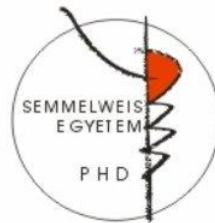


# Az endokannabinoid rendszer sejtípus-specifikus molekuláris anatómiai vizsgálata agykérgi szinapszisokban

Doktori tézisek

**Dudok Barna**

Semmelweis Egyetem  
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Katona István, DSc., tudományos tanácsadó

Hivatalos bírálók: Dr. Kisvárday Zoltán, DSc., egyetemi docens  
Dr. Puskár Zita, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Réthelyi János, Ph.D., habil. egyetemi docens

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Alpár Alán, Ph.D., habil. egyetemi docens  
Dr. Kittel Ágnes, DSc., tudományos tanácsadó

Budapest

2016

## 1. Bevezetés

Az idegsejtek közti szinaptikus kapcsolatok erősségének precíz szabályozása nélkül az idegrendszer nem lenne képes adaptív, viselkedési szempontból releváns válaszokat adni a külvilág ingereire. A szinaptikus depresszió, vagyis a szinaptikus erősség negatív szabályozásának egyik leggyakoribb módja az endokannabinoid jelátvitel. Az endokannabinoid rendszert retrográd lipid jelátvivő anyagok, nevezetesen a 2-arachidonil-glicerin (2-AG) és az anandamid, ezek szintetikus és lebontó enzimei, valamint a kannabinoid receptorok alkotják. A CB<sub>1</sub> kannabinoid receptor aktivációja a feszültségfüggő kalcium csatornák és egyéb vezikula-fúziót segítő fehérjék G-fehérje- kapcsolt gátlásán keresztül képes csökkenteni a neurotranszmitter-fel szabadulást, ezáltal a neuronhálózat aktivitásának egy fontos szabályozóeleme. Az anandamid és a 2-AG hatását hidrolitikus enzimeik, a zsírsavamid-hidroláz (FAAH), illetve a monoacil-glicerin-lipáz (MGL) által történő lebontásuk terminálja. Az endokannabinoid rendszer a központi idegrendszer számtalan területén részt vesz a szinapszisok különböző populációinak szabályozásában, így működésének zavarai is számtalan súlyos betegség kialakulásában szerepet játszanak, így például az epilepszia, a neurodegeneratív betegségek vagy a törékeny X szindróma esetében. Minden egyes patológiás elváltozásban az idegi hálózat más-más csomópontjai érintettek, így az endokannabinoid rendszer pontos szerepe is eltérő. Kutatásunk legfőbb célja ezért az endokannabinoid rendszer molekuláris összetételének feltérképezése és különbségeinek azonosítása az egyes meghatározott szinapszis populációkban.

A fiziológiás és kóros folyamatok megértéséhez szükséges az egyes idegsejt-típusok közti molekuláris különbségek ismerte. Az idegrendszer minden szervet felülmúló összetettsége miatt azonban az ilyen vizsgálatok eddig nehezen leküzdhető akadályt jelentettek az idegtudomány számára. A sztochasztikus optikai rekonstrukció mikroszkópia (STORM) egy olyan egymolekula-lokalizáció alapuló képalkotási eljárás, mely nagy, 10 nm-es nagyságrendbe eső felbontást, és több csatorna együttes vizsgálatát teszi lehetővé 3 dimenzióban. A STORM módszert mások sikerrel alkalmazták szinaptikus fehérjék eloszlásának vizsgálatára agyszövetben, azonban az eddig rendelkezésre álló módszerekkel nem volt lehetséges a molekuláris eloszlásra vonatkozó adatokat a szövet sejtés és szubcelluláris kontextusában elhelyezni. Ezért célul tűztük ki egy olyan, STORM képalkotáson alapuló módszer kidolgozását, mely sejtspecifikus nanoskálájú képalkotást tesz lehetővé.

Az új módszert egy, a hippokampális GABAerg gátló szinapszisok endokannabinoid jelátvitelét érintő paradoxon megoldásához alkalmaztuk. A hippokampusz a térbeli tájékozódásban és az emlékezetben fontos szerepet játszó agyterület. CA1 alrégiójának piramis sejtei egyaránt kapnak serkentő bemenetet a klasszikus triszinaptikus körön keresztül a Schaffer-kollaterálisoktól, valamint közvetlenül az entorhinális kéregből a perforáns pályától. A bemenetek aktivitásának az integrációjának, illetve a piramis sejtek kislüléseinek szabályozásában a helyi interneuronok számos típusa vesz részt. Ezek közül kiemelkedő jelentőségűek a CB<sub>1</sub> receptort expresszáló sejt típusok, melyek a két bemenet közti asszociatív szinaptikus plaszticitást, illetve az entorhino-hippokampális információáramlást szabályozzák. A CB<sub>1</sub> egyaránt kifejeződik periszomatikus és dendritikus gátlósejteken, de eddig ismeretlen okokból előbbi sejtek szinapszisai nagyobb érzékenységet mutatnak a kannabinoid agonistákra, és csak ezek állnak tónikus endokannabinoid reguláció alatt. Ezért szeretnénk volna megvizsgálni az endokannabinoid jelátvitel molekuláris különbségeit a két sejt típus között.

A CB<sub>1</sub> receptort eredetileg a *Cannabis sativa* pszichoaktív hatóanyaga, a  $\Delta^9$ -tetrahidrokannabinol (THC) molekuláris célpontjaként fedezték fel. A rendszeres kannabiszhasználat toleranciát vált ki, és a memória, valamint a kognitív képességek zavarához vezet. Ismert, hogy a THC tolerancia egérmodelljében károsodik a GABA felszabadulás kannabinoid regulációja, de a jelenség molekuláris háttere nem ismert. Ezért megvizsgáltuk, miként módosítja a CB<sub>1</sub> endogén vagy külső kannabinoidok általi aktiválása a receptorok nanoskálájú eloszlását a GABAerg interneuronok axonterminálisain.

## 2. Célkitűzések

Az idegtudományok egyik központi kérdése, hogy az egyes idegsejttípusok molekuláris jellemzői miként határozzák meg az idegi hálózatban betöltött szerepüket. Azonban a sejtek elektrofiziológiai, morfológiai és nanoskálájú molekuláris jellemzőinek együttes vizsgálata napjainkig rendkívül nehéz feladatnak bizonyult. A CB<sub>1</sub> kannabinoid receptor a szinaptikus erősség fontos szabályozója szerte a központi idegrendszerben, ám az endokannabinoid jelátvitel sejttípus-specifikus különbségeinek molekuláris hátteréről keveset tudunk. Jelen tanulmányban a konkrét céljaink a következők:

- 1) Sejtspecifikus molekuláris elemzésre alkalmas mikroszkópos módszer kifejlesztése.
  - A STORM szuperrezolúciós mikroszkópia kvantitatív alkalmazásának validálása.
  - A STORM módszer optimalizálása a CB<sub>1</sub> eloszlásának vizsgálatára agyszövetben.
  - Egyedileg jelölt neuronok konfokális és STORM képeinek korrelált rögzítésének és analizisének kidolgozása.
- 2) A szinaptikus endokannabinoid jelátvitel sejttípus-specifikus molekuláris különbségeinek feltárása.
  - A CB<sub>1</sub> mennyiségének és eloszlásának összehasonlítása periszomatikus és dendritikus gátlósejtek közt.
  - A preszinaptikus aktív zónák nanoskálájú szerveződésének összehasonlítása periszomatikus és dendritikus gátlósejtek közt.
- 3) A CB<sub>1</sub> receptorok agonista által kiváltott dinamikus átrendeződésének vizsgálata.
  - Az endokannabinoidok szöveti koncentrációjának akut megemelésének hatása.
  - A krónikus THC kezelés hatása.
  - A kannabinoid tolerancia dózisfüggőségének és helyreállításának molekuláris hátterének vizsgálata.

### 3. Módszerek

#### 3.1. Kísérleti állatok és sejt kultúra

Egy alomból származó  $CB_1^{+/+}$  and  $CB_1^{-/-}$  (Andreas Zimmer ajándéka) felnőtt hím C57BL/6H egereket mély altatásban transzkardiálisan perfundáltunk 2 percig 0.9% fiziológiás sóoldattal majd 20 percig 4% paraformaldehidben (PFA), 0,1 M foszfát pufferben oldva (PB, pH = 7,4). Két óra 4% PFA-ban történő posztfixálás után az agyaktól vibratómmal 50  $\mu$ m vastag szeleteket vágunk, és PB-ben alaposan kimosjuk. Az akut hippokampális szeletpreparátumokat izofluránnal altatott, 25-40 napos hím C57BL/6N egerekből készítettük. A krónikus kezeléseket 22-31 napos hím C57BL/6J egereken kezdtük, és napi két i.p. injekcióban adtuk THC-t vagy az oldószerét (1% etanol, 2% Tween 80 fiziológiás sóoldatban).

A HEK293 sejteket rutin gyakorlat szerint tartottuk, és poli-D-lizin bevonatú üvegaljú Petri-csészékben transzfektáltuk N-terminálisan EGFP-vel jelölt  $CB_1$ -et kódoló plazmid konstrukcióval, a Lipofectamine 2000 kit leírását követve. A sejteket 18 óra inkubációt követően 4% PFA-ban 15 percig fixáltuk.

#### 3.2. Patch-clamp elvezetés

A piramis sejtekből és interneuronokból 33°C-on, oxigenizált mesterséges agyincvelői folyadékban vezettünk el, 0,2% biocytint tartalmazó intracelluláris oldattal töltött üveg mikroelektrodok (3–4 M $\Omega$ ) segítségével, whole-cell konfigurációban. Az elvezetés után a szeleteket 40 órán át 4 °C-on 4% PFA-ban fixáltuk.

#### 3.3. Immunfestés

Minden szövettmintát 24 lyukú sejt kultúra edényekben, szabadon úszva festettünk. A következő primer antitesteket használtuk: bassoon (egér, 1:2000, Ab82958, Abcam),  $CB_1$  (tengerimalac, 1:1000, M. Watanabe ajándéka),  $CB_1$  (nyúl, 1  $\mu$ g/ml, ImmunoGenes), CCK (egér, 1:3000 #9303, CURE).

A saját készítésű szekunder antitestek jelölését amino-reaktív Alexa Fluor (AF) 405 vagy Cy3 és AF647 festékek és jelöletlen antitestek felhasználásával végeztük (számárban termelt anti tengerimalac, egér vagy nyúl, Jackson). A jelölt fluoreszcens szekunder antitesteket szintén a Jacksontól vásároltuk (számár AF594 anti-egér vagy AF647 anti-egér).

A HEK sejtek festése során a fixált sejteket tartalmazó Petri-csészéket PB-ben mostuk, majd 10 percre 0,05 M Tris puffert tartalmazó fiziológiás sóoldatban (TBS, 0,9% NaCl, pH = 7,4) oldott 0,1% Triton X-100-al inkubáltuk. Ezt 1 óra TBS-ben oldott primer, majd 3 mosást követően 1 óra TBS-ben oldott szekunder antitestben történő inkubáció követte. Végül a Petri-csészéket TBS-ben és PB-ben mostuk.

A biocytinnal töltött sejteket tartalmazó szeleteket előhívtuk, Vectashieldben lefedtük, és konfokális mikroszkópos képeket készítettünk róluk. Ezután a szeleteket 2% agarózba ágyaztuk, és vibratómmal 20  $\mu$ m vastag metszetekre vágtuk. Ezeket alapos TBS mosást követően 1% szérum albuminban blokkoltuk, majd egy éjjelen át a primer antitesteket tartalmazó TBS-ben inkubáltuk. Újabb TBS mosás után 4 órára szekunder antitestek oldatában inkubáltuk a metszeteket, majd TBS és PB mosás után fedőlemezekre raktuk ki, és 4°C-on, szárazon tároltuk.

### **3.4. Képkalkotás**

A sejtmorfológia vizsgálatához a jelölt sejtekről konfokális z-stacket vettünk fel, 20x objektívvel (0.75 NA), AIR vagy C2 konfokális mikroszkóppal (Nikon).

A STORM képeket egy N-STORM rendszerrel vettük fel (Nikon). A Ti-E mikroszkóp lézer TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) megvilágítással, 405, 488, 562 és 647 nm lézerekkel, Andor iXon DU-897 EMCCD (Electron Multiplying Charge Coupled Device) kamerával, C2 konfokális fejjel, és 100x TIRF objektívvel (1.49 NA) volt felszerelve. Minden minta vizsgálatához friss médiumot készítettünk, mely 5% glükózt, 0.1 M 2-Merkaptoetilamint, 1 mg/ml glükóz oxidázt (Sigma) és 1500 U/ml katalázt (Sigma) tartalmazott DPBS-ben (Dulbecco's phosphate buffered saline).

A HEK sejtek vizsgálata során az EGFP-pozitív sejtekről először konfokális, majd 3D-STORM felvételeket készítettünk (2000 ciklus, mindegyikben 1 aktivátor (561 nm, alacsony intenzitás) és 3 riporter (647 nm, maximális intenzitás) képkockát rögzítettünk, 30 ms expozíciós idővel). Az agyszövet metszetek vizsgálatához a töltött axonterminálisokról konfokális, majd egy- vagy kétsatornás 3D-STORM képet rögzítettünk (csatornánként 1000 ciklus, mindegyikben 1 aktivátor (405 vagy 561 nm, alacsony intenzitás) és 3 riporter képkocka).

### **3.5. Analízis**

A töltött sejtek alacsony nagyítású konfokális képeit az ImageJ (NIH) programmal analizáltuk, és néhány reprezentatív sejtet a NeuroLucida 10 programmal (MBF Bioscience) rekonstruáltunk. Az axonterminálisok eloszlását ImageJ makrókkal mértük. A korrelált STORM analízishez használt konfokális képeket dekonvolváltuk (Huygens, SVI), a STORM képeket pedig a NIS Elements STORM modullal (Nikon) dolgoztuk fel. A jelölt terminálishoz tartozó STORM lokalizációs pontokat ImageJ makrók segítségével jelöltük ki. Az így kapott molekulalisták kvantitatív elemzését ImageJ, Matlab (Mathworks) vagy Python (Python Software Foundation) nyelven írt programokkal végeztük. A STORM képek ábrázolásához a NIS Elements STORM modult (2 dimenziós reprezentáció) vagy a VMD (University of Illinois) programot (3-dimenziós perspektivikus reprezentáció) használtuk. A statisztikai elemzéseket és a grafikonokat a Statistica 11 (Dell), míg az ábrákat a Photoshop (Adobe) programmal készítettük.

## 4. Eredmények

### 4.1. STORM szuper-rezolúciós képképzés sejt-kultúra modellben

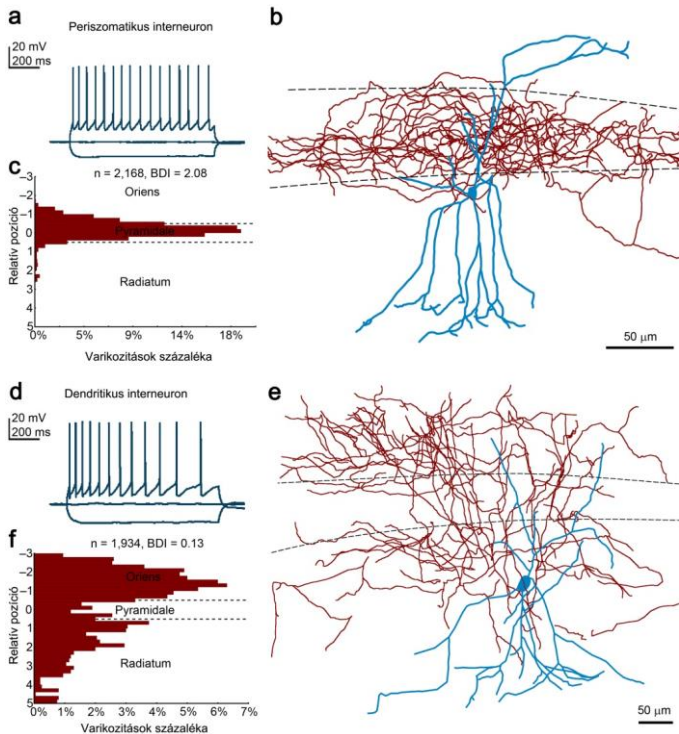
A STORM módszer  $CB_1$  receptorok nanoskálájú eloszlásának vizsgálatára való alkalmasságát elsőként egy egyszerű heterológ expressziós rendszerben vizsgáltuk. A HEK-293 sejtvonal sejtjeit N-terminálisan EGFP-vel jelölt  $CB_1$ -et kódoló plazmákkal transzfektáltuk. Így immunfestés után a kiméra konstrukcióról egyaránt alkothattunk konfokális mikroszkópos képet az EGFP saját fluoreszcenciájára, illetve STORM képet a  $CB_1$  elleni immunfestés alapján. Ebben a kísérletben azt vártuk, hogy amennyiben mind az immunfestés, mind a STORM képképzés érzékeny és specifikus, a detektált lokalizációs pontok (LP) száma arányos lesz az EGFP fluoreszcencia intenzitással. Ennek eldöntésére korrelált képpárokat vettünk fel különböző expressziós szintű transzfektált HEK sejtekről, azonos körülmények között. Azt találtuk, hogy az EGFP saját fluoreszcenciájára erős korrelációt mutatott a  $CB_1$  STORM lokalizációs pontok számával ( $n = 46$  sejt, Spearman-féle rangkorreláció,  $R = 0,92$ ,  $p < 0,001$ ). A lokalizációs precizitás meghatározásához egyedi szekunder antitesteket reprezentáló klasztereket azonosítottunk a képeken, melyek összesen 1220 LP-t tartalmaztak. A klaszterek tömegközéppontjukra való egymásra igazítása után a koordináták szórása 5,7 nm volt laterális, és 32,1 nm axiális irányban.

### 4.2. $CB_1$ receptorok STORM szuper-rezolúciós vizsgálata agyszövetben

A STORM módszer agyszövet-metszeteken való alkalmazhatóságának vizsgálatát vad típusú (WT) és  $CB_1$  géntünetű (KO) egerekből származó mintákon vizsgáltuk. A metszeteket egyaránt megfestettük  $CB_1$  receptor, illetve a CCK neuropeptid ellen, mely a  $CB_1$ -pozitív interneuronok egy általánosan használt markere. A CA1 régió piramis-sejtrétegében a  $CB_1$ - és CCK-pozitív varikozitások a kosársejtekre jellemző mintázatban vették körül a piramis-sejtek immunnegatív sejttesteit. A terminálisok STORM képein a  $CB_1$  jelölés üreges, gyűrűszerű eloszlást mutatott, ami valószínűleg a  $CB_1$  plazmamembránban való szelektív elhelyezkedésének következménye. A  $CB_1$  STORM lokalizációs pontok számának (NLP) meghatározásához a korrelált epifluoreszcens képeken egy-egy varikozitást tartalmazó téglalapokat jelöltünk ki a CCK immunjel alapján. A festés háttérintenzitása kevesebb, mint 1%-nak bizonyult ( $n = 200$  ill. 208 varikozitás 3 WT ill. 2  $CB_1$  KO állatból). Tehát a sejt-kultúra-kísérlethez hasonlóan kijelenthetjük, hogy a  $CB_1$  immunfestés és STORM képképzés fixált hippokampusz metszetekben is érzékeny és specifikus.

A CA1 régió többféle interneuron-típusa is kifejezi a  $CB_1$ -et, és ezen típusokra gyökeresen eltérő kannabinoid-érzékenység jellemző mind endogén, mind exogén agonistákra. Ezen különbség molekuláris hátterének feltárásához célul tűztük ki egy sejt-specifikus mintavételi eljárás kifejlesztését az egyes idegsejtek életani, morfológiai és nanoskálájú molekuláris jellemzőinek együttes vizsgálatához. Ehhez patch-clamp elvezetést végeztünk akut hippokampális szeletekben, és a vizsgált neuronokat biocytin jelölőanyaggal töltöttük fel. A CA1 radiatum rétegének multipoláris sejtjeiből vezettünk el, melyek reguláris, akkomodáló tüzelési mintázatot mutattak, ami a CCK- és  $CB_1$ -pozitív interneuronok jellemzője. Az axonális eloszlás elvezetést követő morfológiai elemzése (1. ábra) két jellemző sejt-típus, a periszomatikus és dendritikus gátlósejtek előfordulását mutatta ki. A heterogén mintavételezést elkerülendő, minden sejt esetében kvantitatívan jellemeztük az axon varikozitások eloszlását a bouton disztribúciós index (BDI)

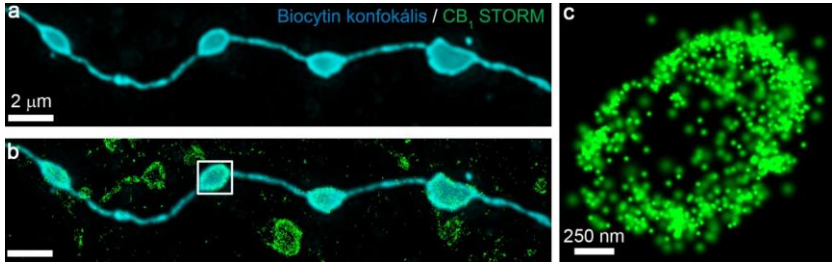
meghatározásával. A sejteket periszomatikusként kategorizáltuk, amennyiben a BDI meghaladta az 1-et, és dendritikusként, amennyiben 0,5 alatt maradt. Az átmeneti sejteket, melyek csupán a jelölt neuronok 5%-át tették ki, kizártuk az elemzésből.



**1. ábra** Az interneuronok morfológiai csoportosítása. (a) A CA1 radiatum multipoláris interneuronjából elvezetett feszültségválasz reguláris (akkomodáló) tüzelési mintázatot mutat. (b) Reprezentatív periszomatikus interneuron rekonstrukciója. (c) Az axon varikozitások eloszlásának kvantitatív vizsgálata lehetővé teszi a sejtek egyértelmű csoportosítást. (d-f) Ugyanígy feldolgozva egy következő sejtet, hasonló tüzelési mintázattal mellett eltérő axon eloszlást tapasztaltunk (dendritikus sejt).

A morfológiai csoportosítást követően összehasonlítottuk a periszomatikus és dendritikus sejtek passzív és aktív elektrofiziológiai jellemzőit ( $n = 14$  ill.  $18$  periszomatikus ill. dendritikus sejt, Mann-Whitney U-próba). Nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a nyugalmi membránpotenciál, a bemenő ellenállás, a „sag” amplitúdója, a visszacsapási potenciál, illetve az akciós potenciál amplitúdó értékeiben. Ellenben a periszomatikus sejtek szélesebb akciós potenciálokot generáltak, kisebb utó-hiperpolarizációt mutattak, és a lassabb kezdeti tüzelés következtében kisebb fokú frekvenciaadaptációt mutatkoztak tüzelési mintázatukban ( $p < 0,05$ ).

Ezt követően ugyanezen sejtekből szeretnénk volna korrelált konfokális és STORM képalkotás alkalmazásával nagy felbontású képeket nyerni az axonterminálisok CB<sub>1</sub> tartalmáról. Megkerestük a töltött sejtek axon-varikozitásait, és konfokális képsorozatot rögzítettünk a biocytin jelölésről, majd 3D-STORM képet vettünk fel a CB<sub>1</sub> elleni immunfestésről (2. ábra). Az összetartozó képpárok illesztése után lehetővé vált az egyes biocytinnel jelölt axonterminálisokhoz tartozó lokalizációs pontok azonosítása. A tanulmány során végig ezt az eljárást alkalmaztuk az azonosított interneuronok terminálisainak nanoskálájú molekuláris vizsgálatára.



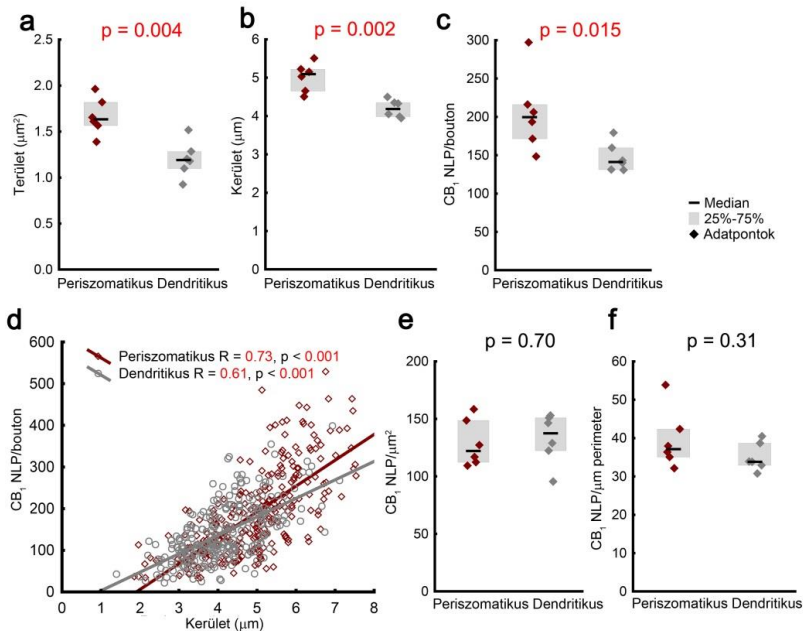
**2. ábra Korrelált konfokális és STORM képalkotás egyedileg jelölt idegsejtek axonterminálisairól** (a) Egyedileg jelölt, elektrofiziológiailag és morfológiailag karakterizált interneuron axonjának dekonvolvált konfokális mikroszkópos képe. (b) A STORM kép rávetítésével láthatóvá válik a CB<sub>1</sub> immunfestés a varikozitások felszínén, és a köztes axon szakaszokon. (c) A bekeretezett terület STORM képe megmutatja a CB<sub>1</sub> jellegzetes, gyűrűszerű eloszlását az axonterminálison.

### 4.3. A CB<sub>1</sub> eloszlása periszomatikus és dendritikus interneuronok axonterminálisain

Vajon magyarázhatja-e a periszomatikus interneuronok magasabb kannabinoid-érzékenységet az axonterminálisaikban kifejeződő CB<sub>1</sub> receptorok magasabb mennyisége? Ezen hipotézis vizsgálatához korrelált konfokális és STORM képalkotás segítségével megmértük átlagosan  $50 \pm 3$  axonterminálison a CB<sub>1</sub> NLP-t 6-6 periszomatikus és dendritikus interneuronból, a biocytin sejtöltés konfokális képéből pedig meghatároztuk a terminálisok méretét. A periszomatikus sejtek boutonjai 39%-kal nagyobbak voltak a dendritikus sejtékéihez képest, és 40%-kal több CB<sub>1</sub> LP-t tartalmaztak (3. ábra a-c).

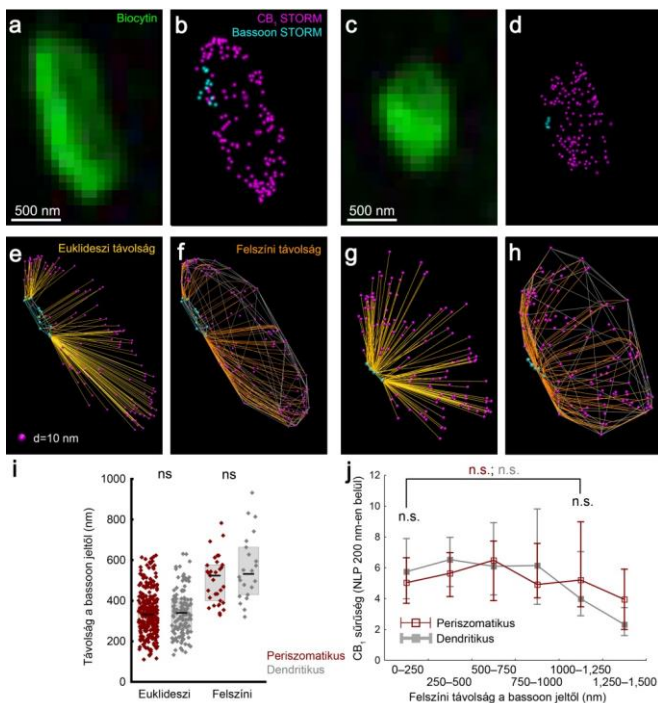
Jelenti-e a CB<sub>1</sub> NLP és a méret sejtípus-specifikus különbségének hasonló mértéke a két paraméter korrelációját? Eredményeink mindkét sejtípus esetében közepes erősségű korrelációt mutattak a boutonok kerülete és a CB<sub>1</sub> immunjel szintje között ( $n = 279$  ill.  $334$  terminális, Spearman-féle rangkorreláció, 3. ábra d). A CB<sub>1</sub> sűrűsége nem különbözött szignifikánsan a periszomatikus és dendritikus sejtek között (3. ábra e-f). Összességében tehát elmondható, hogy az axonterminálisok mérete jól prediktálja a CB<sub>1</sub> mennyiséget, és a CB<sub>1</sub> sűrűsége nem függ a sejtípustól.





**3. ábra** A gátló axonterminálisok CB<sub>1</sub> tartalma a méretükkel arányos (a-b) A periszomatikus sejtek terminálisai nagyobbak, mint a dendritikus sejtekéi. (c) Ezzel párhuzamosan több CB<sub>1</sub> receptort is tartalmaznak. (d) A CB<sub>1</sub> NLP és a terminális mérete korrelált. (e-f) A periszomatikus és dendritikus sejtek átlagosan hasonló sűrűségben tartalmaznak CB<sub>1</sub> receptorokat (medián ± IQR).

A CB<sub>1</sub> hasonló sűrűsége periszomatikus és dendritikus interneuronok axonterminálisain ellentmondásban áll a periszomatikus gátlás nagyobb kannabinoid-érzékenységgel, és arra utal, hogy a preszinaptikus receptormennyiség önmagában nem határozza meg a szinaptikus endokannabinoid jelátvitel erősségét. A G-fehéreje kapcsolt jelátvitel, melyen keresztül a CB<sub>1</sub> gátlóni képes a vezikula-felszabadulást elősegítő molekuláris célpontjait, korlátozott távolságon belül képes hatékonyan működni. Ezért a következő kísérletsorozatban megvizsgáltuk, hogy alakul a receptorok mennyisége az aktív zónák közvetlen környezetében. A CB<sub>1</sub> szinapszisokhoz viszonyított eloszlásának tanulmányozásához bassoon elleni immunfestés segítségével jelöltük meg az aktív zónákat (4. ábra a-d). Az egyedileg jelölt és karakterizált interneuronok axonterminálisain a CB<sub>1</sub> és bassoon LP-k közti távolságot kettős STORM képalkotás segítségével mértük (4. ábra e-h). A receptorok átlagos 3-dimenziós euklideszi távolsága a legközelebbi bassoon ponttól nem különbözött a periszomatikus és dendritikus interneuronok között (4. ábra i, n = 311 ill. 141 axonterminális 10-10 sejtből, Mann-Whitney U-próba, p = 0,69). Úgyszintén meghatároztuk a pontok közti legrövidebb utat a CB<sub>1</sub> lokalizációs pontokra illesztett konvex burok felszínén, és nem találtunk különbséget a két sejtípus között (4. ábra i, n = 33 ill. 22 axonterminális 8 ill. 5 sejtből, p = 0,31).



**4. ábra A CB<sub>1</sub> homogén sűrűségben borítja az axonterminálisok felszínét.** (a-b) Biocytinnel töltött perisomatikus interneuron axonterminálisa CB<sub>1</sub> és bassoon elleni immunfestéssel jelölve, kettős STORM módszerrel fényképezve. Míg a CB<sub>1</sub> jel megfigyelhető a bouton teljes felszínén, a bassoon a terminális szélén elhelyezkedő klasztereket alkot. (c-d) Egy dendritikus interneuron axonterminálisa ugyanilyen módon feldolgozva. (e-h) A CB<sub>1</sub> és bassoon LP-k, valamint a távolságméréshez használt trajektóriák (sárgával) és a CB<sub>1</sub> pontokra illesztett konvex burok (ezüsttel) 3-dimenziós ábrázolása. (i) A CB<sub>1</sub> LP-k átlagos távolsága a legközelebbi bassoon LP-tól nem különbözött a két sejtípus között. (j) A CB<sub>1</sub> térbeli sűrűségének méréséhez a bouton optikai szeletét reprezentáló konvex burok felszínén véletlenszerűen elhelyezett mintavételi pontok 200 nm-es környezetében határoztuk meg a CB<sub>1</sub> NLP-t és a pont felszíni távolságát a legközelebbi bassoon ponttól. A receptorsűrűség nem függ össze a bassoon jeltől való távolsággal, és nem különbözik a perisomatikus és dendritikus sejtek között (medián ± IQR).

Bedúsul-e a CB<sub>1</sub> kifejezetten a szinapszisok közelében? A kérdés eldöntéséhez közvetlenül megmértük a CB<sub>1</sub> STORM jel sűrűségét a boutonokra illesztett konvex burkok felszínén. Meglepő módon azt találtuk, hogy a CB<sub>1</sub> sűrűsége hasonló volt a bassoon klaszterek közelében, mint a felszín távolabbi pontjain, és nem mutatott eltérést perisomatikus és dendritikus interneuronok között ( $n = 33$  ill. 22 axonterminális,  $p > 0.05$ , Mann-Whitney U-próba). Ezen kísérleteink eredményei összességükben arra utalnak, hogy a

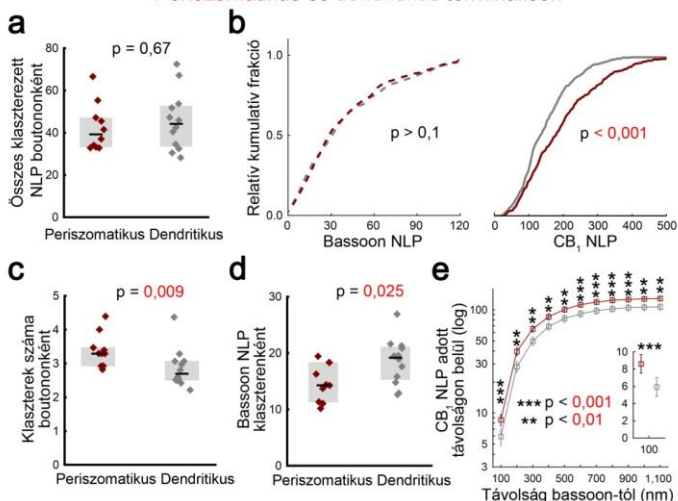
CB<sub>1</sub> receptorok véletlenszerűen, homogén módon oszlanak el az axonterminálisok extraszinaptikus plazmamembránjában, periszomatikus és dendritikus sejtekben is hasonló sűrűségben. Ezért nem valószínű, hogy a receptorok precíz, szinaptikus nanodoménekbe való szerveződése határozná meg a szinapszisok kannabinoid érzékenységét.

#### **4.4. A preszinaptikus aktív zónák szerveződése CB<sub>1</sub>-pozitív axonterminálisokban**

Az endokannabinoid rendszer a vezikula-felszabadulást elősegítő molekulák gátlásán keresztül szabályozza a GABAerg szinaptikus jelátvitelt. Feltételezzük, hogy a gátlás hatékonyságát az aktivált receptorok mennyisége mellett az általuk regulált effektorfehérjék mennyisége is meghatározza. A sejtípusok közti hasonló CB<sub>1</sub> sűrűsége utaló eredményeink ismeretében elképzelhető, hogy a receptor és effektor fehérjék eltérő aránya magyarázhatja a periszomatikus boutonok magasabb kannabinoidérzékenységét. Ezen hipotézis teszteléséhez szükséges volna a CB<sub>1</sub> mellett a releváns effektorok mennyiségének meghatározása. Irodalmi adatokból ismert, hogy a preszinaptikus aktív zónák mérete erősen korrelál a transzmitterürülés valószínűségével, a kalcium tranziensek amplitúdójával, valamint a kalcium csatornák és a RIM fehérjék mennyiségével az adott axonterminálisban. Mivel a bassoon immunfestés kijelöli az aktív zónákat, a következő kísérletben megmértük a bassoon klaszterek méretét az interneuronok axonterminálisaiiban. Ehhez egyszeres bassoon immunfestést végeztünk, hogy a csatornák közti áthallás ne zavarhassa meg a lokalizációs pontok egyértelmű azonosítását.

A periszomatikus axonterminálisok nagyobb méretük ellenére (ld. 3. ábra) ugyanannyi bassoon LP-t tartalmaztak, mint a dendritikus interneuronok kisebb boutonjai (5. ábra a, n = 349 ill. 374 axonterminális 10 periszomatikus ill. 12 dendritikus sejtből, Mann-Whitney U-próba), ami szemben áll ezen sejtek axonterminálisainak a korábbi kísérletekben mért magasabb CB<sub>1</sub> tartalmával (5. ábra b, kétmintás Kolmogorov-Smirnov próba). A bassoon LP-k 3-dimenziós klaszteranalízise megmutatta, hogy a periszomatikus interneuronokban nagyobb számú, ám egyenként kisebb preszinaptikus klaszter figyelhető meg (5. ábra c-d), ami az aktív zónák nagyobb mértékű fragmentációjára utal. Ezt az eredményt összevetve a CB<sub>1</sub> homogén eloszlásával arra következtettünk, hogy az egyedi aktív zónák nanoskálájú környezetében magasabb CB<sub>1</sub>/bassoon arány alakulhat ki a periszomatikus axonterminálisokban. Valóban, a kettős CB<sub>1</sub>-bassoon STORM kísérlet adatait használva kimutattuk, hogy a periszomatikus szinapszisokban 49%-kal több CB<sub>1</sub> LP helyezkedik el a bassoon klaszterek közvetlen környezetében (5. ábra e).

## Periszomatikus és dendritikus terminálisok



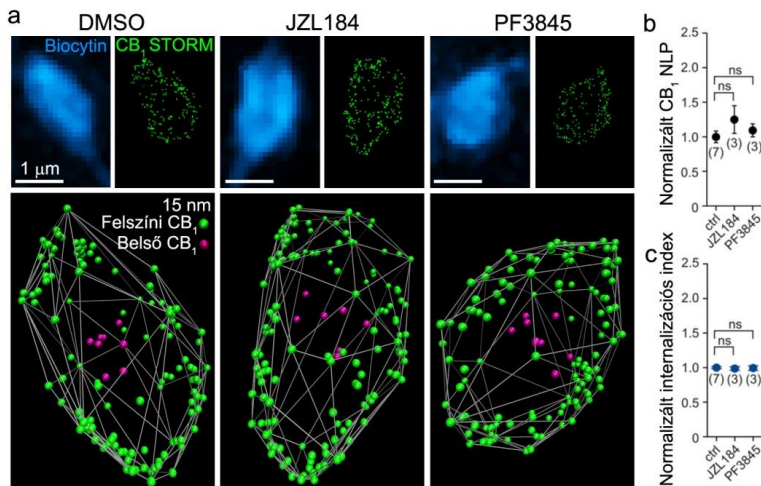
**5. ábra A periszomatikus interneuronok axonterminálisaiban az aktív zónák fragmentált szerveződése a CB<sub>1</sub> receptor és a bassoon magasabb arányát eredményezi** (a) Az azonosított interneuronok axonterminálisaiból felvett egyszeres bassoon STORM immunjel mennyisége nem különbözik periszomatikus és dendritikus sejtek között. (b) A két sejtípus bassoon és CB<sub>1</sub> tartalmának összehasonlítása kumulatív histogramokon, két különböző kísérletből. (c) A periszomatikus interneuronok terminálisai nagyobb számú bassoon klasztert tartalmaznak. (d) Az egyedi klaszterek kisebbek a periszomatikus, mint a dendritikus sejtek boutonjaiban. (e) Kettős CB<sub>1</sub>-bassoon STORM jelölésből kimutatható, hogy a periszomatikus interneuronokban több CB<sub>1</sub> LP található meg a bassoon klaszterek közelében tetszőleges távolságon belül (medián ± IQR, a beillesztett grafikonon a 100 nm-es távolságlimit eredményeivel).

Az egyszeres és kettős STORM kísérletek együttes kiértékelése tehát megmutatta, hogy a periszomatikus interneuronokban az átlagos bassoon klasztert kevesebb LP alkotja, viszont ugyanannyi CB<sub>1</sub> receptor veszi körül, mint a dendritikus sejtek esetében. Ez az elrendeződés a receptorok és downstream effektoraik magasabb arányához vezet, ami lehetséges magyarázata a kannabinoid jelátvitel nagyobb hatékonyságának ezekben a szinapszisekban.

### 4.5. A CB<sub>1</sub> eloszlásának dinamikus átrendeződése agonisták hatására

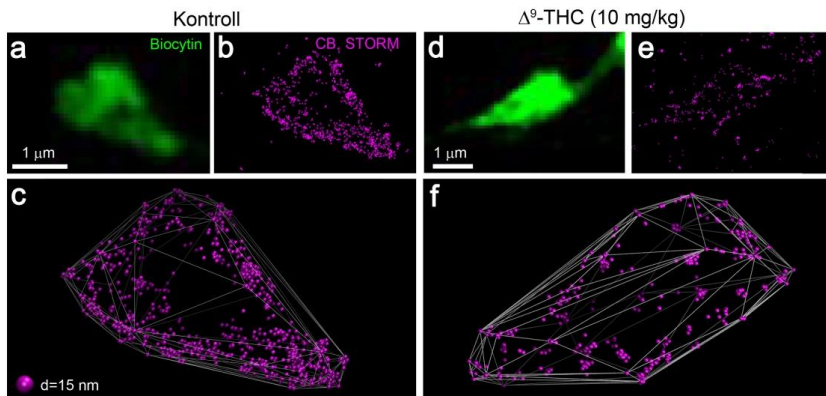
Az eddigiek során a CB<sub>1</sub> állandósult eloszlását meghatározó elveket vizsgálva a receptorok homogén eloszlását tapasztaltuk a GABAerg axonterminálisok extraszinaptikus membránjában. Azonban a G-fehérje kapcsolt receptorok agonista bekötődése által kiváltott aktivációját jellemzően a receptor internalizációja terminálja, ezért várható, hogy akár endogén, akár exogén agonisták hatására a receptorok átrendeződését tapasztalhatjuk. Ennek vizsgálatára elsőként farmakológiai eszközökkel megemelt endokannabinoid-szint mellett mértük a CB<sub>1</sub> eloszlását periszomatikus interneuronokban a sejt-specifikus STORM módszer alkalmazásával. Az akut szeletekben 100 nM JZL184 (JZL) ill. 1 μM PF3845 (PF)

hozzáadásával gátoltuk rendre az MGL ill. a FAAH aktivitását, így lebontásuk megakadályozásával kétszeresre emeltük a 2-AG ill. az anandamid szövetben mért koncentrációját. A receptorok internalizációját a STORM lokalizációs pontoknak az axonterminális középpontja felé történő eltolódása alapján becsültük. Meglepő módon a kezelés nem érintette sem a CB<sub>1</sub> NLP-t, sem az internalizált receptorok arányát (sejtenként  $22 \pm 12$  bouton,  $n = 7$  kontroll, 3 JZL-kezelt, ill. 3 PF-kezelt sejtből, Kruskal-Wallis ANOVA és medián próba, 6. ábra a-c).



**6. ábra** A CB<sub>1</sub> mennyiségét nem befolyásolja az endokannabinoidok megemelt szintje. (a) CB<sub>1</sub> STORM jelölés egyedileg töltött periszomatikus interneuronok axonterminálisain, JZL ill. PF kezelés útján megemelt 2-AG ill. anandamid koncentráció után. (b) Az endokannabinoid szintek akut emelkedése nem okoz változást a CB<sub>1</sub> LP-k számában. (c) A kezelés nem volt hatással a CB<sub>1</sub> internalizációjára (átlag ± az átlag szórása).

Az MGL gátlás után meglepő, hogy nem tapasztaltuk a CB<sub>1</sub> internalizációját, mert ismert, hogy az MGL aktivitás krónikus hiánya kannabinoid toleranciát és a CB<sub>1</sub> szint csökkenését váltja ki. Az ellentmondás egy lehetséges magyarázata, hogy az inkubáció időtartama a felszíni CB<sub>1</sub> eloszlás dinamikájának időskálájához mérten rövid volt. A hosszabb idejű változások robusztus kiváltásához ezért *in vivo* állatmodellrel választottunk. Egy elismert hatékonyságú krónikus THC kezelési protokollt alkalmaztunk (10 mg/kg THC napi kétszer i.p. injekcióval, 6,5 napon át), mely alkalmas funkcionális és viselkedési kannabinoid tolerancia kialakítására. A CB<sub>1</sub> átrendeződésének vizsgálatához az így kezelt állatokból készített szeletekben töltöttünk fel periszomatikus interneuronokat. A kontroll mintákban a CB<sub>1</sub> nagy sűrűségben borította az axonterminálisok felszínét (7. ábra a-c). Ezzel szemben a THC-vel kezelt állatokban feltűnően lecsökkent a jelölés intenzitása, és a CB<sub>1</sub> LP-k többé nem jelölték egyértelműen a boutonok felszínét, viszont CB<sub>1</sub> klaszterek voltak megfigyelhetők a terminálisok belsejében (7. ábra d-f).



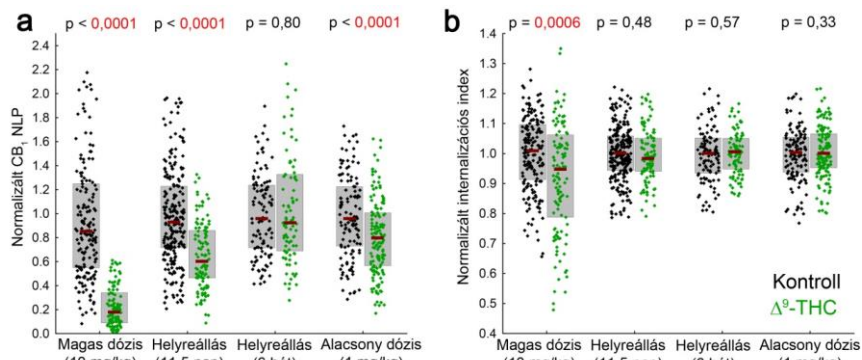
**7. ábra** A krónikus THC kezelés a CB<sub>1</sub> eloszlás átrendeződését okozza. (a) Azonosított perisomatikus interneuron axonterminálisa kontroll állatból származó mintából. (b) A jelölt bouton korrelált CB<sub>1</sub> STORM képe. (c) A CB<sub>1</sub> LP-k 3-dimenziós ábrázolása. A CB<sub>1</sub> kirajzolja az axonterminális felszínét. (d-f) CB<sub>1</sub> STORM jelölés krónikus THC kezelést követően. A CB<sub>1</sub> mennyisége jelentősen lecsökkent, és nagyobb arányban detektálható a terminális belsejében.

A jelölés csökkenésének méréséhez meghatároztuk a CB<sub>1</sub> NLP és az internalizációs index értékét ( $n = 185$  ill. 117 axonterminális 3 hordozóanyaggal ill. and 2 THC-vel kezelt egérből, Mann-Whitney U-próba). A CB<sub>1</sub> STORM immunjel szintje a boutonokon 74%-al csökkent a kezelés hatására (8. ábra a), és a megmaradó CB<sub>1</sub> LP-k szignifikáns eltolódását figyeltük meg a terminálisok tömegközéppontja felé (8. ábra b). Ezek az eredmények egyértelműen arra utalnak, hogy a magas dózisú THC kezelés a CB<sub>1</sub> receptorok eloszlásának jelentős átrendeződését váltja ki a GABAerg szinapszisokban.

A következő kísérletben megvizsgáltuk az átrendeződés helyreállítását. A molekuláris változások és a funkcionális tolerancia összefüggésének feltárása céljából két időpontot választottunk ki: 11,5 nap absztinencia után ismert, hogy a kannabinoid agonista viselkedési hatása visszaáll a kontroll állapotba, míg 6 hét elteltével minden ismert vizsgálat a receptorszint és -funkció teljes visszatéréséről számolt be. Az első esetben, 11,5 nap után a THC-kezelt egerek perisomatikus interneuronjainak axonterminálisain mindössze az elveszett CB<sub>1</sub> jel fele tért vissza (35% csökkenés a kontrollhoz képest), de a CB<sub>1</sub> internalizációban már nem tapasztaltunk eltérést a kezelt és kontroll állatok között (8. ábra a-b,  $n = 283$  ill. 113 axonterminális 3-3 egérből). A hosszabb, 6 hetes regeneráció után sem a CB<sub>1</sub> NLP, sem az internalizációs index értékeiben nem volt felfedezhető a THC kezelés hatása (8. ábra,  $n = 113$  ill. 92 axonterminális 2 kontroll ill. 3 THC-kezelt egérből).

A fenti kísérletekben alkalmazott 10 mg/kg dózis magasnak tekinthető, és úgy választottuk meg, hogy toleranciát tudjunk kialakítani. Ezzel szemben a THC terápiás célú alkalmazásában - például a Sativex szer esetében, mely egy *sclerosis multiplex* kezelésében indikált, kannabidiollal kombinált THC preparátum - alacsonyabb dózist céloznak meg, a pszichoaktív és kognitív mellékhatások elkerülése érdekében. Ezen alacsonyabb dózisú

krónikus THC-használat modellezéséhez 1 mg/kg THC adagolásával ismételtük meg a kísérletet. A jelölt periszomatikus interneuronok axonterminálisain a CB<sub>1</sub> NLP kismértékű, 16%-os csökkenését mértük, és nem tapasztaltuk a receptorok fokozott internalizációját (8. ábra, n = 113 ill. 92 axonterminális 2 kontroll ill. 3 THC-kezelt egérből). A fenti kísérletek együttesen megmutatják, hogy az exogén kannabinoidok krónikus alkalmazása a hippocampális GABAerg szinapszisokban a CB<sub>1</sub> receptorok dóziszfüggő és reverzibilis eltűnését váltja ki, és az internalizáció és degradáció eltérő időskálán zajlik le.



**8. ábra A krónikus THC kezelés által kiváltott molekuláris átrendeződés helyreállása és dóziszfüggése.** (a) A CB<sub>1</sub> NLP-t egyedileg jelölt periszomatikus interneuronok axonterminálisain mértük négy független kísérletben, melyek közül mindegyikben szerepelt hordozóanyaggal injektált kontrollcsoport. A krónikus THC kezelés jelentős csökkenést okozott a jelszintben, mely részlegesen visszatért 11,5 nap, és teljesen visszatért 6 hét helyreállást követően. Az alacsonyabb, terápiás alkalmazás szempontjából releváns dózis enyhe csökkenést váltott ki. (b) A CB<sub>1</sub> internalizációs indexet ugyanezen az axonterminálisokon mérve csak közvetlenül a nagy dózisú kezelés után tapasztaltunk eltérést, mely már 11,5 nap alatt helyreállt.

## 5. Következtetések

Megmutattuk, hogy a STORM szuperrezolúciós mikroszkópia egyedi, azonosított neuronok patch-clamp elvezetés során történő jelölésével kombinálva hatékony módszer az idegsejtek elektrofiziológiai, morfológiai és molekuláris tulajdonságainak korrelált vizsgálatára. A lokalizációs pontok száma a STORM képen a fehérjemennyiséggel korrelált, így alkalmas a relatív kvantitatív molekuláris képalkotásra, az immunarany elektronmikroszkópiával összemérhető felbontással (6 nm laterális, és 41 nm axiális lokalizációs pontossággal).

A módszert alkalmazva kimutattuk, hogy a CB<sub>1</sub>-pozitív hippocampális interneuronok axonterminálisain a terminális mérete jól prediktálja a CB<sub>1</sub> mennyiségét, valamint hogy a periszomatikus interneuronok axonterminálisai nagyobbak és 39%-al több CB<sub>1</sub> LP-t tartalmaznak, mint a dendritikus interneuronok boutonjai. A CB<sub>1</sub> sűrűsége az extraszinaptikus plazmamembránban homogén, és egyforma a két sejttípus között. Ezen eredmények szemben állnak a periszomatikus interneuronok magasabb kannabinoid-érzékenységével, és arra utalnak, hogy a receptorsűrűség önmagában nem határozza meg a CB<sub>1</sub> közvetítette jelátvitel erősségét.

Mindkét sejttípus axonterminálisai hasonló mennyiségű bassoont tartalmaztak, mely azonban nagyobb számú, egyenként kisebb klasztert alkotott a periszomatikus interneuronokban. Ennek következményeként 49%-kal több CB<sub>1</sub> LP helyezkedett el a periszomatikus axonterminálisok aktív zónáinak környezetében. Ezért feltételezzük, hogy a CB<sub>1</sub> és a tőle downstream effektor fehérjék nanodomain-specifikus aránya meghatározója lehet a szinaptikus kannabinoid reguláció hatékonyságának, és magyarázhatja a periszomatikus interneuronok szinapszisainak magasabb kannabinoid-érzékenységét, és az itt mérhető tónikus endokannabinoid jelátvitelt.

Az endokannabinoidok szintjének akut emelkedése a 2-AG ill. az anandamid lebontó enzimeinek gátlásával nem okozott változást a CB<sub>1</sub> mennyiségében vagy internalizációjában azonosított periszomatikus interneuronok axonterminálisain. Ellenben a krónikus THC kezelés jelentős, 74%-os CB<sub>1</sub> NLP csökkenést, és az internalizált receptorok arányának növekedését váltotta ki. A CB<sub>1</sub> eloszlásának krónikus átrendeződése részlegesen állt helyre 11,5 nap után (az elveszett jel 53%-a tért vissza), míg 6 hét után teljes mértékben helyreállt. Alacsonyabb, terápiás alkalmazás szempontjából releváns THC dózis alkalmazása enyhébb, 16%-os csökkenést váltott ki, és nem okozott mérhető változást az internalizációban. Összességében eredményeink megmutatták, hogy a THC tolerancia kialakulása során a CB<sub>1</sub> receptorok reverzibilis, dóziszfüggő módon elvesznek a hippocampális GABAerg axonterminálisokról. Ezek a molekuláris változások állhatnak a kannabisz okozta kognitív zavarok hátterében.



## 6. Saját publikációk jegyzéke

### A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

Dudok B<sup>1</sup>, Barna L<sup>1</sup>, Ledri M<sup>1</sup>, Szabó SZI, Szabadits E, Pintér B, Woodhams SG, Henstridge CM, Balla GY, Nyilas R, Varga C, Lee SH, Matolcsi M, Cervenak J, Kacs Kovics I, Watanabe M, Shaggedu C, Melis M, Pistis M, Soltesz I, Katona I (2015) *Cell type-specific STORM super-resolution imaging reveals nanoscale organization of cannabinoid signalling at hippocampal GABAergic synapses*. **Nature Neuroscience** 18:75-86.

Lee SH, Ledri M, Tóth B, Marchionni I, Henstridge CM, Dudok B, Kenesei K, Barna L, Szabó SZI, Renkecz T, Oberoi MK, Watanabe M, Limoli C, Horvai G, Soltesz I, Katona I (2015) *Multiple Forms of Endocannabinoid and Endovanilloid Signaling Regulate the Tonic Control of GABA Release*. **Jornal of Neuroscience** 35:10039-10057.

### Egyéb közlemények

Barna L<sup>1</sup>, Dudok B<sup>1</sup>, Miczán V, Horváth A, László ZSI, Katona I (2016) *Correlated confocal and super-resolution imaging by VividSTORM*. **Nature Protocols** 11:163-183.

Neuhof er D, Henstridge CM, Dudok B, Sepers M, Lassalle O, Katona I, Manzoni OJJ (2015) *Functional and structural deficits at accumbens synapses in a mouse model of Fragile X*. **Frontiers in Cellular Neuroscience** 9:100.

Nyilas R, Dudok B, Urbán GM, Mackie K, Watanabe M, Cravatt BF, Freund TF, Katona I (2008) *Enzymatic machinery for endocannabinoid biosynthesis associated with calcium stores in glutamatergic axon terminals*. **Journal of Neuroscience** 28:1058-1063.

<sup>1</sup>megosztott első szerzőség