

Magyar Tudomány

A Magyar Tudományos Akadémia folyóirata. Alapítva: 1840

KEZDŐLAP ARCHÍVUM IMPRESSZUM KERESÉS

» A CB1 KANNABINOID RECEPTOR SEJTTÍPUS-SPECIFIKUS ELOSZLÁSÁNAK VIZSGÁLATA VIVIDSTORM SEGÍTSÉGÉVEL

X

Barna László

PMSc, tudományos segédmunkatárs, Molekuláris Neurobiológia Lendület Kutatócsoport, MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet • barna.laszlo(kukac)koki.mta.hu

Dudok Barna

MSc, PhD-hallgató, Molekuláris Neurobiológia Lendület Kutatócsoport, MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet • Semmelweis Egyetem Doktori Iskola

Miczán Vivien

MSc, PhD-hallgató, Molekuláris Neurobiológia Lendület Kutatócsoport, MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet

Horváth András

PhD, tudományos munkatárs, Pázmány Péter Katolikus Egyetem Információs Technológiai és Bionikai Kar

Katona István

az MTA doktora, tudományos tanácsadó, Molekuláris Neurobiológia Lendület Kutatócsoport, MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet

Az agykutatás egyik alapvető kérdése, hogy az egyes szinapszisokban előforduló jelátvivő fehérjék elhelyezkedése, sűrűsége hogyan befolyásolja a szinaptikus kapcsolatok kvalitatív és kvantitatív tulajdonságait. A szinaptikus működés hátterében rejlő molekuláris folyamatok megértésének azonban jelenleg is számos módszertani korlátja van, mint például a fénymikroszkópia felbontásának korlátossága. Jelen munkában a STORM szuperfelbontású mikroszkópiát kombináltuk konfokális képalkotással és patch-clamp elektrofiziológiával, hogy egy azonosított sejtben egy célfehérje nanométeres pontossággal mért eloszlását

módon szabadul fel. Az endokannabinoid rendszer tehát egy olyan retrográd jelátviteli rendszer, amely a kémiai szinapszisok működésének féken tartását valósítja meg a negatív visszacsatolás elve alapján.

Annak ellenére, hogy az endokannabinoid rendszer az egyik legelterjedtebb szabályozója a szinaptikus jelátvitelnek, a működés pontos molekuláris mechanizmusa és a CB1-receptorok eloszlásának sejtípusonkénti szabályozása még nem ismert. A pontosabb megértés érdekében olyan módszert kell alkalmazni, melyben a sejtek fiziológiai viselkedését, anatómiáját és a CB1-receptor nanoszkopikus eloszlását együtt lehet

korrelálni tudjuk annak fiziológiai és anatómiai tulajdonságaival. Az egyedi idegsejteket az élettani elvezetés alatt biocitinnel töltöttük fel, majd konfokális mikroszkópiával vizualizáltuk az idegvégződéseket és a CB1-receptorok lokalizációját STORM-mikroszkópiával 20–30 nm laterális és 40–60 nm axiális pontossággal határoztuk meg. Végül a konfokális képek és a STORM-képek korrelált vizsgálatának megkönnyítésére kifejlesztettük a VividSTORM szabadon hozzáférhető szoftvereszközt.

A fénymikroszkópia az élettudományok, így az idegtudományok egyik legfontosabb és legszélesebb körben elterjedt vizsgálati módszere. Nagyon régen ismert, hogy a fény hullámtermészete miatt ez a módszer korlátozott felbontású képalkotást tesz csak lehetővé. Ernst Abbe 1873-ban publikált számításai szerint ez a felbontási határ kb. 200 nm XY és 500 nm Z irányban. A szinaptikus kapcsolat kutatásában például ez a korlát jelentős nehézséget okoz, hiszen a transzmitter vezikulák jellemző mérete 40 nm-es, vagy például egy pre- és egy posztzinaptikus fehérje távolsága a 30 nm-es nagyságrendbe esik. Az utóbbi tíz évben olyan fénymikroszkópos technikák jelentek meg, melyek különböző módszerekkel áttörik a diffrakciólimitált felbontási határt, így biztosítva újabb lehetőségeket az élettudományi alkalmazásokra.

A terület fontosságát jelzi, hogy 2014-ben három olyan kutató kapta meg a kémiai Nobel-díjat, akik két egymástól jelentősen eltérő szuperrezolúciós módszert fejlesztettek ki.

Jelenleg három elterjedt módszer van, amely alkalmas a diffrakciós határnál nagyobb felbontású képalkotásra, az egyedimolekula-lokalizáción alapuló STORM és PALM (Eric Betzig, Xiaowei Zhuang, Marcus Sauer); a STED (Stefan Hell) és a SIM (Mats Gustafsson).

vizsgálni. Az endokannabinoid rendszer működése a hippokampális GABAerg szinapszisokban nagyon jól demonstrálható, melyeknek két fő CB1-et tartalmazó típusa van – a dendritikus és a kosársejtek. A patch-clamp technika lehetőséget teremt egyetlen sejt elektrofiziológiai jellemzésére, és jelölőanyaggal, esetünkben biocitinnel való feltöltésre túlélő egér agyszeletében. A jelölt sejt a fixálás után láthatóvá tehető fluoreszcens jelöléssel, és a teljes sejtről felvétel készíthető konfokális mikroszkóppal az anatómiai jellemzéshez. A fixált agyszeletek újrametszése után a CB1-receptorok immunhisztokémiai módszerrel jelölhetők. Mivel a metszetekben a biocitines feltöltés miatt láthatóak azok a struktúrák, melyek a célsejthez tartoznak, a STORM szuperrezolúciós képalkotás elvégezhető specifikusan az adott sejt axonvégződésein, ahol a CB1-receptorok találhatóak.

A konfokális kép alapján tehát azonosítani tudjuk azokat a STORM-lokalizációkat, melyek az adott célsejthez tartoznak. A konfokális rétegfelvétel sorozat egy voxel-intenzitás jellegű adat, míg a STORM-kép egyszerűen csak lokalizációk sorozata koordinátahármasokkal megadva, így teljesen különböző modalitást képviselve. A két modalitás együttes kezelésére és a STORM-adaton való mérések elvégzésére egy új szoftvert írtunk, a szabadon használható Vivid-STORM-ot.

Az elektronmikroszkópiához képest nagy hátrány, hogy a STORM-ban speciális jelölés nélkül nem látható a sejtmembrán. Mivel a CB1-receptor a dendritikus és kosársejtekben nagyon nagy sűrűséggel található meg a membránban, az egy boutonhoz tartozó lokalizációkra illesztett konvex burkolóval a membrán modellezhető. A szoftver segítségével számos analízis végezhető el, például a CB1-receptorok távolsága mérhető a

Az egyedimolekula-lokalizáción alapuló szuperfelbontású mikroszkópia már a nyolcvanas évektől rendelkezésre állt, de csak akkor működött, ha a látótérben olyan sűrűségben voltak a jelölések, hogy a pontátviteli függvények nem voltak egymással átfedésben, mert így lehetőség nyílik arra, hogy az egyes pontszerűnek tekinthető fényforrások (például egy fluoreszcens kismolekula vagy kvantumpötty) képére egy görbét illesszünk (jellemzően Gauss-görbét), és ennek centroidját vegyük lokalizációnak. Az így meghatározott lokalizációk pontossága elsősorban a fényforrás által kibocsátott fotonoktól függ, és elérhető vele a néhány nanométeres felbontás is (például FIONA). A biológiai mintákban a jelölések a legtöbb esetben olyan sűrűségűek, hogy az egyes fluoreszcens jelölések képei átfednek, így nem lehet a görbeillesztést elvégezni. Ha a fluoreszcens fényforrásaink nem egyszerre világítanak, hanem csak egy kis részük, akkor lehetséges az egyedimolekula-lokalizáció, majd egy következő felvételen megint csak egy kis részük, de már más jelölések, akkor sok kép felvétele után lehetséges a szuperrezolúciós kép összeállítása. Ezt az alapelvet használja ki a PALM (Photoactivated Localization Microscopy), mely fluoreszcens fehérjéket, és a STORM (STochastic Optical Reconstruction Microscopy), mely fluoreszcens kismolekulákat használ ki-be kapcsolható fényforrásként. A képalkotás során először az összes fényforrás sötét, majd aktiváló megvilágítás hatására egy kis részük bekapcsol, és a képkészítés után kikapcsolnak. Ezen fázisok sokszori ismétlése után, ami jellemzően ezertől néhány tízezer lépést jelent, 20–30 nanométeres laterális és 50–60 nanométeres axiális felbontású kép állítható elő. Az elektronmikroszkópiához képest az a nagy előnyük a fenti módszereknek, hogy a mintaelőkészítés jóval gyorsabb, akár élő

membránon, azaz a konvex burkoló felszínén az aktív zónától, megkapható a boutonok térfogata és felszíne, a lokalizációk klaszterezettsége, felszíni sűrűségeloszlás, valamint az internalizációs index is kiszámolható.

A kannabinoid jelátviteli rendszer tulajdonságai sejttípusfüggően megváltoznak egyes patofiziológiai folyamatokban. THC-kezelés hatására például erősen csökken a retrográd kannabinoid rendszer hatásfoka a GABA-felszabadulásra, de ez nem igaz a glutamatra. Ennek molekuláris mechanizmusa nem pontosan ismert, így egereket kezeltünk THC-val egy marihuánafogyasztónak megfelelő dózisban, hat és fél napon keresztül. A 3D STORM-képalkotás drámai (74%) CB1-receptorszám-csökkenést és megnövekedett internalizációt mutatott a kosársejtek axonvégződésein. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a csökkent CB1-receptor-mennyiség felelős a THC-bevitel után tapasztalható kannabinoid hatás csökkenéséért a GABA-áramokra. A receptorok visszatérésének nyomon követésére megmértük a CB1-szintet a THC megvonása után 11,5 nappal, amikor már teljesen visszatért a klasszikus kannabinoid viselkedés. Ennyi idő elteltével is még 35%-kal kevesebb receptor volt megtalálható a kezelt egerekben a kezeletlenhez képest, azonban hat hét után már nem volt kimutatható a különbség.

Az elektrofiziológiával kombinált korrelált konfokális és 3D-STORM szuperrezolúciós mikroszkópia tehát egy gyors és hatékony módszer a sejttípus-specifikus nanoskálájú képalkotásra. A VividSTORM, python-alapú, szabadon hozzáférhető és nyílt forráskódú szoftverrel a különböző modalitások (konfokális, EPI fluoreszcens vagy elektron mikroszkópos és STORM) együtt kezelhetők, és különböző mérések végezhetőek el. A nyílt kódnak

sejteken is alkalmazható, és a többes jelölés is megoldható.

Az idegtudományok egyik nagyjelentőségű felfedezése volt, hogy egyes szinapszisokban a jól ismert anterográd irányú jelátvitel mellett megtalálható egy visszafelé működő (retrográd) információátvitel is. Ez a mechanizmus igen fontos lehet szinaptikus túlműködés esetében (pl. epilepszia, isémiás stroke vagy neuropátiás fájdalom), amikor a posztzinaptikus sejtnak egy negatív visszacsatolással csökkenteni kellene a rá érkező bemenetet.

A kannabisztartalmú kábítószeres hatásmechanizmusának vizsgálata közben kiderült, hogy az indiai kender fő pszichoaktív hatóanyaga, a $\Delta 9$ -tetrahidrokannabinol (THC), egy G-fehérje-kapcsolt receptoron, a CB1 kannabinoid receptoron keresztül fejti ki hatását, amely az idegvégződéseken található, és ott gátolja a neurotranszmitterek felszabadulását. A CB1-receptor endogén ligandja, a 2-arachidonoil-glicerol pedig a posztzinaptikus sejtekből, de a preszinaptikus idegvégződés aktivitásától függő

köszönhetően könnyen továbbfejleszhető.

Kulcsszavak: *szuper-rezolúciós mikroszkópia, egyedi molekula lokalizáció, STORM, korrelatív konfokális és STORM-mikroszkópia, endokannabinoid rendszer, CB1-receptor, marihuána, THC, elektrofiziológia*

FORRÁSOK

- Barna László – Dudok B. – Miczán V. – Horváth A. – László Z. I. – Katona I. (2016): Correlated Confocal and Super-resolution Imaging by VividSTORM. Nature Protocols. in press.
- Dudok Barna – Barna L. – Ledri M. – Szabó S. I. – Szabadits E. – Pintér B. – Woodhams, S. G. – Henstridge, C. M. – Balla Gy. – Nyilas R. – Varga C. – Lee, S. H. – Matolcsi M. – Cervenak J. – Kacs Kovics I. – Watanabe, M. – Sagheddu, C. – Melis M. – Pistis M. – Soltesz I. – Katona I. (2015) Cell-specific STORM Superresolution Imaging Reveals Nanoscale Organization of Cannabinoid Signaling. Nature Neuroscience. 18, 75–86. DOI: 10.1038/nn.3892 • [WEBCÍM](#)
-