Pasqualatto, B.A., Curry K. and Shaw C.A. (1998) Excitatory actions of GSH on neocortex, in *Glutathione in the Nervous system* (Shaw C.A., ed) pp. 197-216. Taylor&Francis, Washington, D.C.
- Pasqui, A.L., Capecechi, P.L., Ceccatelli, L., Mazza, S., Gistri, A., Laghi, P.F. and Di, P.T. (1991) Nitroprusside in vitro inhibits platelet aggregation and intracellular calcium translocation. Effect of haemoglobin. *Thrombosis Res.* 61:113-122.
- Paternain, A.V., Morales, M. and Lerma, J. (1995) Selective antagonism of AMPA receptors unmasks kainate receptor-mediated responses in hippocampal neurons. *Neuron* 14: 185-189.
- Patneau, D.K. and Mayer, M.L. (1990) Structure-activity relationships for amino acid transmitter candidates acting at N-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors. *J. Neurosci.* 10:2385-2399.
- Patneau, D.K. and Mayer, M.L. (1991) Kinetic analysis of interactions between kainate and AMPA: evidence for activation of a single receptor in mouse hippocampal neurons. *Neuron* 6: 785-798.
- Perry, T.L., Norman, M.G., Young, V.W., Whiting, S., Crichton, J.U., Hansen, S. and Kish, S.J. (1985) Hallervorden-Spatz disease: cysteine accumulation and cysteine dioxygenase deficiency in the globus pallidus. *Am. Neurol.* 18:482-489.

- Peters, S., Koh, J. and Choi, D.W. (1987) Zinc selectively blocks the action of N-methyl-D-aspartate on cortical neurons. *Science* 236:589-593.
- Petralia, R.S. and Wenthold, R. (1992) Light and electron immunocytochemical localization of AMPA-selective glutamate receptors in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 318:329-354.
- Petralia, R.S., Wang, Y.-X. and Wenthold, R.J. (1994) Histological and ultrastructural localization of the kainate receptor subunits, KA2 and GluR6/7, in the rat nervous system using selective antipeptide antibodies. *J. Comp. Neurol.* 349: 85-110.
- Philbert, M.A., Beiswanger, C.M., Waters, D.K, Reuhl, K.R. and Lowndes, H.E. (1991) Cellular and regional distribution of reduced glutathione in the nervous system of the rat: histochemical localization by mercury orange and o-phthalaldehyde-induced histofluorescence. *Toxicol. Appl. Pharm.* 107:215-227.
- Pin, J.P, Bockaert J. and Recasens M. (1984) The Cl-Ca²⁺-dependent L-[³H]glutamate binding: a new receptor or a particular transport process? *FEBBS Lett.* 175:31-36
- Pin, J.-P. and Duvoisin, R. (1995) The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* 34:1-26.
- Pittaluga, A. and Raiteri, M. (1992) N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) and non-NMDA receptors regulating hippocampal norepinephrin release. Location on axon terminals and pharmacological characterization. *J. Pharm. & Exp. Ther.* 260:232-237
- Plaitakis, A., Smith, J., Mandel, J. and Yahr, M.D. (1988) Pilot trial of branched-chain amino acids in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* i:1015-1018.
- Pollock, J.S., Förstermann, U., Mitchell, J.A., Warner T.D., Schmidt, H.H, Nakane, M. and Murad, F. (1991) Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:10480-10484
- Porcella, A., Fage, D., Voltz, C., Buordiol, F., Benavides, J., Scatton, B. and Carter, C. (1992) Implication of the polyamines in the neurotoxic effects of N-methyl-D-aspartate. *Neurol. Res.* 14:181-183.
- Porter, R.H.P. and Roberts, P.J. (1993) Glutamate metabotropic receptor activation in neonatal rat cerebral cortex by sulphur-containing excitatory amino acids. *Neurosci. Lett.* 154:78-80.
- Prado de Carvalho, L., Bochet, P. and Rossier, J. (1996) The endogenous agonist quinolinic acid and the non-endogenous homoquinolinic acid discriminate between NMDAR2 receptor subunits. *Neurochem. Int.* 28: 445-452.
- Prinz, W.A., Aslund, F., Holmgren, A. and Beckwith, J. (1997) The role of thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the Escheria coli cytoplasm. *J. Biol. Chem.* 272: 15661-15667.

- Puchalski, R.B., Louis, J.-C., Brose, M., Traynelis, S.F., Egebjerg, J., Kukekov, V., Wenthold, R.J., Rogers, S.W., Lin, F., Moran, T., Morison, J.H. and Heinemann, S.F. (1994) Selective RNA editing and subunit assembly of native glutamate receptors. *Neuron* 13: 131-147.
- Puka-Sundvall, M., Eriksson, P., Nilsson, M., Sandberg, M. and Lehmann, A. (1995) Neurotoxicity of cysteine: interaction with glutamate. *Brain Res.* 705:65-70.
- Ransom, R.W. and Stec, N.L. (1988) Cooperative modulation of [³H]MK-801 binding to the N-methyl-D-aspartate receptor-ion channel complex by L-glutamate, glycine and polyamines. *J. Neurochem.* 51:830-836.
- Raps, S.P., Lai, J.C., Hertz, L. and Cooper, A.J. (1989) Glutathione is present in high concentrations in cultured astrocytes but not in cultured neurones. *Brain Res.* 493:398-401.
- Rashatwar, S.S., Cornwell, T.L. and Lincoln, T.M. (1987) Effects of 8-bromo-cGMP on Ca²⁺ levels in vascular smooth muscle cells. Possible regulation of Ca²⁺-ATP-ase by cGMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:5685-5689.
- Récasens, M., Mayat, E. and Vignes, M. (1992) The multiple excitatory receptorsubtypes and their putative interactions. *Mol. Neuropharmacol.* 2:15-31.
- Rehncrona, S. and Siesjö, B.K. (1979) Cortical and cerebrospinal fluid concentrations of reduced and oxidized glutathione during and after cerebral ischemia. *Adv. Neurol.* 26:285-286.
- Reichelt, K.L. and Fonnum F. (1969) Subcellular localization of N-acetyl-D-aspartyl-glutamate, N-acetyl-glutamate and glutathione in the brain. *J. Neurochem.* 16:1409-1416.
- Represa, A., Tremblay, A. and Ben-Ari, Y. (1987) Kainate binding sites in the hippocampal mossy fibers: localization and plasticity. *Neuroscience* 20: 739-748.
- Reynolds, I.J., Murphy, S.N. and Miller, R.J. (1987) ³H- Labelled MK-801 binding to the excitatory amino acid receptor complex from rat brain is enhanced by glycine. *Proc. Natl. Sci. USA.* 84:7744-7748.
- Riedel, G. (1996) Function of metabotropic glutamate receptors in learning and memory. *Trends Neurosci.* 19:216-224.
- Roche, K.W., O'Brien, R.J., Mammen, A.L., Bernhardt, J. and Huganir, R.L. (1996) Characterization of multiple phosphorylation sites on the AMPA receptor GluR1 subunit. *Neuron* 16:1179-1188.
- Roche, K.W., Tingley, W.G. and Huganir, R.L. (1994) Glutamate receptor phosphorylation and synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol.* 4:383-388.
- Sagara, J, Miura, K. and Bunnai, S. (1993) Maintenance of neuronal glutathione by glial cells. *J. Neurochem.* 61: 1672-1676.
- Sagara, J., Makino, N. and Bannai, S. (1996) Glutathione efflux from cultured astrocytes. *Neurochem.* 66:1876-81.

Sakimura, K., Morita, T., Kushya, E. and Mishina, M. (1992) Primary structure and expression of the gamma2 subunit of the glutamate receptor channel selective for kainate. *Neuron* 8:267-274.

Sakurai, S.Y., Penney, J.B. and Young, A.B. (1993) Regionally distinct N-methyl-D-aspartate receptors distinguished by quantitative autoradiography of [³H]MK-801 in rat brain. *J. Neurochem.* 60: 1344-1353.

Schuman, E.M. and Madison, V.M. (1994) Nitric oxide and synaptic function. *Annu. Rev. Neurosci.* 17:153-183

Schurr, A., West, C.A., Heine, M.F. and Rigor, B. M. (1993) The neurotoxicity of sulphur-containing amino acids in energy-deprived rat hippocampal slices. *Brain Res.* 601:317-320.

Seeburg, P.H. (1993) The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Neurosci.* 16:359-365.

Sessa, W. C. Harrison, J.K., Barber, C.M. Zeng, D., Durieux, M.E., D'Angelo, D.D., Lynch, K.R. and Peach, M.J. (1992) Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 267:15274-6.

Sharpe, L.G., Olney, J.W., Ohlendorf, C., Lyss, A., Zimmerman, M. and Gale, B. (1975) Brain damage and associated behavioral deficits following the administration of L-cysteine to infant rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 3:291-298.

Shaw, C.A. (1998) Multiple roles of glutathione in the nervous system, in *Glutathione in the Nervous System* (Shaw C.A., ed), pp. 3-23. Taylor & Francis, Washington, D.C.

Shaw, C.A., Pasqualotto, B.A. and Curry, K. (1996) Glutathione-induced sodium currents in neocortex. *NeuroReport* 7: 1149-1152.

Sheardown, M.J., Nielsen, E.O., Hansen, A.J., Jacobsen, P. and Honoré, T. (1990) 2,3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoylbenzo(f)-quinoxaline: a neuroprotectant for cerebral ischemia. *Science* 247: 571-574.

Shigemoto, R., Ohishi, H., Nakanishi, N. and Mizuno, N. (1992) Expression of the messenger RNA for the rat NMDA receptor (NMDAR1) in the sensory and autonomic ganglion neurons. *Neurosci. Lett.* 144:229-232.

Slivka, A. and Cohen, G. (1993) Brain ischemia markedly elevates levels of the neurotoxic amino acid, cysteine. *Brain Res.* 608:33-37.

Slivka, A. Spina, M.B. and Cohen, G. (1987b) Reduced and oxidized glutathione in human and monkey brain. *Neurosci. Lett.* 74:112-118

Slivka, A., Chuttani, R., Carr-Locke, D.L., Kobzik, L., Bredt, D.S., Loscalzo, J. and Stamler, J.S. (1994) Inhibition of sphincter of Oddi function by nitric oxide carrier S-nitroso-N-acetylcysteine in rabbits and humans. *J. Clin. Invest.* 94: 1792-1798.

Slivka, A., Mytilineou, C. and Cohen, G. (1987a) Histochemical evaluation of glutathione in brain. *Brain. Res.* 409:275-284

- Sommer, B., Burnashev, N., Verdoorn, T.A., Keinänen, K., Sakmann, B. and Seeburg, P.H. (1992) A glutamate receptor channel with high affinity for domoate and kainate. *EMBO J.* 11: 1651-1656.
- Sommer, B. and Seeburg, P.H. (1992) Glutamate receptor channels: novel properties and new clones. *Trends Pharmacol. Sci.* 13:291-296.
- Sommer, B., Keinänen, K., Verdoorn, T.A., Wisden, W., Burnashev, N., Herb, A., Köhler, M., Takagi, T., Sakmann, B. and Seeburg, P.H. (1990) Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. *Science*, 249:1580-1585.
- Sommer, B., Köhler, M., Sprengel, R. and Seeburg, P.H. (1991) RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channel. *Cell* 67:11-19.
- Stamler, J.S. (1994) Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* 78: 931-934.
- Stamler, J.S., Singer, D.J. and Loscalzo, J. (1992) Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 258:1898-1902.
- Stäubli, U., Rogers, G. and Lynch, G. (1994) Facilitation of glutamate receptors enhances memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 777-781.
- Stein, E., Cox, J.A., Seeburg, P.H. and Verdoorn, T.A. (1992) Complex pharmacological properties of recombinant α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate receptor subtypes. *Mol. Pharmacol.* 42: 864-871.
- Stern, P., Behe, P., Schoepfer, R. and Colquhoun, D. (1992) Single-channel conductances of NMDA receptors expressed from cloned cDNA's: comparison with native receptors. *Proc. R. Soc. Lond. (Biol.)* 250: 272-277.
- Stern, P., Miroslav, C., Colquhoun, D. and Stephenson, F.A. (1994) Single-channel properties of cloned NMDA receptors in a human cell line: comparison with results from *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* 476.3: 391-397.
- Stevens, C.F. and Wang, Y. (1993) Reversal of long-term potentiation by inhibitors of haem oxygenase. *Nature* 364:147-149.
- Stone, T.W. (1993) Subtypes of NMDA receptors. *Gen. Pharmacol.* 24:825-832.
- Stoyanovsky, D., Murphy, T., Anno, P.R., Kim, Y. M. and Salama, G. (1997) Nitric oxide activates skeletal and cardiac ryanodine receptors. *Cell Calcium* 21:19-29.
- Subramanian, S and McGonigle, P. (1991) Quantitative autoradiographic characterization of the binding (+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,1-imine ($[^3\text{H}]$ -MK 801) in rat brain: regional effects of polyamines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 256: 814-819.
- Sucher, N.J. and Lipton, S.A. (1991) Redox modulatory site of the NMDA receptor-channel complex: regulation by oxidized glutathione. *J. Neurosci. Res.* 30:582-591.

- Sucher, N.J., Aizenmann, E. and Lipton, S.A. (1991) N-methyl-D-aspartate antagonists prevent kainate neurotoxicity in rat retinal ganglion cells in vitro. *J. Neurosci.* 11:966-971.
- Sucher, N.J., Wong, L.A. and Lipton, S.A. (1990) Redox modulation of NMDA receptor-mediated Ca^{2+} flux in mammalian central neurons. *Neuroreport* 1:29-32.
- Sugihara, H., Moriyoshi, K., Ishii, T., Masu, M. and Nakanishi, S. (1992) Structure and properties of 7 isoforms of the NMDA receptor generated by alternative splicing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185: 826-832.
- Sullivan, J.M., Traynelis, S.F., Chen, H.S., Escobar, W., Heinemann, S.F. and Lipton, S.A. (1994) Identification of two cysteine residues that are required for redox modulation of the NMDA subtype of glutamate receptor. *Neuron* 13: 929-936.
- Sutcliffe, M.J., Wo, Z.G. and Oswald, R.E. (1996) Three-dimensional models of non-NMDA glutamate receptors. *Biophys. J.* 70: 1575-1589.
- Takahashi, K. (1968) The reaction of phenylglyoxal with arginine residues in proteins. *J. Biol. Chem.* 243: 6171-6179.
- Tang, L.-H. and Aizenman, E. (1993) Long lasting modification of the N-methyl-D-aspartate receptor channel by a voltage-dependent sulfhydryl redox process. *Mol. Pharmacol.* 44:473-478.
- Tang, L.-H. and Aizenman, E. (1993) The modulation of N-methyl-D-aspartate receptors by redox and alkylating reagents in rat cortical neurones in vitro. *J. Physiol. (Lond.)* 465:303-323.
- Tarnawa, I., Farkas, S., Bersényi, P., Pataki, A. and András, F. (1990) Electrophysiological studies with a 2,3-benzodiazepine muscle relaxant: GYKI 52466. *Eur. J. Pharmacol.* 167: 193-199.
- Terramani, T., Kessler, M., Lynch, G. and Baudry, M. (1988) Effects of thiol-reagents on [^3H] α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid binding to rat telencephalic membranes. *Mol. Pharmacol.* 34:117-123.
- Tingley, W.G., Roche, K.W., Thompson, A.K. and Huganir, L.R. (1993) Regulation of NMDA receptor phosphorylation by alternative splicing of the C-terminal domain. *Nature* 364:70-73.
- Tokita, Y., Bessho, Y., Masu, M., Nakamura, K., Nakao, K., Katsuki, M. and Nakanishi, S. (1996) Characterization of excitatory amino acid neurotoxicity in N-methyl-D-aspartate receptor-deficient mouse cortical neuronal cells. *Eur. H. Neurosci.* 8:69-78.
- Tsien, R.Y., Pozzan, T. and Rink, T.J. (1982) Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator. *J. Cell Biol.* 94:325-34.
- Tygesen, C.K., Jorgensen, M., Andersen, P.H. (1995) The importance of two specific domains in ligand binding to the AMPA/kainate glutamate receptors GluR2 and GluR6. *FEBS Lett.* 363:184-188.

- Uchino, S., Sakimura, K., Nagahari, K. and Mishina, M. (1992) Mutations in a putative agonist binding region of the AMPA-selective glutamate receptor channel. *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.* 308: 253-257.
- Varga, V., Janáky, R., Marnela, K.-M., Gulyás, J., Kontro, P. and Oja, S.S. (1989) Displacement of excitatory amino acid receptor ligands by acidic oligopeptides. *Neurochem. Res.* 14: 1223-1227.
- Varga, V., Janáky, R., Saransaari, P. and Oja, S.S. (1994) Endogenous γ -L-glutamyl and β -L-aspartyl peptides and excitatory amino acidergic neurotransmission in the brain. *Neuropeptides* 27: 19-26.
- Varga, V., Jenei, Zs., Janáky, R., Saransaari, P. and Oja, S.S. (1997) Glutathione is an endogenous ligand of rat brain N-methyl-D-aspartate (NMDA) and 2-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate (AMPA) receptors. *Neurochem. Res.* 22: 1165-1171.
- Vincent, S.R. and McGeer E.G. (1980) A comparison of sodium-dependent glutamate binding with high affinity uptake in rat striatum. *Brain Res.* 184:99-108.
- Vorobjev, V.S., Sharonova, I.N., Walsh, I.B. and Haas, H.L. (1993) Histamine potentiates N-methyl-D-aspartate responses in acutely isolated hippocampal neurons. *Neuron* 11:833-844.
- Wafford, K.A., Kathorina, M., Bain, C.J., Marshall, G., Le Bourdelles, J., Kemp, J.A. and Whitting, P.J. (1994) Identification of amino acids in the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit that contribute to the glycine binding site. *Mol. Pharmac.* 47: 374-380.
- Wallin, C., Weber, S.G. and Sandberg, M. (1999) Glutathione efflux induced by NMDA and kainate : implications in neurotoxicity *J.of Neurochem.*73:1566-1572.
- Wang, J.-H. and Feng, D.-P. (1992) Postsynaptic protein kinase C essential to induction and maintenance of long-term potentiation in the hippocampal CA1 region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2576-2580.
- Wang, J.K.T., Andrews, H. and Thukral, V. (1992) Presynaptic glutamate receptors regulate noradrenaline release from isolated nerve terminals. *J. Neurochem.* 58:204-211.
- Wang, L-Y, Taverna, F.A., Huang, X-P., MacDonald, J.F. and Hampson, D.R. (1993) Phosphorylation and modulation of a kainate receptor (GluR6) by cAMP-dependent protein kinase. *Science* 259:1173-1175.
- Watkins, J.C., Krogsgaard-Larsen, P. and Honoré, T. (1990) Structure-activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists. *Trends Pharmacol. Sci.* 11:25-33.
- Wenthold, R.J., Trumpy, V.A., Zhu, W.S. and Petralia, R.S. (1994) Biochemical and assembly properties of GluR6 and KA2, two members of the kainate receptor family, determined with subunit specific antibodies. *J. Biol. Chem.* 269: 1332-1339.
- Werman, R., Carlen, P.L. and Kosower E.M. (1971) Effect of the thiol-oxidizing agent, diamide, on acetylcholine release at the frog endplate. *Nat. New Biol.* 233:120-121.

- Werner, P. Voigt. M. Keinänen, K., Wisden, W. and Seeburg, P.H. (1991) Cloning of a putative high-affinity kainate receptor expressed predominantly in hippocampal CA3 cells. *Nature* 351:742-744.
- Werns, S.W. and Lucchesi, B.R. (1990) Free radicals and ischemic tissue injury. *Trends Pharmacol. Sci.* 11: 161-166.
- Williams, K., Romano, C. and Molinoff, P.B., (1989) Effects of polyamines on the binding of [³H]MK-801 to the N-methyl-D-aspartate receptor: pharmacological evidence for the existence of a polyamine recognition site. *Mol. Pharmacol.* 36:575-581.
- Williams, M.B., Li, X., Gu, X. and Jope, R.S (1992) Modulation of endogenous ADP-ribosylation in rat brain. *Brain. Res.* 592:49-56.
- Wo, Z.G., Bian, Z.C. and Oswald, R.E. (1995) Asn-265 of frog kainate binding protein is a functional glycosylation site: implications for the transmembrane topology of glutamate receptors. *FEBS Lett.* 368:230-234.
- Wolin, M.S., Wood, K.S. and Ignarro L.J. (1982) Guanylate cyclase from bovine lung. A kinetic analysis of the regulation of unpurified soluble enzyme by protoporphyrin IX, heme, and nitrosyl-heme. *J. Biol. Chem.* 257:11312-11320.
- Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R.J. and Greenberg, N.E. (1995) Opposing effects of ERK and JNK-P38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270: 1326-1331.
- Yamazaki, M., Akari, K., Shibata, A. and Mishina, M. (1992) Molecular cloning of a cDNA encoding a novel member of the mouse glutamate receptor channel family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 183: 886-892.
- Yamazaki, M., Mori, H., Araki, K., Mori, K. and Mishina, M. (1992b) Cloning, functional expression, and modulation of a mouse NMDA receptor subunit. *FEBS Lett.* 300:39-45.
- Ye, Z. and Westlund, K.N. (1996) Ultrastructural localization of glutamate receptor subunits (NMDAR1, AMPA GluR1 and GluR2/3) and spinothalamic tract cells. *Neuroreport* 7:2581-2585.
- Yoneda, Y., Enomoto, R. and Ogita, K. (1994) Supporting evidence for negative modulation by protons of an ion channel associated with the N-methyl-D-aspartate receptor complex in rat brain using ligand binding techniques. *Brain Res.* 636:298-307.
- Yoneda, Y., Ogita, K., Kouda, T. and Ogawa, Y. (1990) Radioligand labelling of N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptors by [³H](±)-3-(2-carboxypiperazin-4-yl)propyl-1-phosphonic acid in brain synaptic membranes treated with Triton X-100. *Biochem. Pharmacol.* 39:225-228.
- Yudkoff, M., Pleasure, D., Cregar, L., Zin, Z.-P., Nissim, I., Stern, J. and Nissim I. (1990) Glutathione turnover in cultured astrocytes: studies with [¹⁵N]glutamate. *J. Neurochem.* 55:137-145.

Zängerle, L., Cuénod, M., Winterhalter, K.H. and Do, K.Q. (1992) Screening of thiol compounds: depolarization-induced release of glutathione and cysteine from rat brain slices. *J. Neurochem.* 59:181-189.

Zhuo, M., Small, S.A., Kandel, E.R. and Hawkins, R.D. (1993) Nitric oxide and carbon monoxide produce activity-dependent long-term synaptic enhancement in hippocampus. *Science*, 260:1946-1950.

Zukin, R. S. and Bennet, V.L. (1995) Alternatively spliced isoforms of the NMDAR1 receptor subunit. *Trends Neurosci.* 18:306-313.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Munkám a Debreceni Egyetem Állatanatómiai és Élettani Tanszéke, valamint a Tampere Brain Research Center, Tamperei Egyetem közötti tudományos együttműködés keretében készült. Munkám során számos olyan emberrel volt szerencsém együtt dolgozni, akik mindvégig bíztattak és segítettek.

Mindenekelőtt köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek Dr. Varga Vincének, aki bevezetett a neurobiológia rejtelmeibe. Szakmai tudására és segítő gyakorlati tanácsaira mindvégig támaszkodhattam.

Nagyon köszönöm Dr. Simo Ojának, hogy az idegenben töltött időszakban biztosította számomra a munkához szükséges feltételeket és segített eligazodni Finnországban.

Hálásan köszönöm munkatársam, Dr. Janáky Réka értékes szakmai és baráti segítségét. A munkámban felmerülő problémák megoldásában mindig segítségemre volt. Köszönöm Dr. Jenei Zsolt hasznos útmutatásait.

Köszönet illeti kollégámat, Dohovics Róbertet, akivel többször átvészeltük a finn telet.

Köszönöm debreceni munkatársaimnak, hogy mindvégig bíztattak és távollétem alatt helyettesítettek.

Köszönet Mrs. Oili Pääkkönennek a kísérletekben nyújtott nagyon hasznos tanácsaiért.

Örök hála feleségemnek Beatrixnak, aki az évek során barátom és szerelmem volt. Kitartása, türelme és végtelen odaadása mindig erőt adott. Nélküle ez a munka nem született volna meg.

Debrecen, 2001. december 1.

Hermann András