

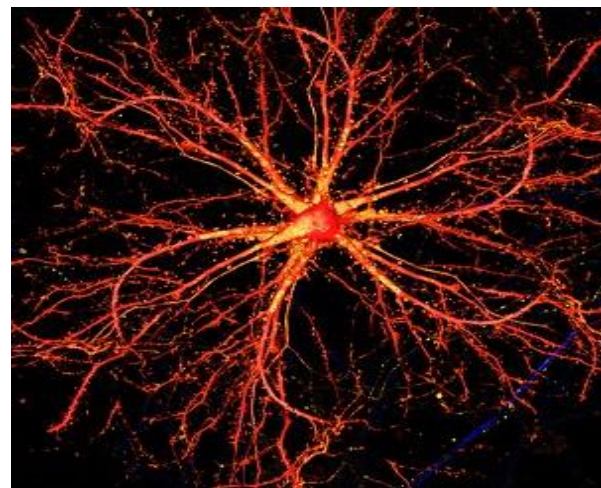
Sejttípus-specifikus nanoskálájú fehérjevizsgálatok szuper-rezolúciós mikroszkópia és VividSTORM szoftver segítségével



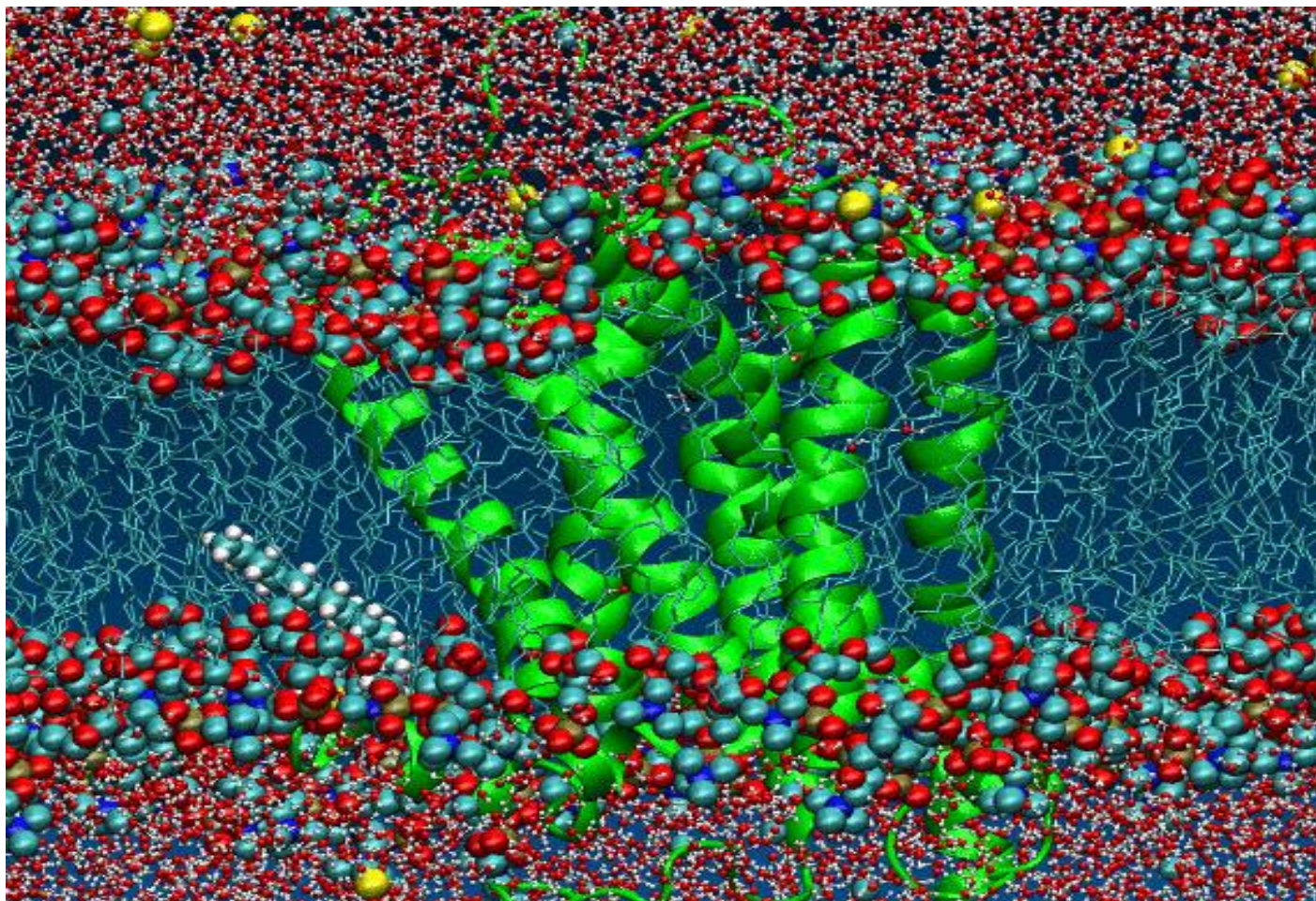
MTA KOKI Lendület Molekuláris Neurobiológiai Kutatócsoport



MEDInPROT
4. konferencia
2016.04.09.



A CB₁ kannabinoid receptor

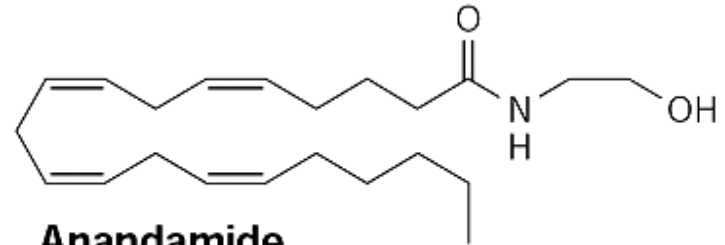


Yoong Shim modellje

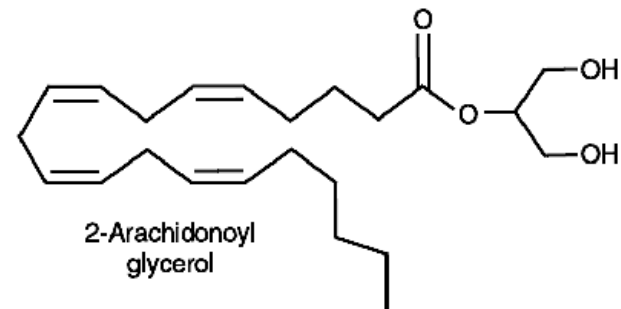
**Allyn Howlett es William Devanne igazolta
létezését 1988-ban**

Miért van szükségünk kannabinoid receptorokra?

Burns et al,
(2007) PNAS



N-acil-etanolaminok



Monoacil-glicerinek

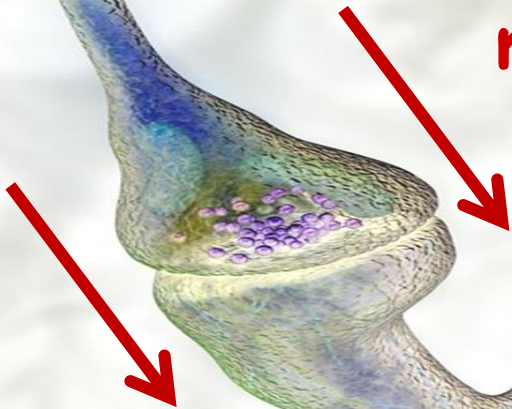
Raphael Mechoulam csoportja
fedezte fel 1992-1995-ben

„David's brain”
Priyan Weerappuli alkotása, 2005

**Mi az endokannabinoid rendszer
élettani feladata?**

**Anterográd jelátvitel a
kémiai szinapszisban:
axon > dendrit**

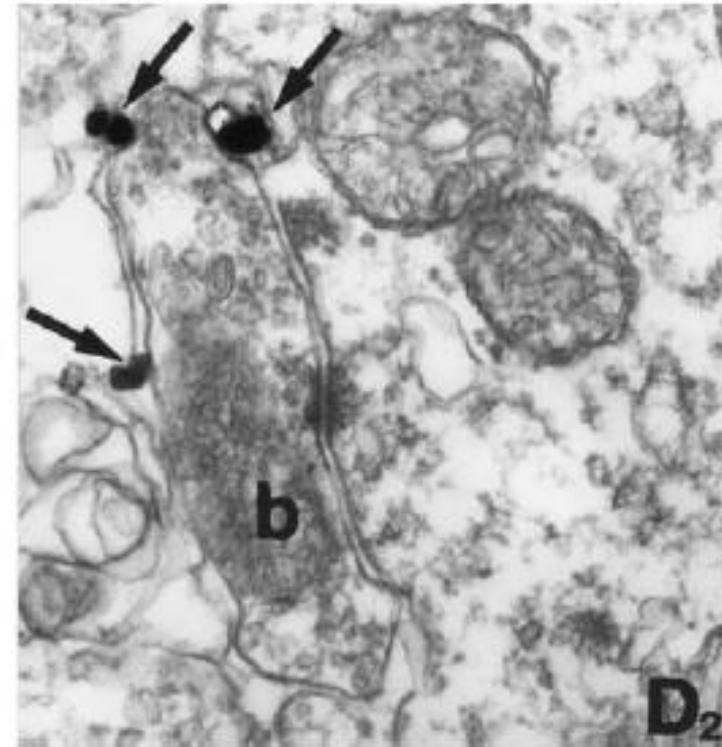
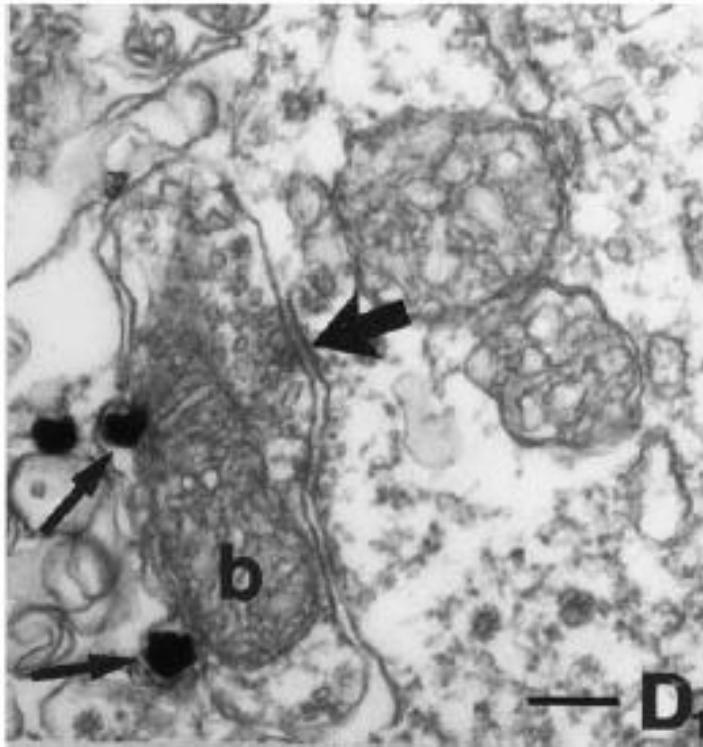
**Létezik-e
visszacsatolási
mechanizmus?**



Preszinaptikus CB₁ receptorok az idegvégződéseken

Patkány hippocampusz GABAerg idegvégződés

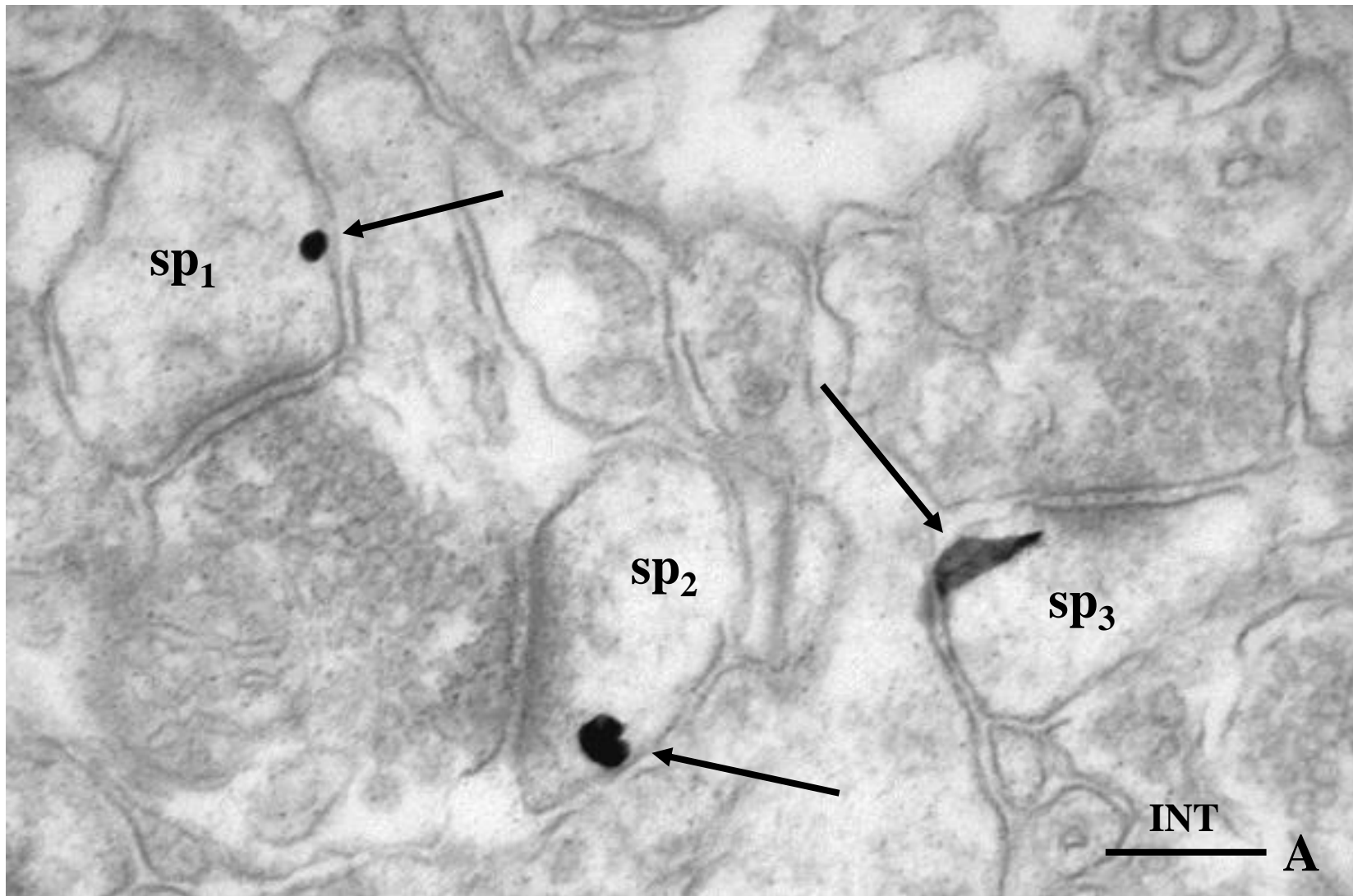
Katona et al (1999) Journal of Neuroscience



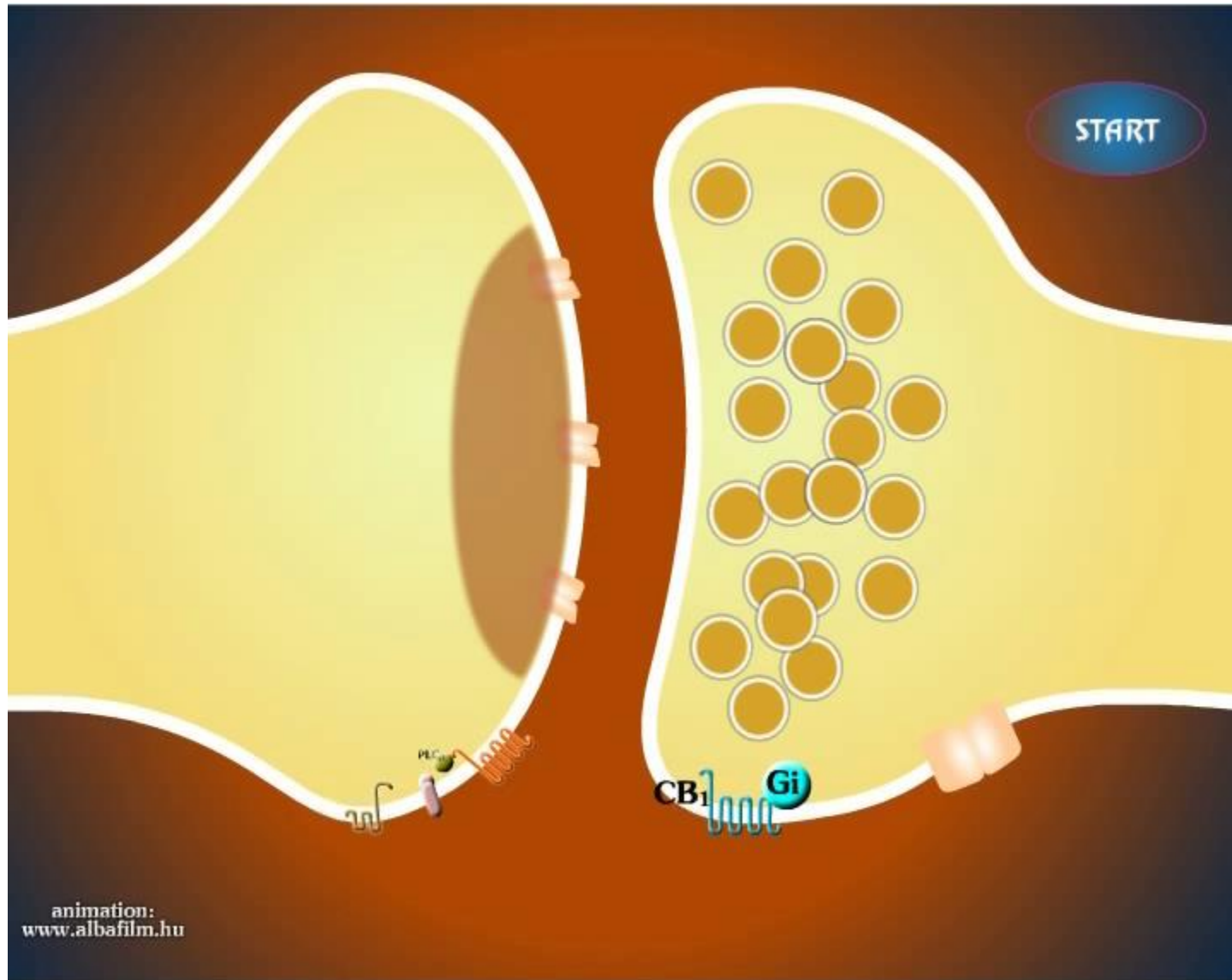
Regardless of the precise localization of CB1 along the axon terminal membrane, these receptors could be easily reached by endogenous cannabinoids potentially released from postsynaptic sites (Stella and Piomelli, 1998), (e.g., from the cell bodies and proximal dendrites of pyramidal cells). Taken together, these results suggest that cannabinoids exert their modulatory effects on the GABAergic systems of the hippocampus by a presynaptic rather than a postsynaptic mechanism.

Honnan érkezik a szinaptikus endokannabinoid?

Posztszinaptikus endokannabinoid-szintetizáló Diacylglycerol Lipáz- α a dendritekben

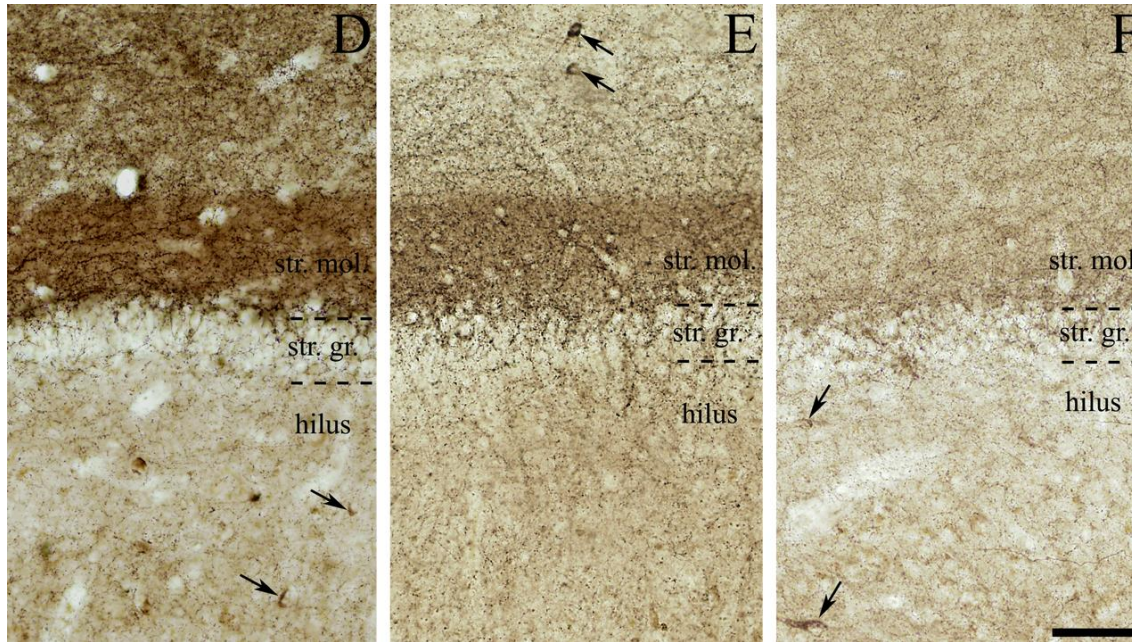


A „szinaptikus biztosíték” modell



A CB₁ receptor **sejttípus-specifikus** csökkenése az epilepsziás hippocampusban

Ludányi et al (2008) Journal of Neuroscience

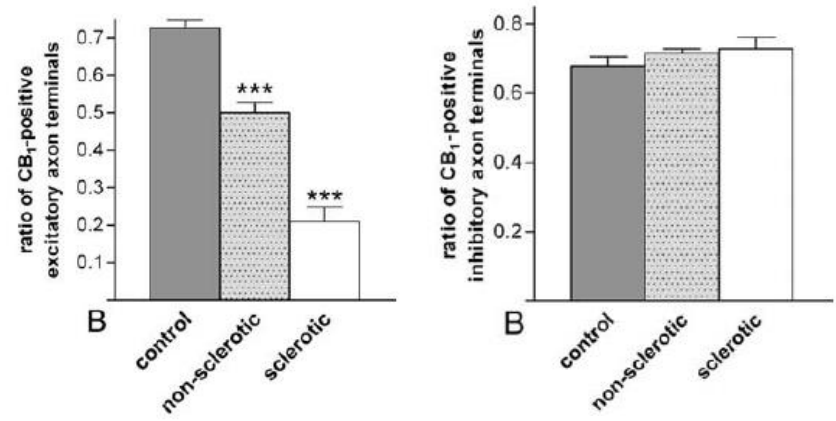
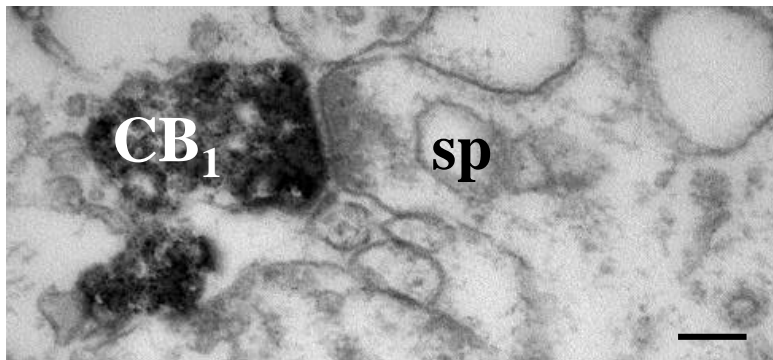


Kontroll

Nem-szklerotikus

Szklerotikus

Temporális lebeny eredetű epilepsziában a CB₁ receptorok szelektíven a serkentő idegvégződésekről tűnnek el

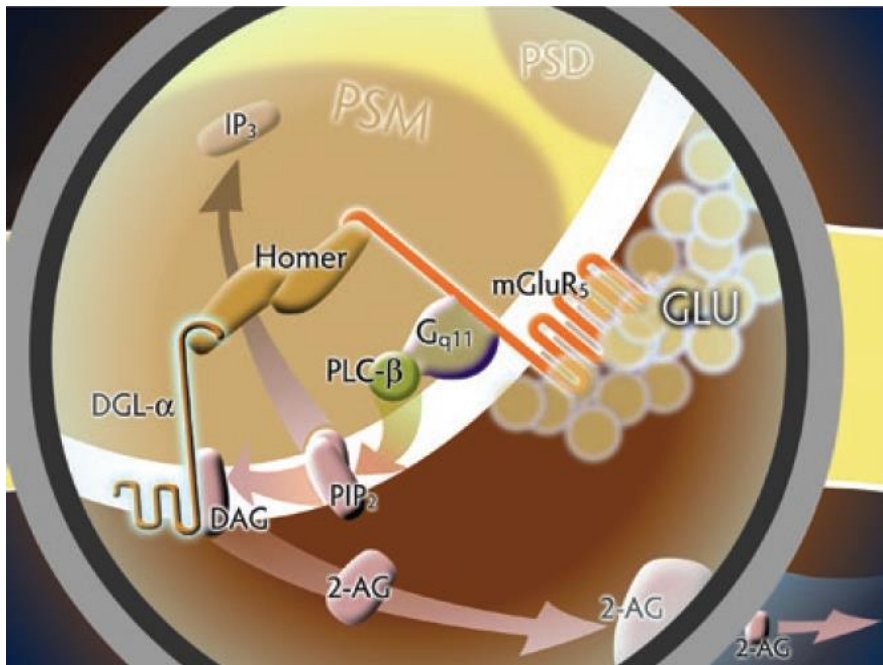


Törékeny X szindróma: az endokannabinoid szintézis sejttípus-specifikus károsodása

The mGluR theory of fragile X mental retardation

Mark F. Bear¹, Kimberly M. Huber² and Stephen T. Warren³

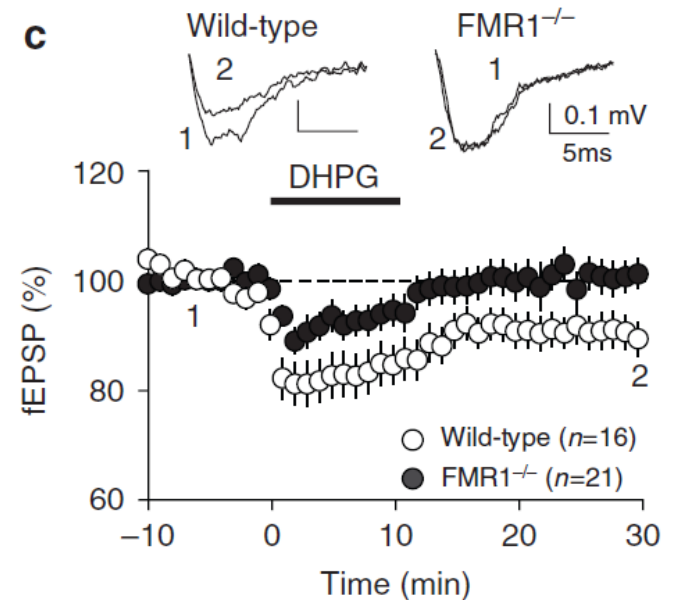
Trends in Neurosciences, 2004



Katona and Freund (2008) Nature Medicine

Mi történik a PeriSzinaptikus Masina szerkezetével?

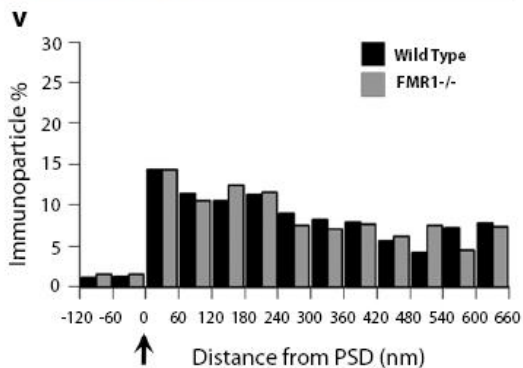
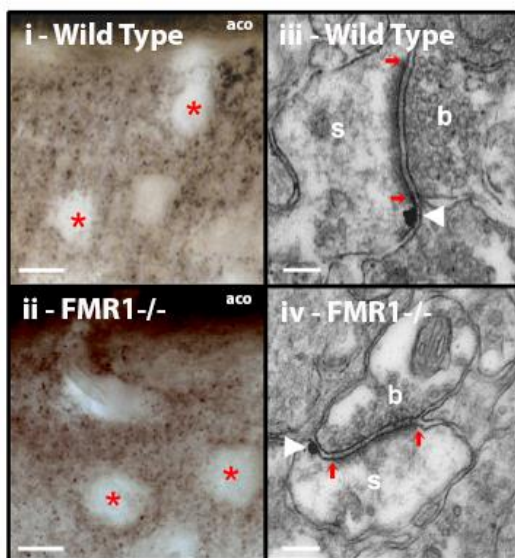
Jung et al (2012) Nature Communications



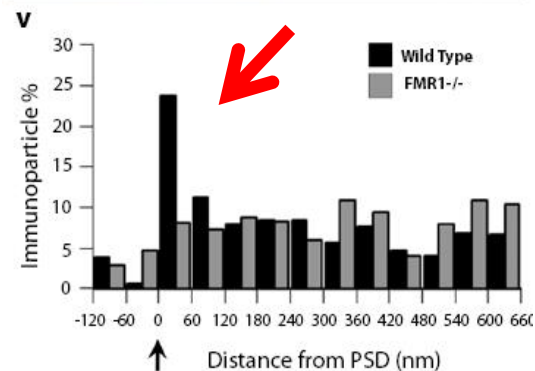
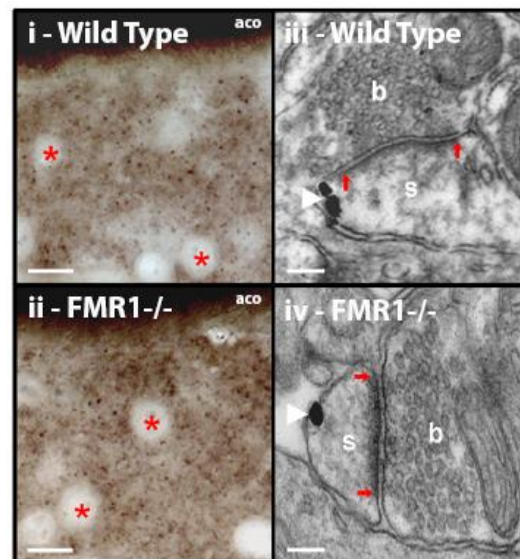
**mGluR-Endocannabinoid-mediálta
szinaptikus plaszticitás
nem működik
a serkentő szinapszisokban**

A 2-AG endokannabinoidot előállító makromolekuláris komplex szétkapcsolódik

mGlu₅



DGL- α



Jung et al (2012)
Nature Communications

A DGL- α 100 nanométerrel elcsúszik!

Az agy komplexitása hatalmas koncepcionális és módszertani kihívás

Az idegrendszer egészséges és kóros működésének
hátterében **nanoskálán** létrejövő **sejttípus-specifikus**
molekuláris változások állnak

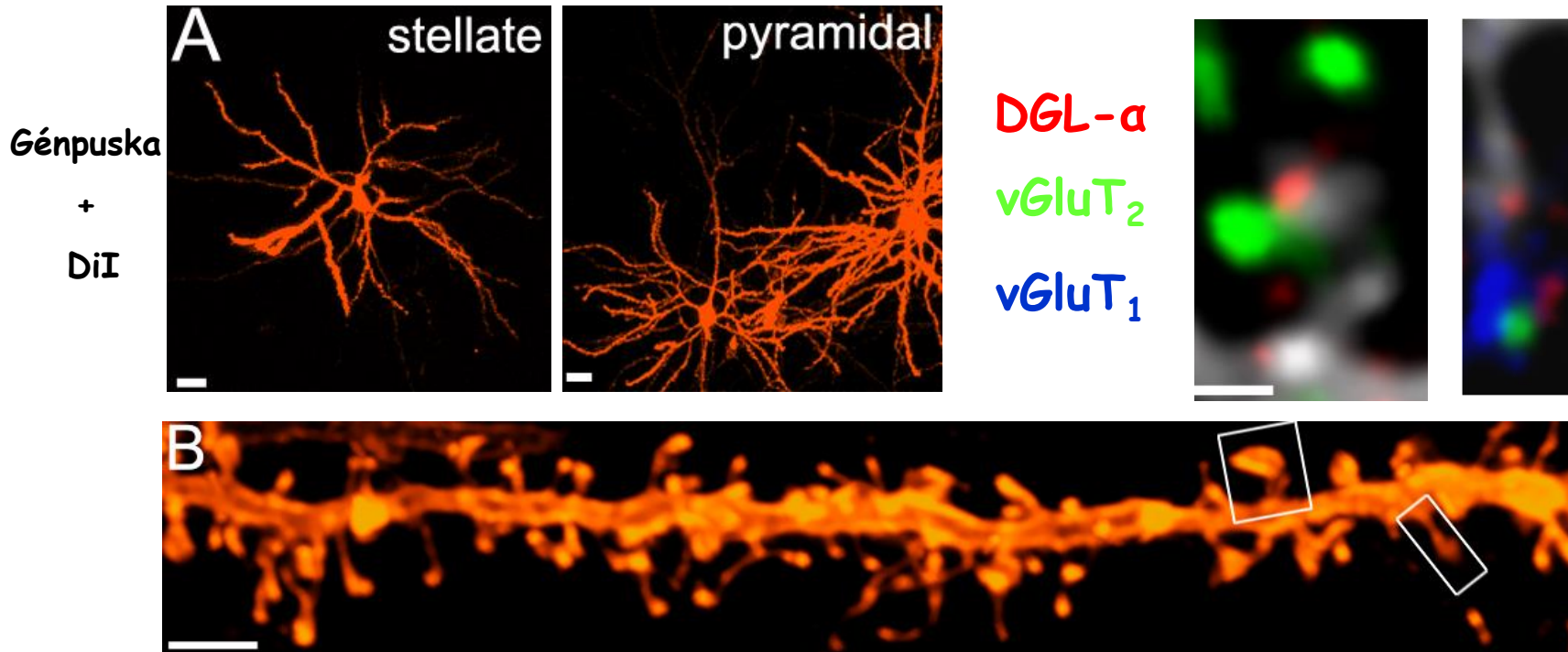
~ 900 agyterület
az emberi agyban

~ 1000 sejttípus az agyban
(~200 az összes többi
szervünkben)

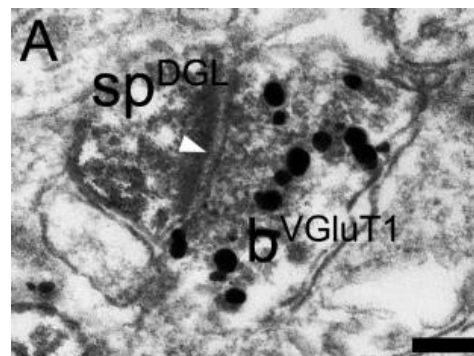
~20,000 génünk

~90% -a be van kapcsolva az
idegrendszerben

Célkitűzés: Molekuláris változások nanométeres pontosságú mérése sejttípus-specifikus módon



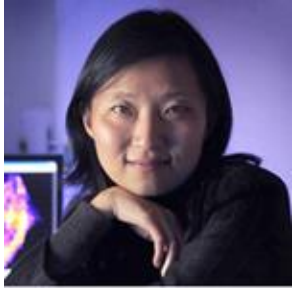
Konfokális mikroszkóp:
Gyors és sokszínű
de
korlátozott felbontású
250 nm (x-y), 600 nm (z)



Dudok et al előkészületben

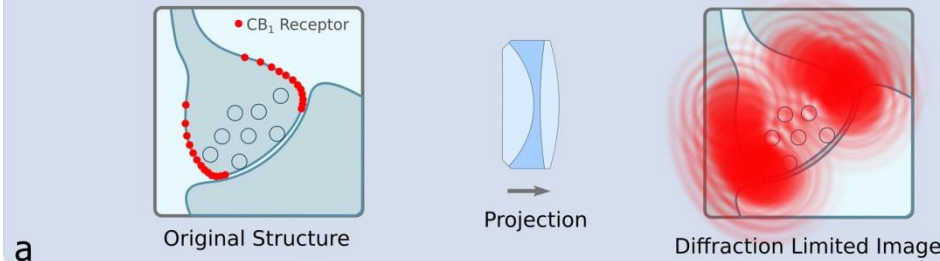
Elektronmikroszkóp:
Nanométeres pontosság
de idő- és munkaigényes,
csak 1-2 fehérjére alkalmas
sejttípus-specifikusság nehéz

A STORM szuper-rezolúciós képalkotás alapelve

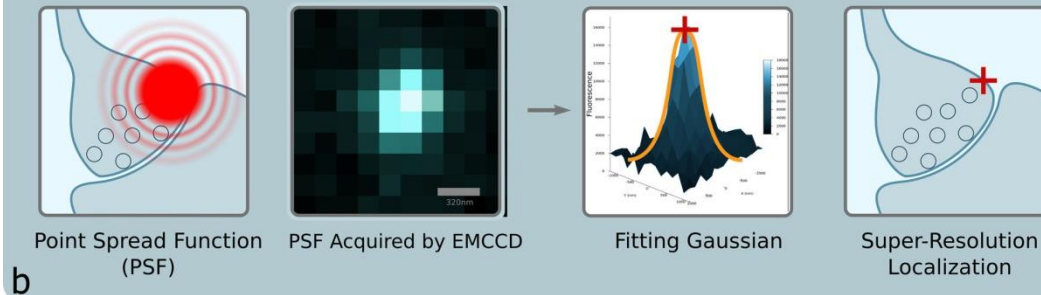


Xiaowei Zhuang
(Harvard University)

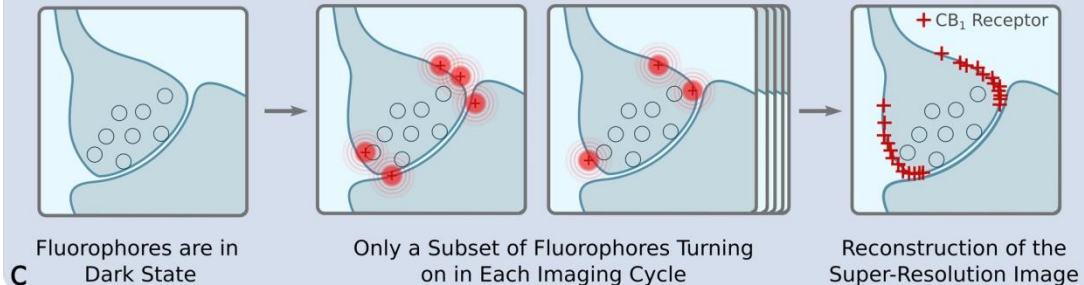
Diffraction Limited Image Formation



Single Molecule Localization



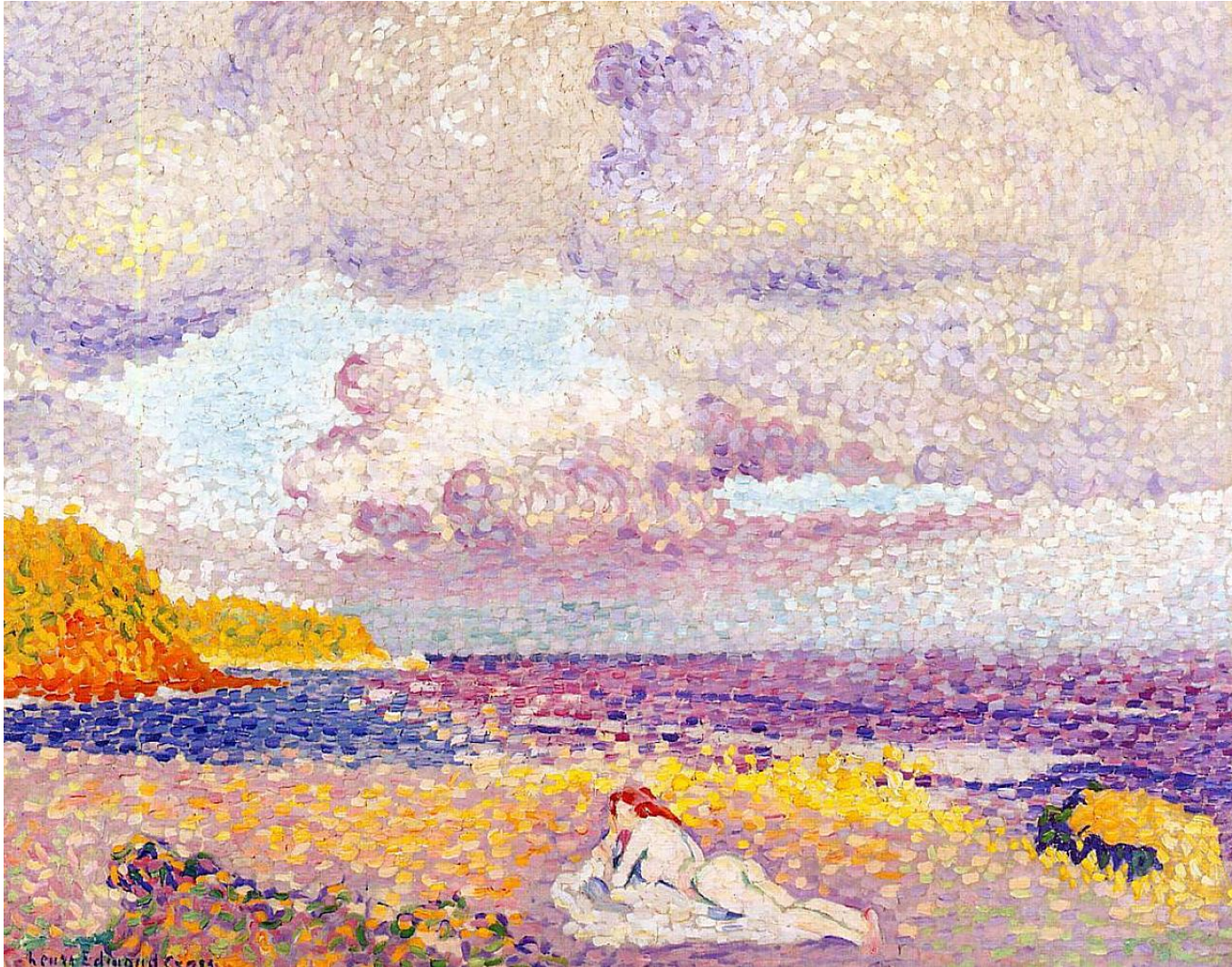
STORM (Stochastical Optical Reconstruction) Microscopy



Barna László ábrája

„An Incoming Storm“

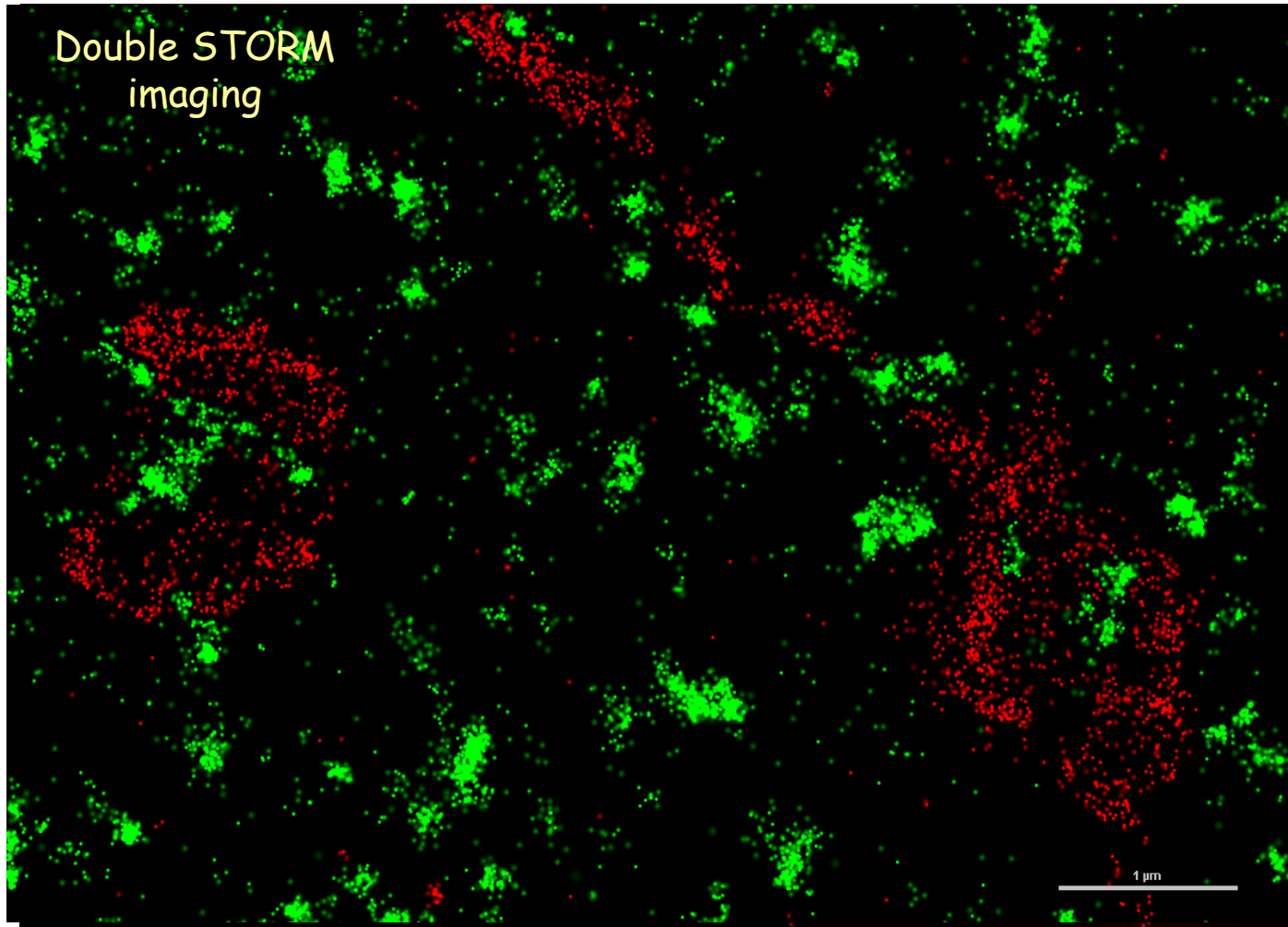
Henri Edmond Cross (1908)



Pointillismus

Preszinaptikus CB_1 receptorok vizsgálata STORM képalkotással

CB_1
bassoon

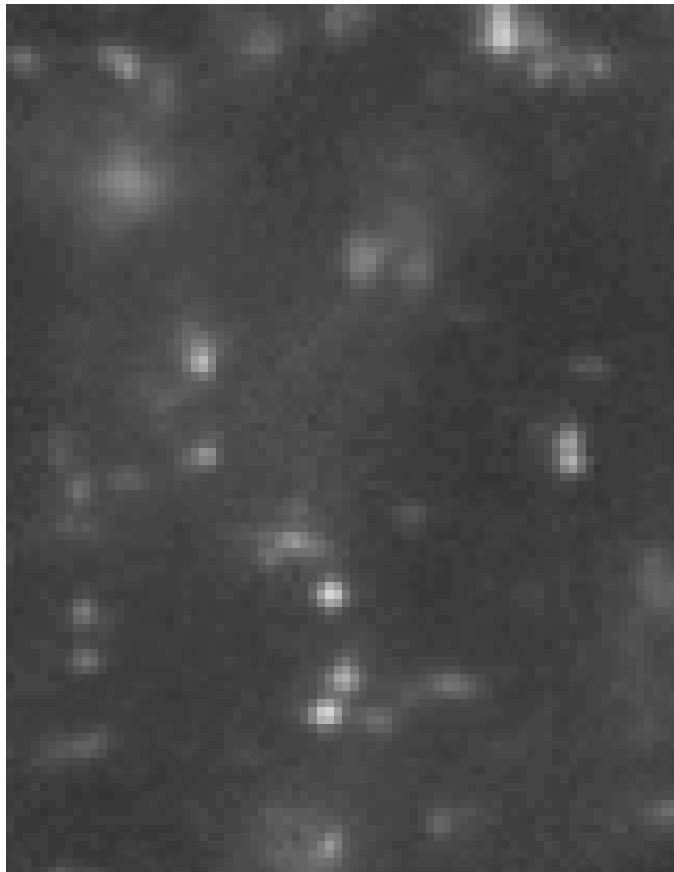


Fluorofór lokalizációs pontosság
6 nm (xy) és 41 nm (z) 5 μm mélyen az agyszövetben

Hogyan néz ki a STORM képalkotás?

Véletlenlenszerűen felvillanó
fluorofórok

CB₁-immunfestés

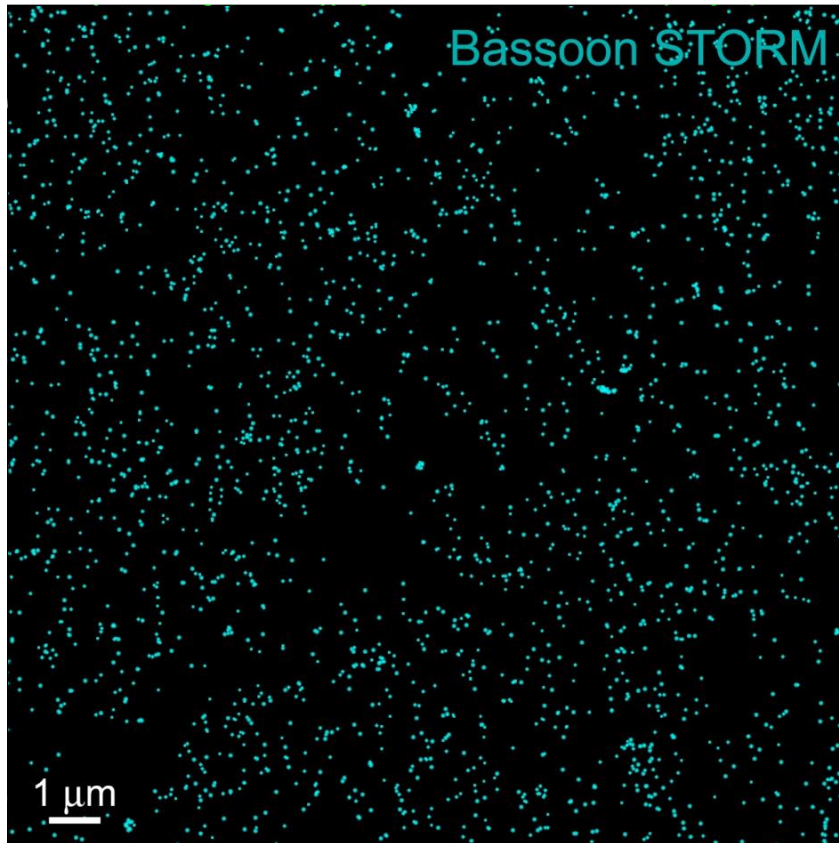


A centroidok 3D koordinátáinak
összegyűjtése egy képen

CB₁-pozitív GABAergic idegvégződések



Mit látunk...és mit nem láthatunk egy STORM képen?



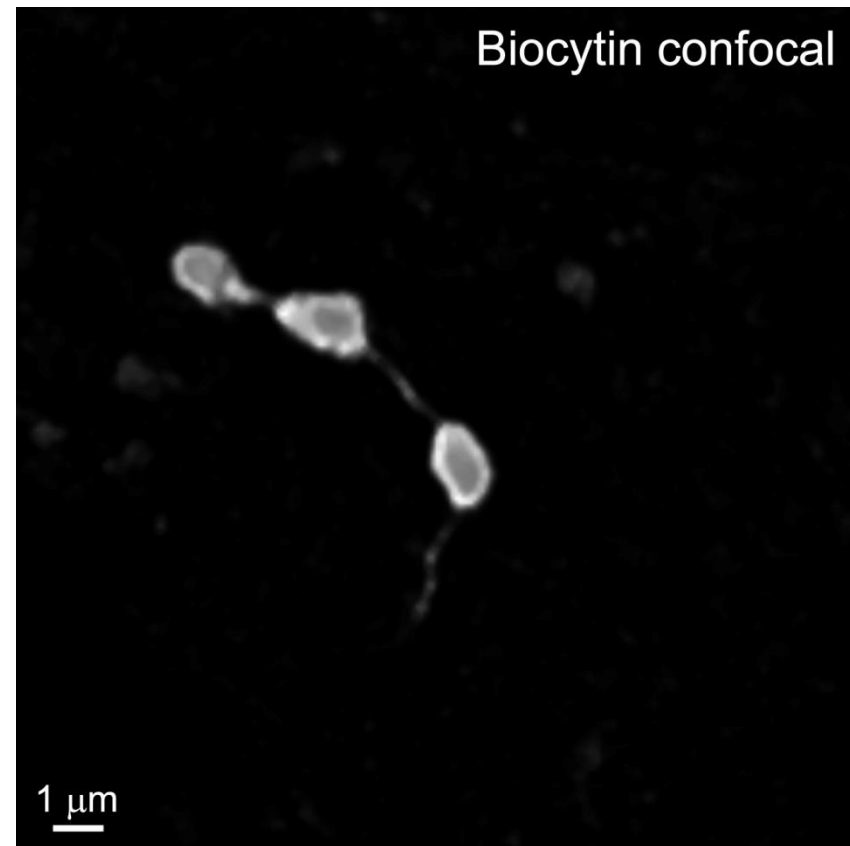
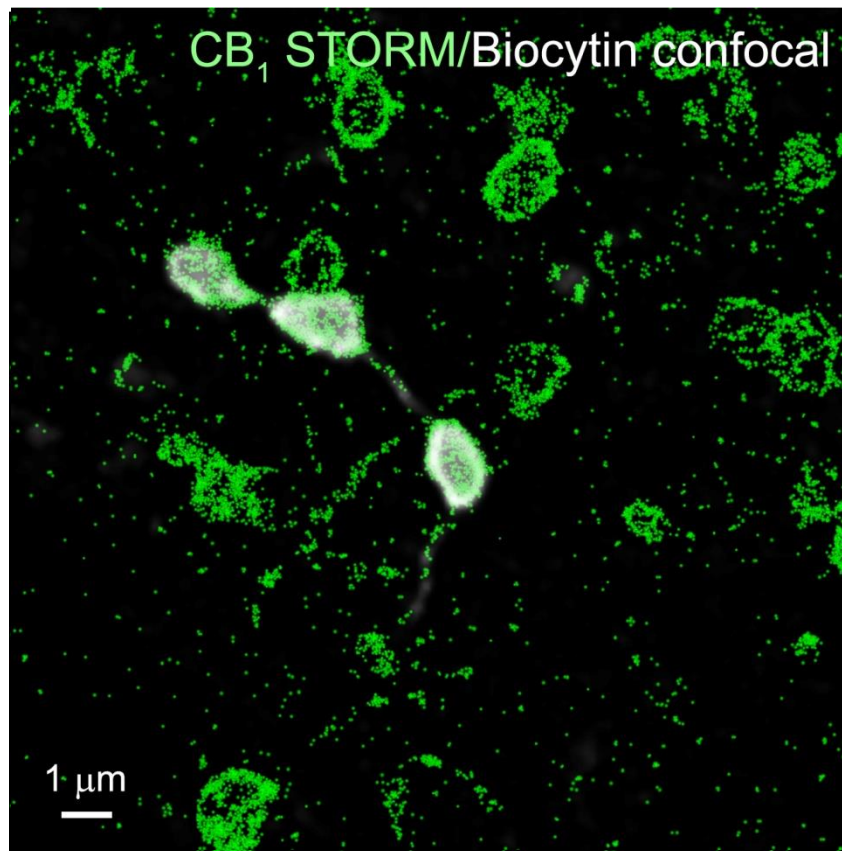
Bassoon immunofluoreszcencia a zégehippocampusban

Hogyan ismerjük fel...

» a sejtípusokat?

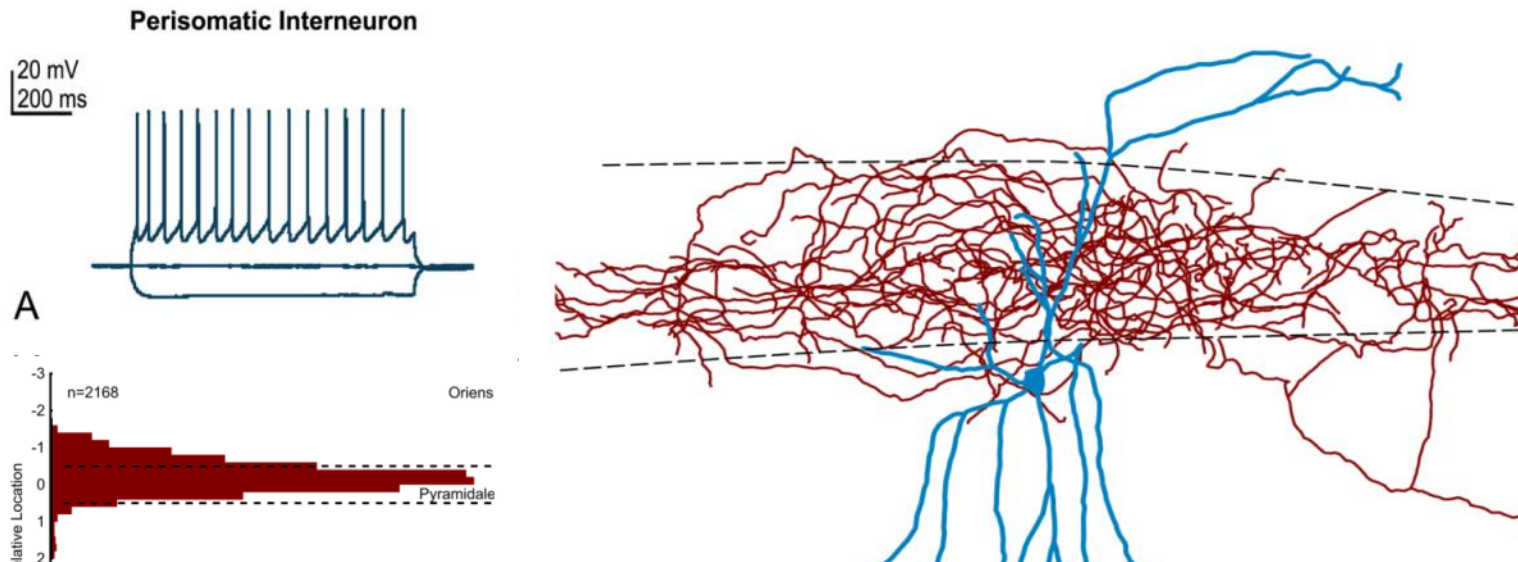
» a szubcelluláris kompartmentumokat?

A konfokális és STORM képalkotás kombinálása

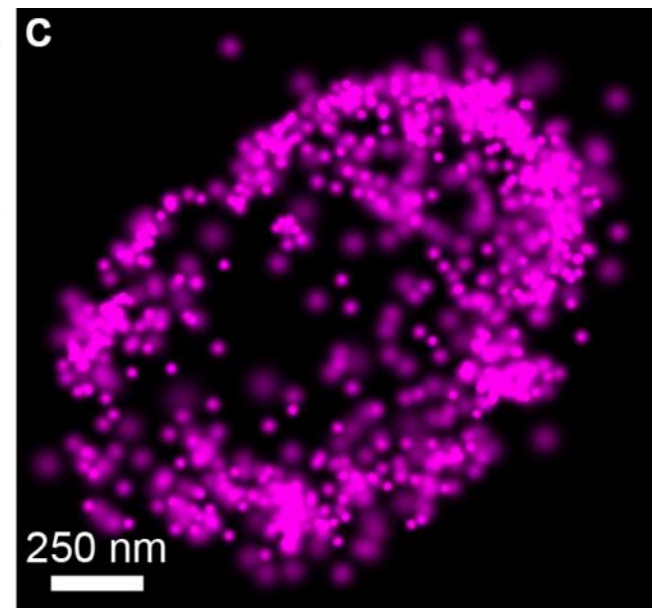
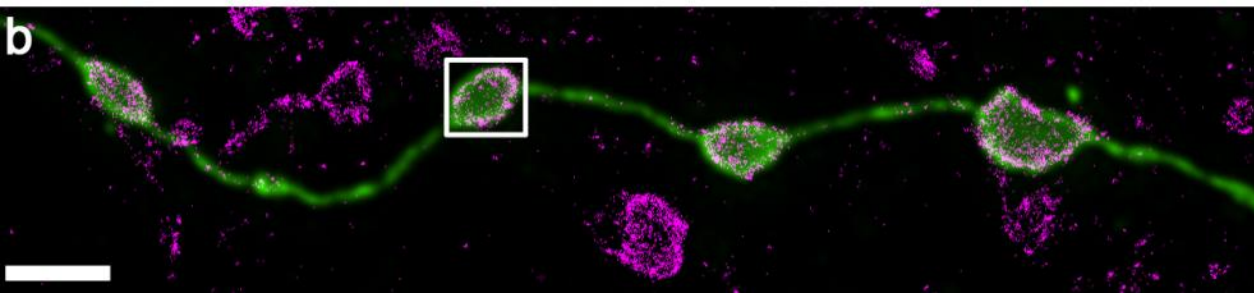
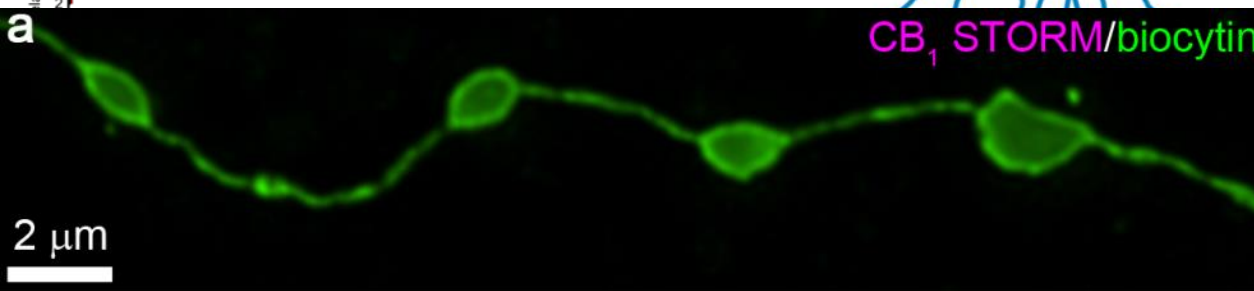


Korrelált konfokális and STORM képek egy biocytin-töltött CB₁-pozitív interneuron idegvégződéseiről

Élettani, anatómiai és molekuláris paraméterek sejt-specifikus mérése



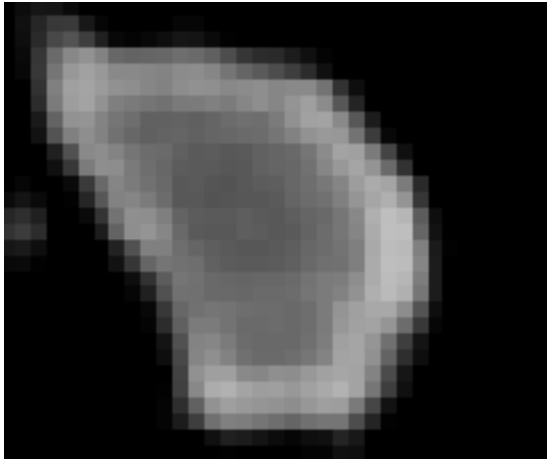
Dudok et al
(2015)
Nature
Neuroscience



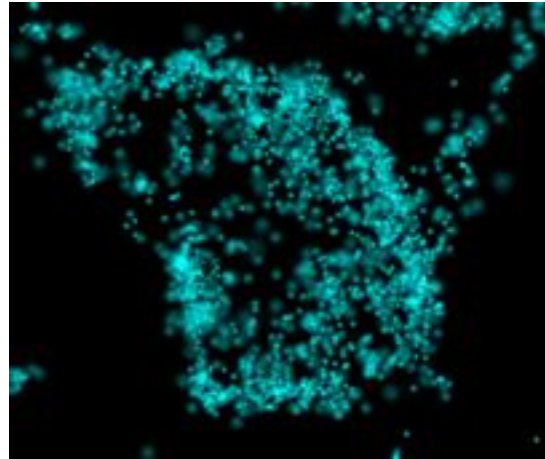
Hogyan elemezhető

a konfokális és STORM képek eltérő adatstruktúrája?

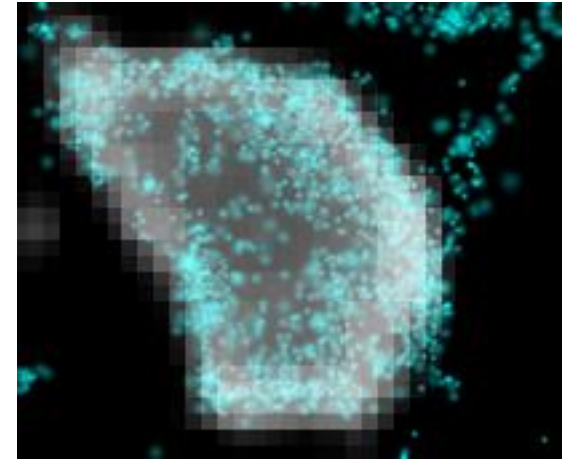
Biocytin konfokális kép (axonterminális)



CB₁ STORM



Illesztés



Szürkeárnyalat-érték

88	82	84	88	85	83	80	93	102
88	80	78	80	80	78	73	94	100
85	79	80	78	77	74	65	91	99
38	35	40	35	39	74	77	70	65
20	25	23	28	37	69	64	60	57
22	26	22	28	40	65	64	59	34
24	28	24	30	37	60	58	56	66
21	22	23	27	38	60	67	65	67
23	22	22	25	38	59	64	67	66

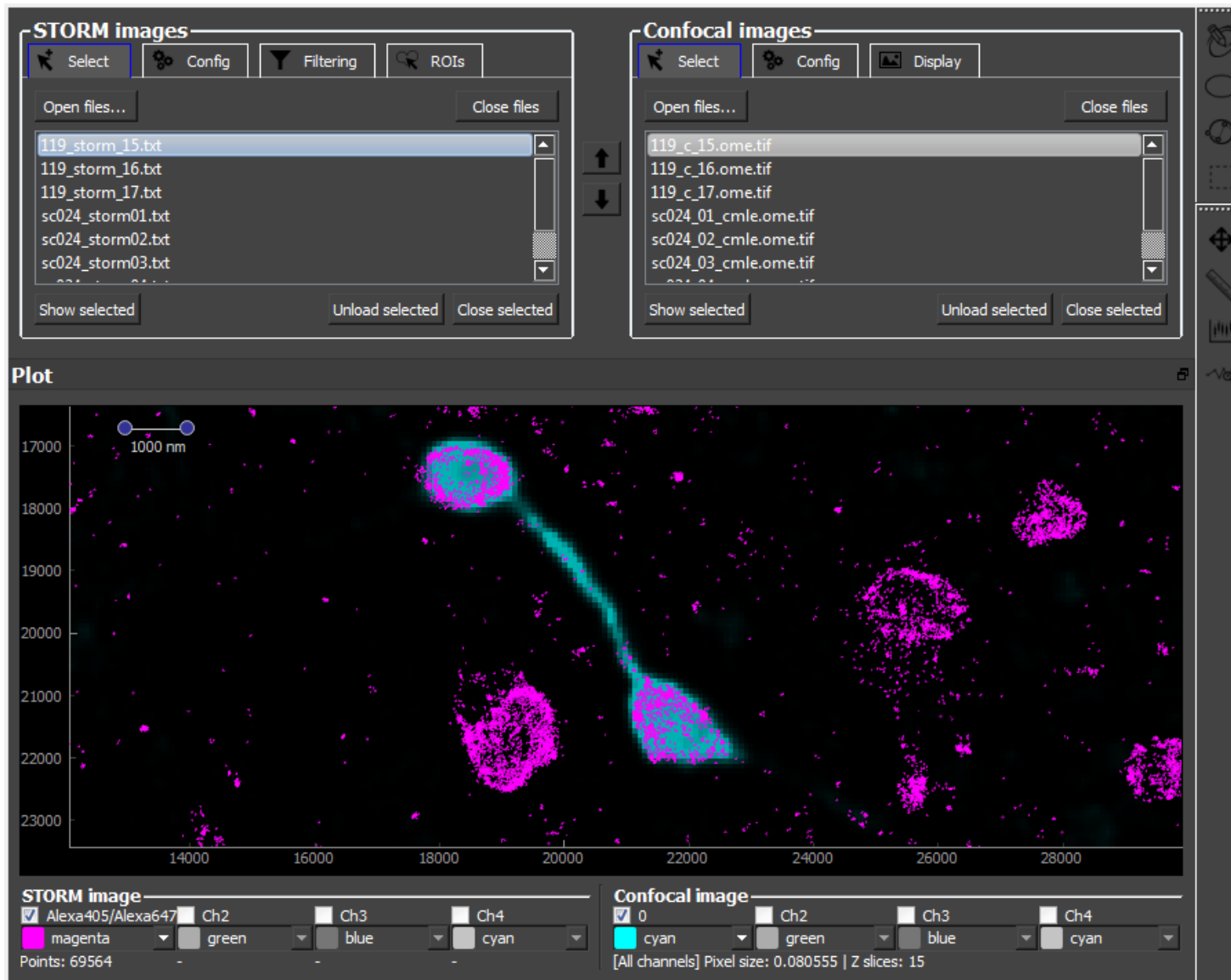
Pixel Y pozíció

Pixel X pozíció

Localization Point	X Position (nm)	Y Position (nm)	Z Position (nm)
1	14141.1	3362.6	311.0
2	25061.6	17269.6	-21.5
3	27605.4	18385.0	311.0
4	19978.5	18758.6	66.4
5	25639.4	22537.6	-241.2
6	9264.5	23590.7	311.0
7	23193.5	27231.3	144.0
8	20710.4	27909.1	178.4
9	24588.9	28181.5	311.0
10	30868.0	29253.7	-9.2
11	12964.6	29632.3	-241.2
12	16853.0	29715.9	-96.0
13	23595.6	33808.6	-229.5
14	20466.5	34943.1	298.6
15	9944.8	21210.3	-223.7



VividSTORM: Szabadon elérhető és fejleszthető szoftver a konfokális és szuper-rezolúciós képek kezelésére



Barna et al
(2016)
Nature Protocols

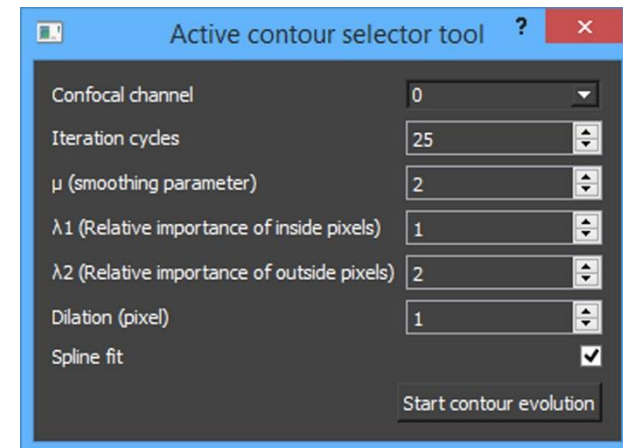
Automatizált független szegmentáció:

Az aktív kontúr algoritmus

Biocytin-töltött axonterminális



A releváns molekula lokalizációs pontok szűrése aktív kontúr algoritmussal



A VividSTORM adatok megjelenítésére és elemzésére egyaránt alkalmas

Dudok et al (2015)
Nature Neuroscience

Cluster analysis

DBSCAN

Eps (nm) Save all data

MinN Export in .pdb

Internalization

Distance from surface

Internalization distance calculation channel Threshold (nm) Save all data

Convex hull maker channel

Distance from center of mass

Internalization Distance calculation channel Save all data

Minimum distances

Eudidean, within channel

Save all data

Eudidean, between channels

Minimum distance of points of channel Save all data

From channel

Surface, between channels

Convex hull maker channel Distance limit from convex hull (nm) Save all data

Reference hull maker channel Export in .pdb

Distance calculation channel

Surface Density

Measure surface density

Convex hull maker channel Sampling density (NLP/ μm^2) Save all data

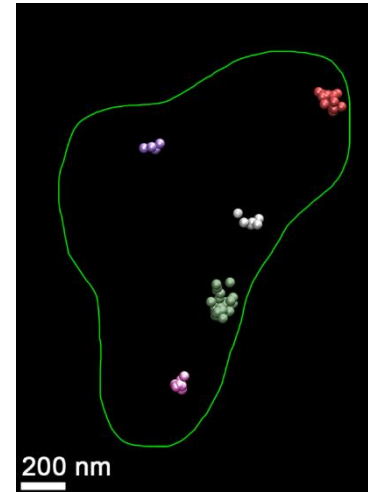
Density calculation channel Density probe radius (nm)

Measure surface density distribution relative to reference

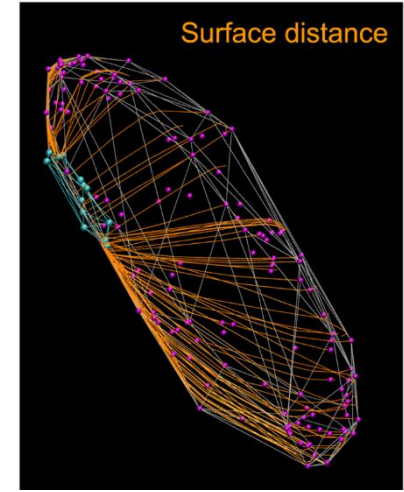
Convex hull maker channel Sampling density (NLP/ μm^2) Save all data

Density calculation channel Density probe radius [nm]

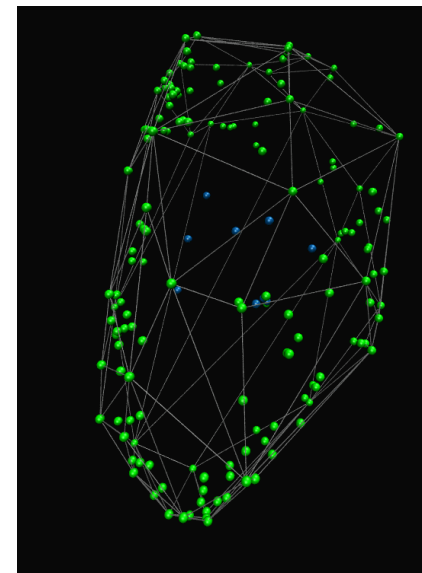
Reference channel



Klaszteranalízis



Molekuláris
távolságmérések

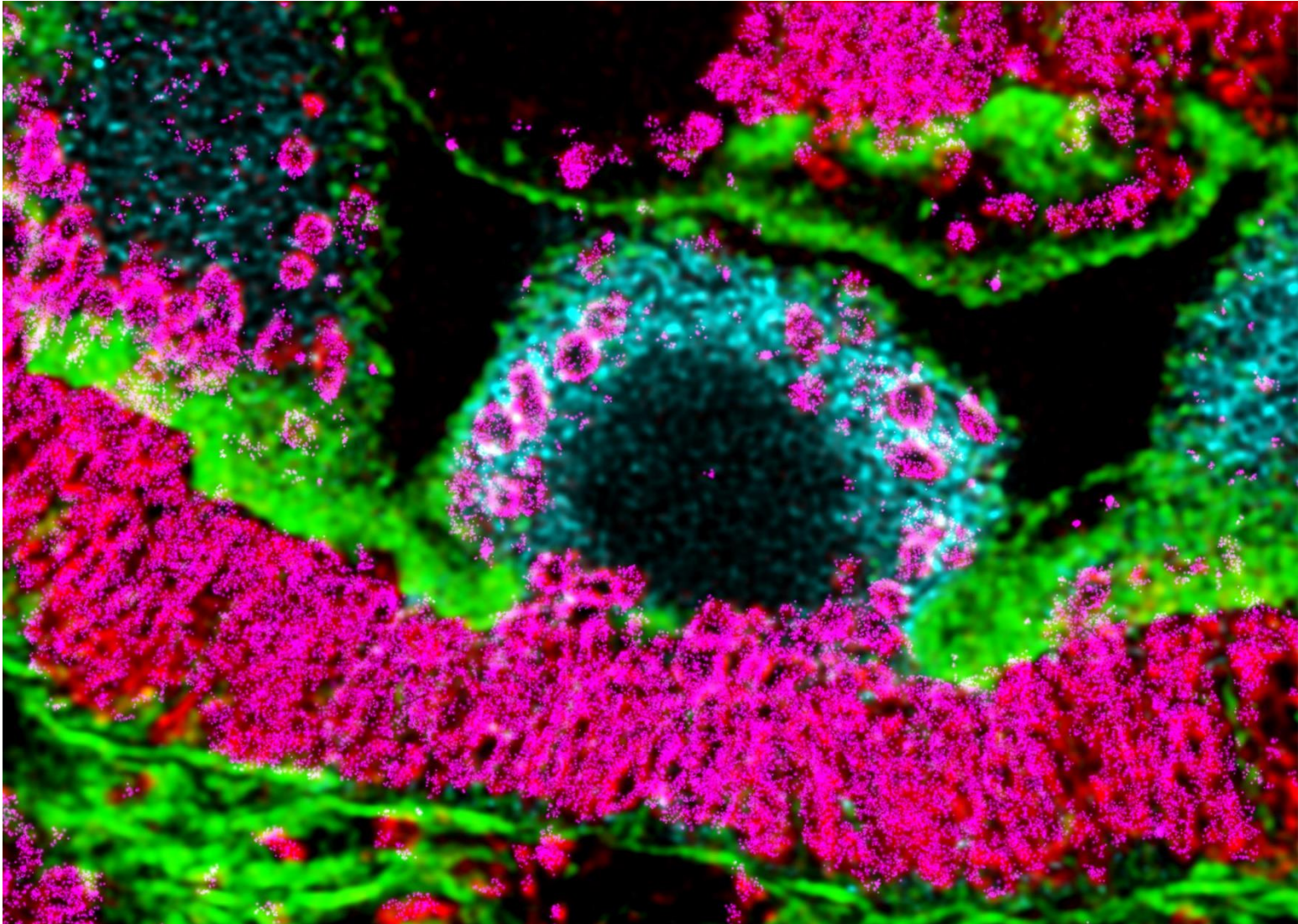


Internalizációs
mérések

Lee et al (2015)
Journal of Neuroscience

Barna et al (2016) Nature Protocols

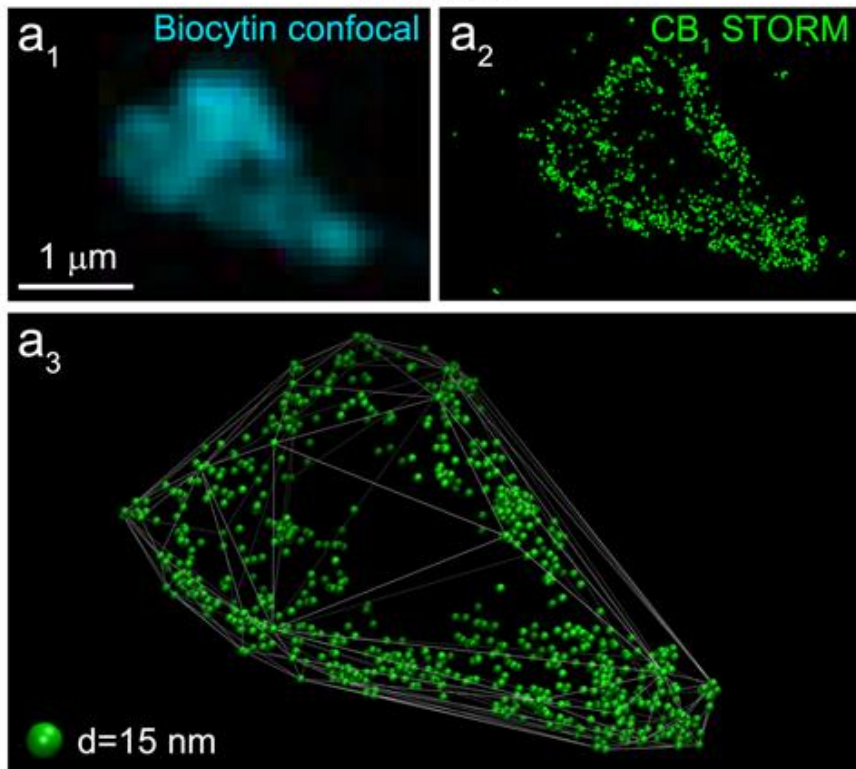
A VividSTORM alkalmazása más szövetekben: Parvalbumin-pozítív sejtek kérgi nephronokban





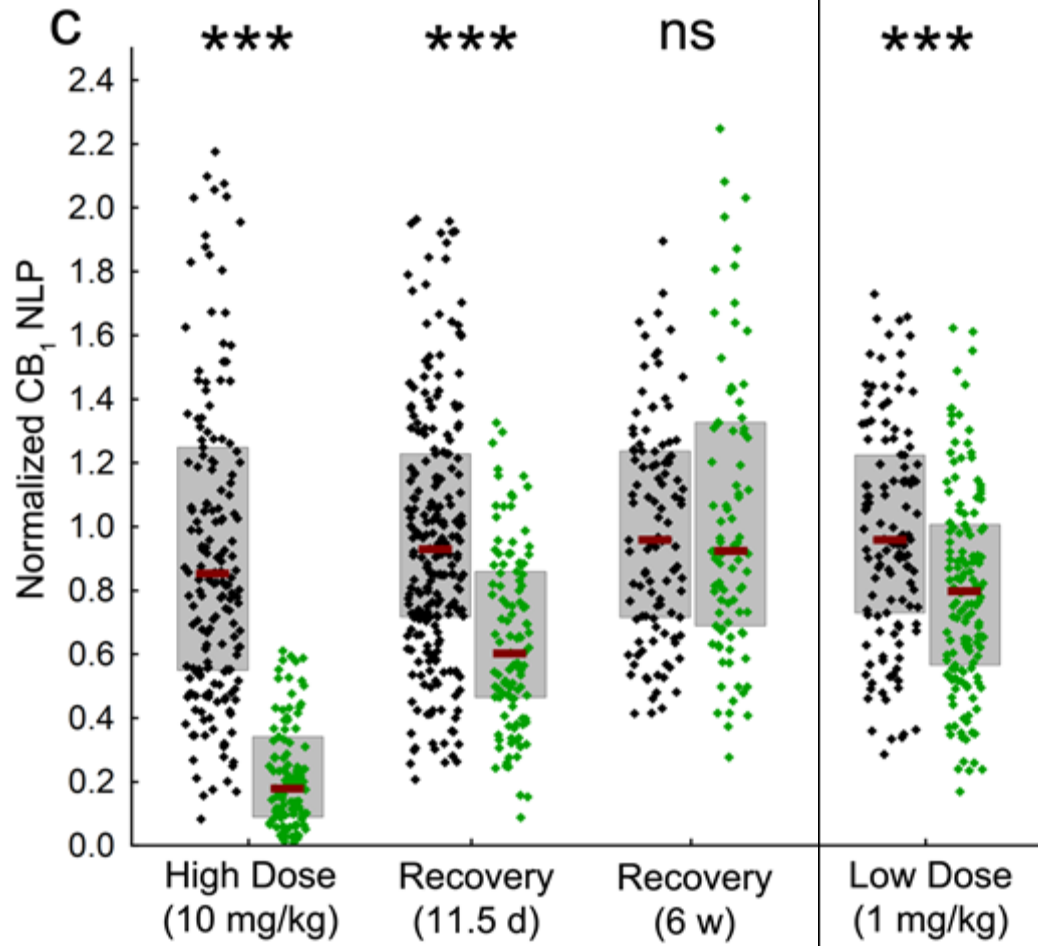
Molekuláris változások mérése: a kannabinoid tolerancia jelensége

Vehicle



Hat napig tartó THC kezelés jelentős receptorszint
csökkenést okoz az idegvégződéseken

A receptorszint csökkenés koncentrációfüggő és lassan áll helyre

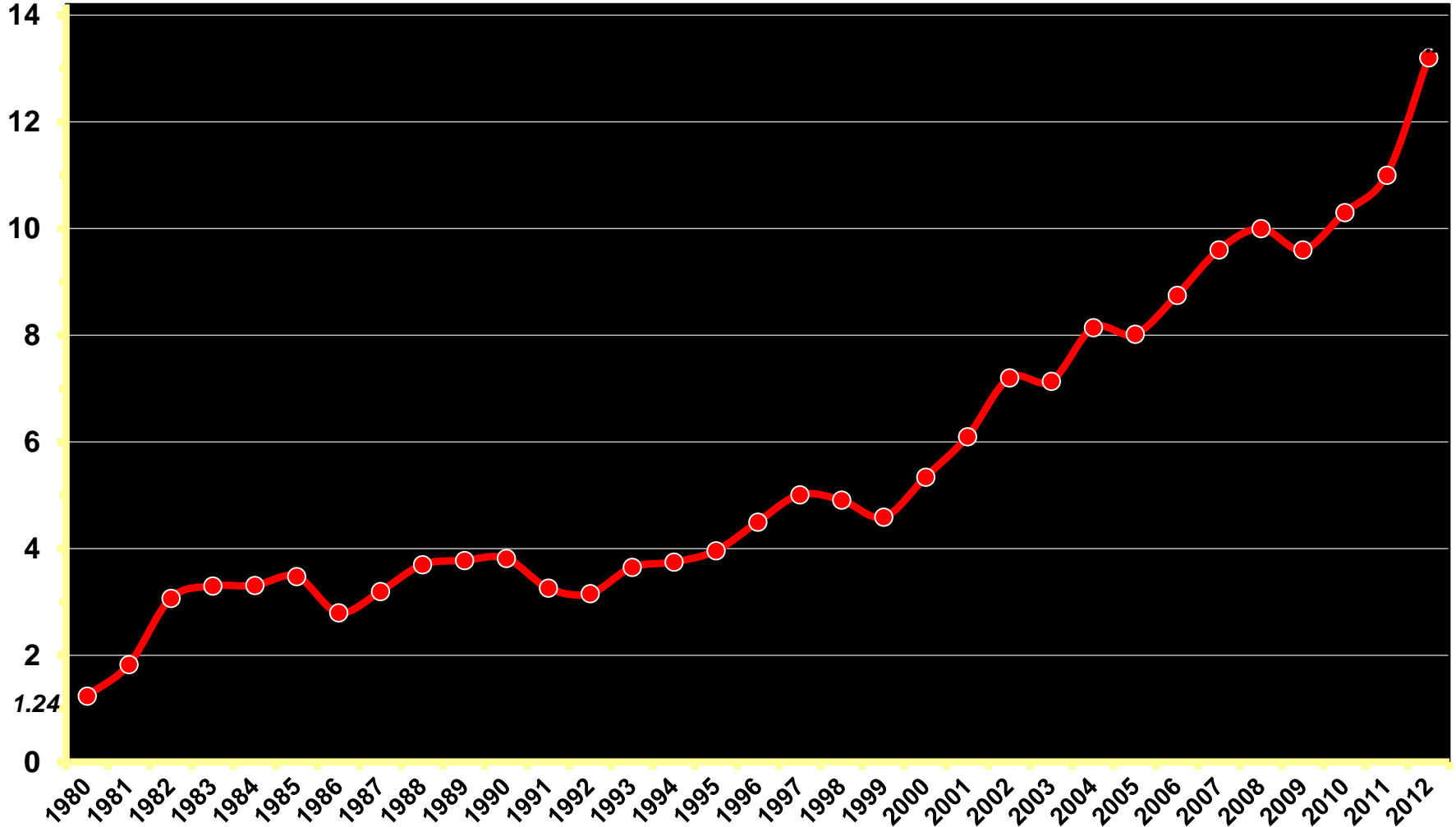


- Drámai 75%-os CB_1 csökkenés (élvezeti konc: 100ng/ml)
- 11 nap után 50%-os javulás
- Teljes helyreállítás 6 hét után
- Csekély 16%-os CB_1 csökkenés (terápiás konc: 10 ng/ml)

Lefoglalt kannabiszminták THC-tartalmának változása

USA (1980-2012)

THC tartalom
% (GC)



ElSohly MA et al: *J Forensic Sci* 45, 24 (2000); *Marijuana Potency Monitoring Project*, 2013

Összefoglalás

A retrográd endokannabinoid jelpálya alapvető alkotóeleme a kémiai szinapszisoknak

Mennyiségi és térbeli átrendeződése nanométeres tartományokban fontos szerepet játszhat neurológiai és pszichiátriai betegségekben

A konfokális képalkotás kombinálása super-rezolúciós mikroszkópiával és a VividSTORM szoftver lehetővé teszi a sejttípus-specifikus molekuláris változások mérését

A THC kezelés dózis-függő módon csökkenti a CB_1 szintet, amely meglepően lassan áll helyre

Köszönetnyilvánítás



Marco Ledri

Barna László

Chris Henstridge

Dudok Barna



Köszönetnyilvánítás II.

MTA KOKI
Freund Tamás

ELTE
Kacs Kovics Imre
Cervenák Judit

PPKE
Horváth András

Rényi Intézet
Matolcsi Máté

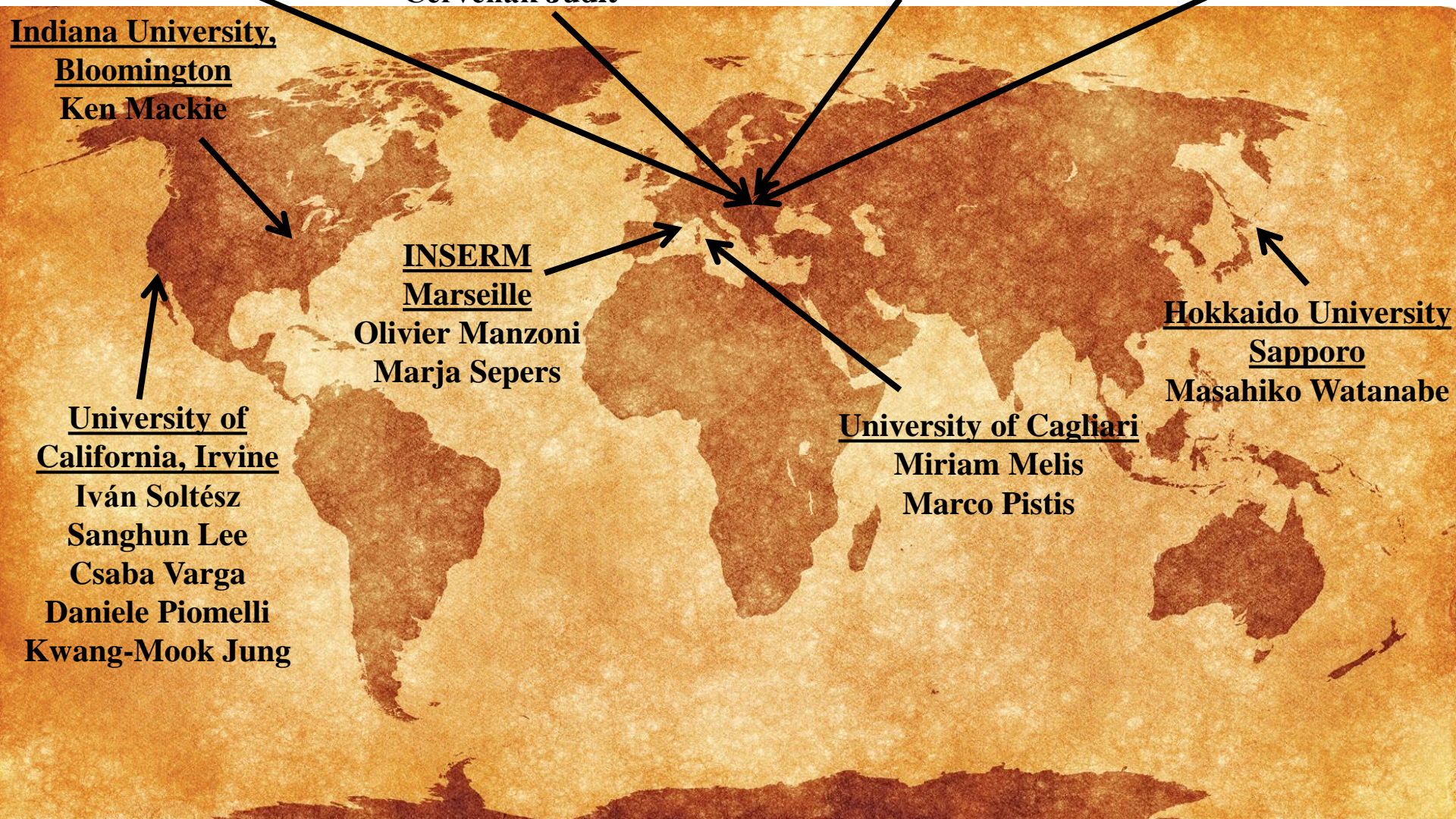
Indiana University,
Bloomington
Ken Mackie

INSERM
Marseille
Olivier Manzoni
Marja Sepers

Hokkaido University
Sapporo
Masahiko Watanabe

University of
California, Irvine
Iván Soltész
Sanghun Lee
Csaba Varga
Daniele Piomelli
Kwang-Mook Jung

University of Cagliari
Miriam Melis
Marco Pistis



Lendület
program



Köszönöm szépen a figyelmet!

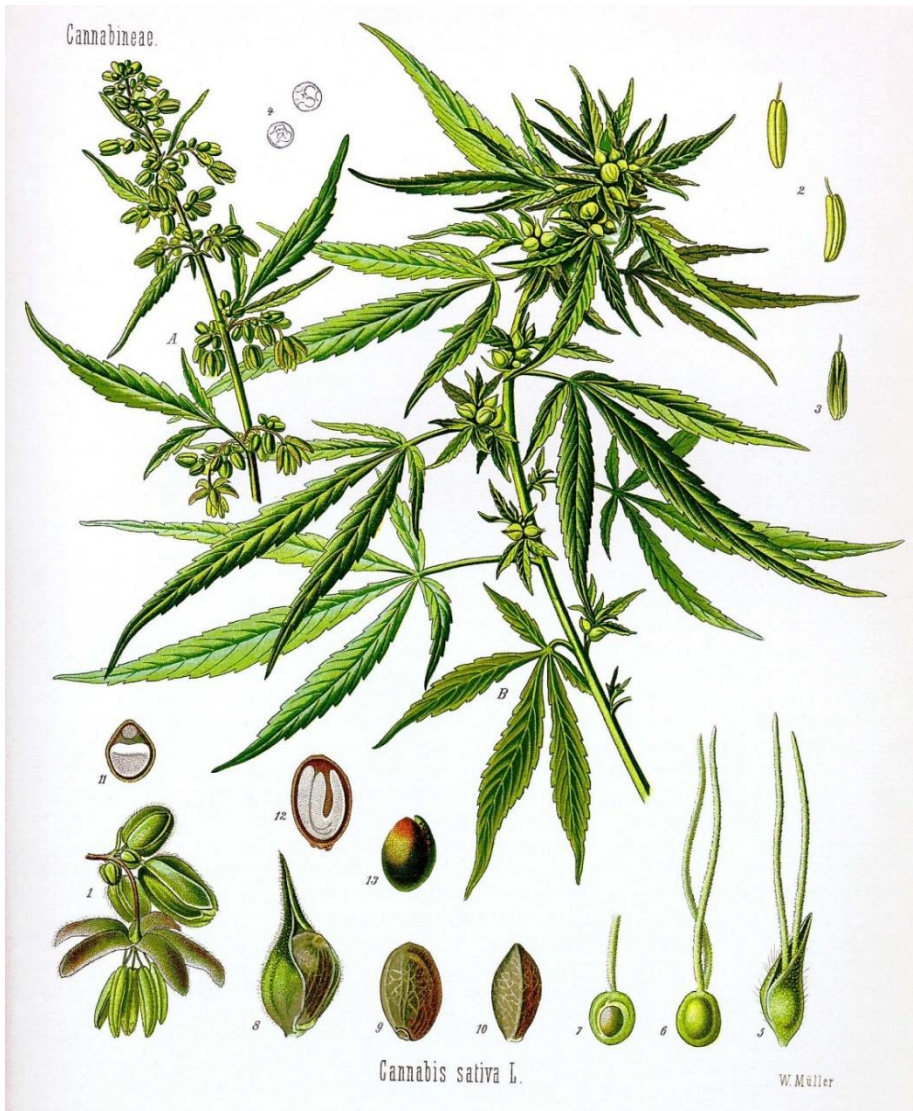


wellcome trust





A kannabisz az egyik legősibb gyógynövényünk



Cannabis sativa, Franz Eugen Köhler's *Medizinal-Pflanzen* című könyvéből, amely 1887-ben jelent meg. W. Müller alkotása.

Shen Nong (ie. ~2700)

Retrográd endokannabinoid jelátvitel

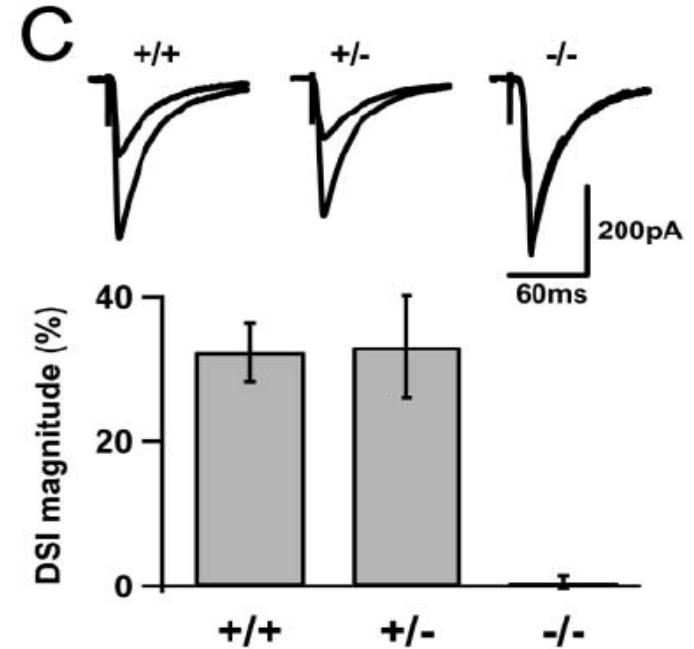


Patch-clamp elektródás
élettani mérés

Kreitzer and Regehr
(2001) Neuron

Ohno-Shosaku et al
(2001) Neuron

Wilson and Nicoll
(2001) Nature

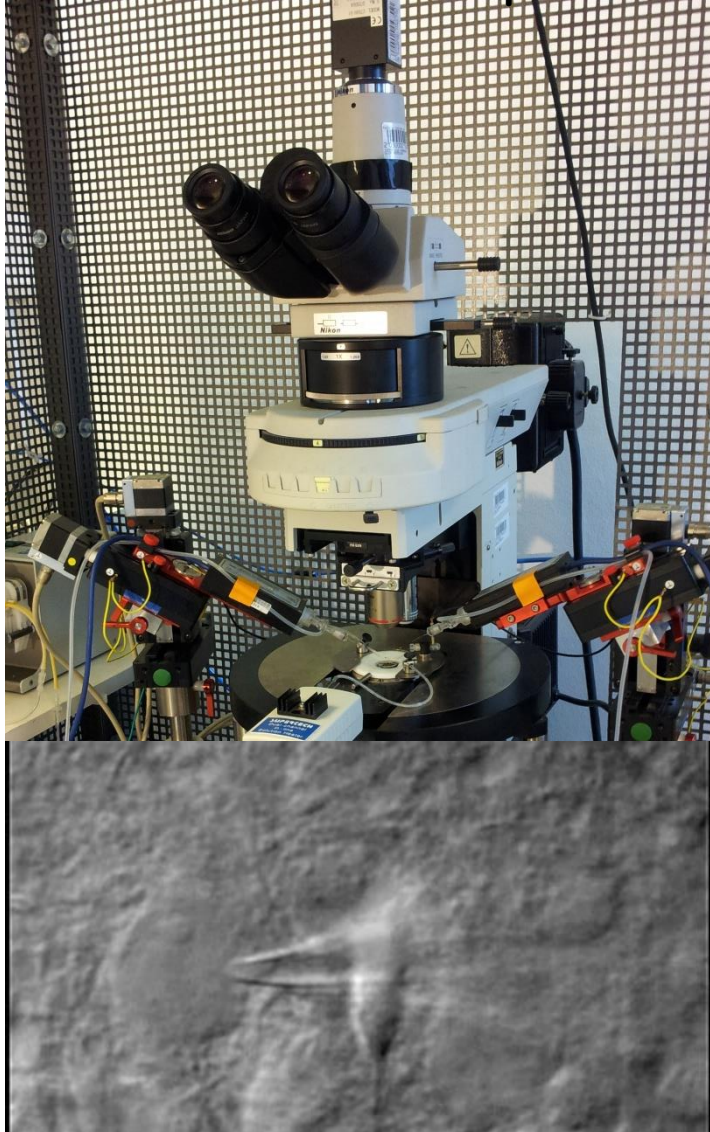


**A CB_1 receptor szükséges
retrográd szinaptikus jelátvitelhez**

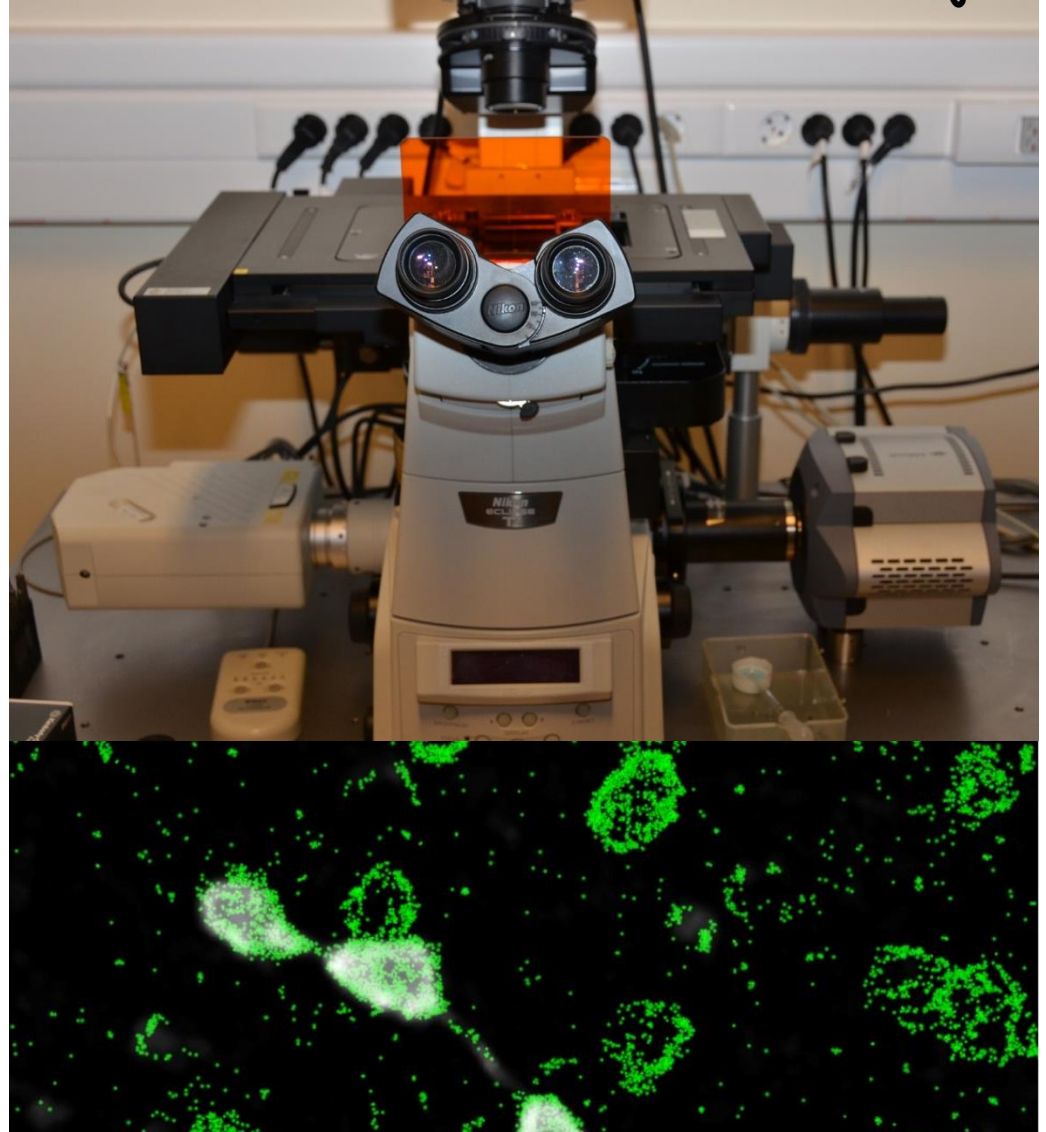
**Hogyan épül fel és működik a szinaptikus
endokannabinoid jelpálya?**

A patch-clamp elektrofiziológia, konfokális mikroszkópia és a STORM szuper-rezolúciós képalkotás kombinálása

FN1 Patch-Clamp



Nikon N-STORM + C2 konfokális fej



A sejt-típus-specifikus STORM képalkotás előnyei

Rendkívül gyors:

1. nap: Patch-clamp élettani kísérletek
3. nap: Morfológiai analízis konfokális mikroszkópiával
5. nap: Molekuláris nanoskálájú képalkotás STORM mikroszkópiával



10

MOST COMMON HEALTH SIDE EFFECTS OF USING MARIJUANA



Marijuana is commonly known as chronic, pot or hash and is consumed either by eating, smoking or by soaking it in tea. Whether the human body is exposed to this plant in small or large quantities, side effects are a sure fall out. Side effects of using marijuana vary from the simple increase in appetite to much graver threats like lung cancer. Let us explore what marijuana is capable of doing to the human body.

THE SIDE EFFECTS OF MARIJUANA ARE:

1. EFFECTS ON THE REGULATORY SYSTEM IN THE BRAIN:

The drug affects the chemical balance in the regulatory system and the pleasure centre of the brain. This imbalance in turn makes adaptation to changes slower and starts affecting things like memory and learning ability.



2. DEPRESSION

This symptom is a vicious cycle as the person soon finds him or herself using the drug to get rid of the depression that has been caused by the drug in the first place.



3. WITHDRAWAL AND OBSESSIVENESS

Marijuana users also suffer from severe withdraw symptoms when the drug is not accessible to them. They often have cravings that are uncontrollable and these can lead to results that are damaging.



4. PHYSICAL PROBLEMS

Constant use of the drug increase the breathing, heart and blood rate thus leading to taxing of the body. This in turn leads to the speeding up of the aging and hence increases the risks of cancer of the lungs, strokes and heart attacks.



A kannabisz kockázatai

Akut paranoid pszichotikus zavar

Skizofrénia spektrum betegség

Bipoláris zavarok

Demotivációs szindróma

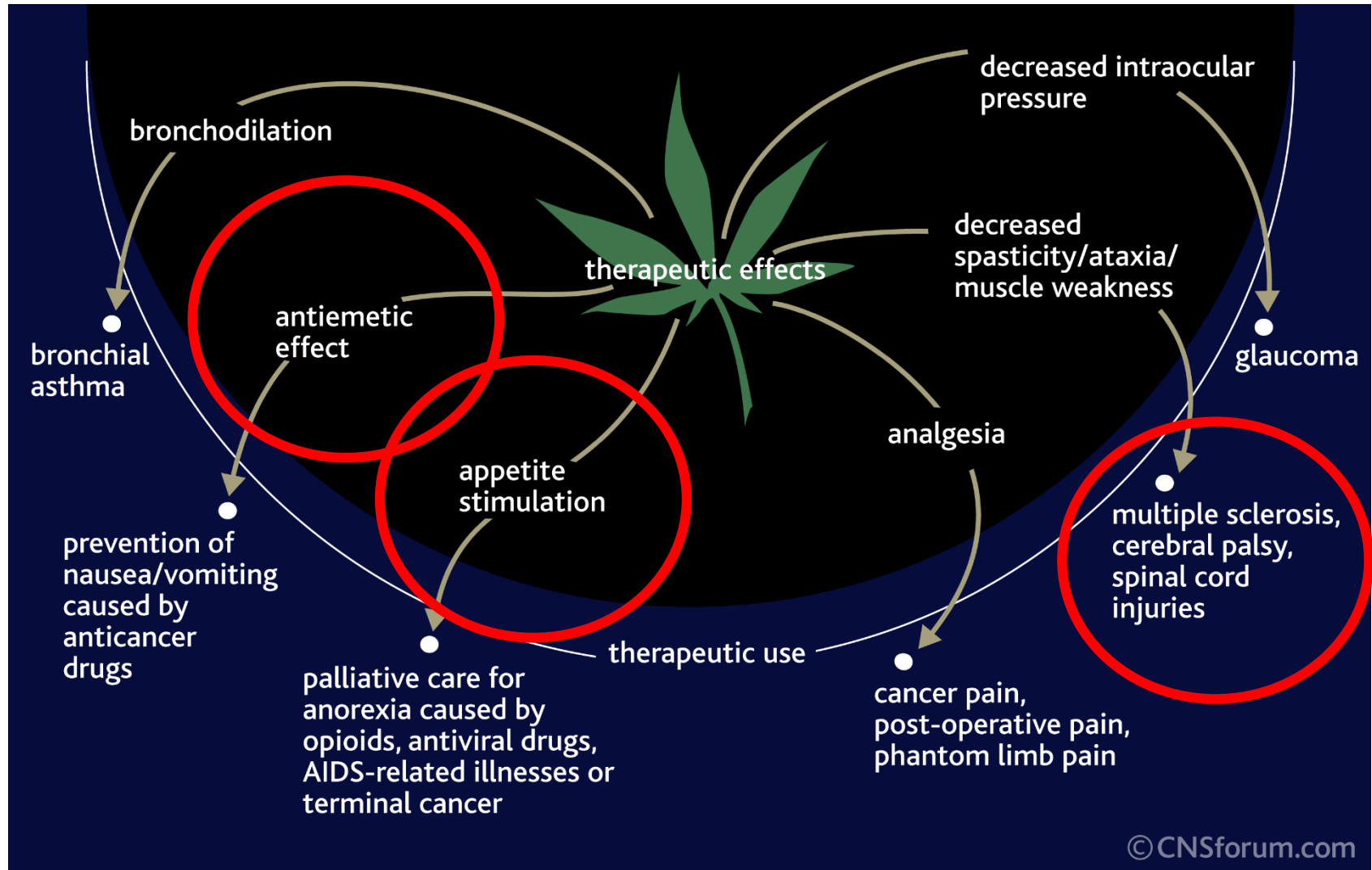
Kognitív képességek romlása

Tanulási és memóriefolyamatok zavara

Epilepsziás rohamok

Infarktus

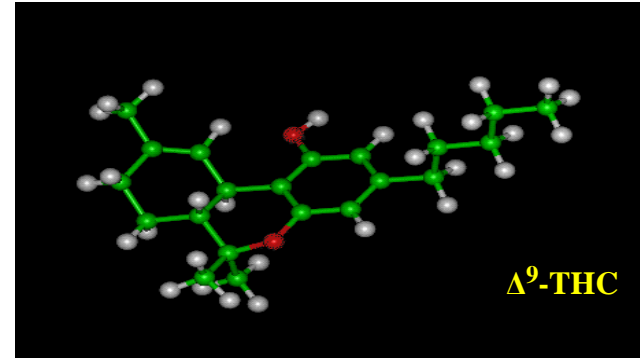
A kannabisz terápiás jelentősége



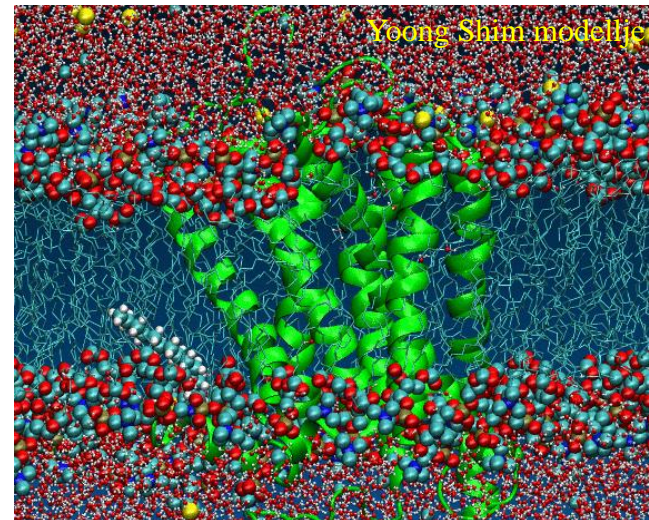
Az endokannabinoid rendszer



Cannabis sativa, Franz Eugen Köhler's *Medizinal-Pflanzen* című könyvéből, amely 1887-ben jelent meg. W. Müller alkotása.

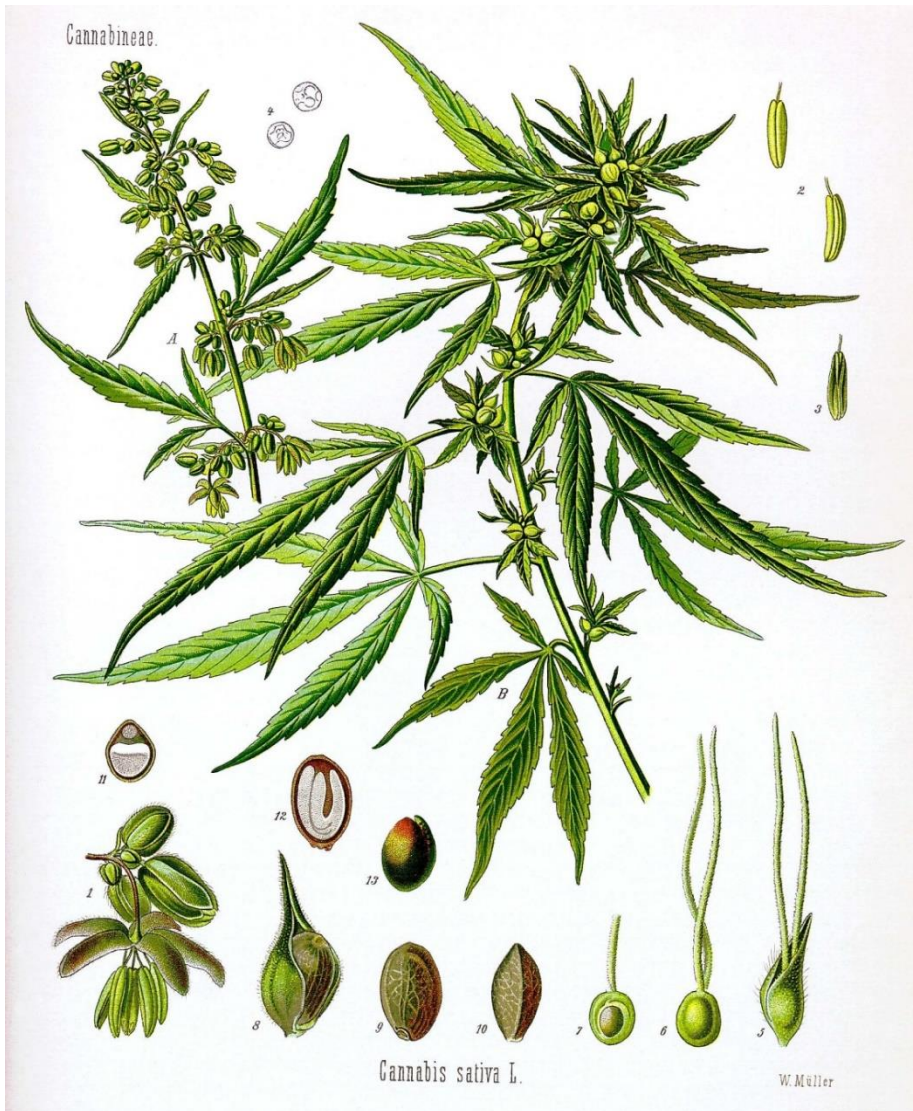


Raphael Mechoulam fedezte fel
1964-ben



Allyn Howlett igazolta
a CB₁ kannabinoid receptor
létezését 1988-ban

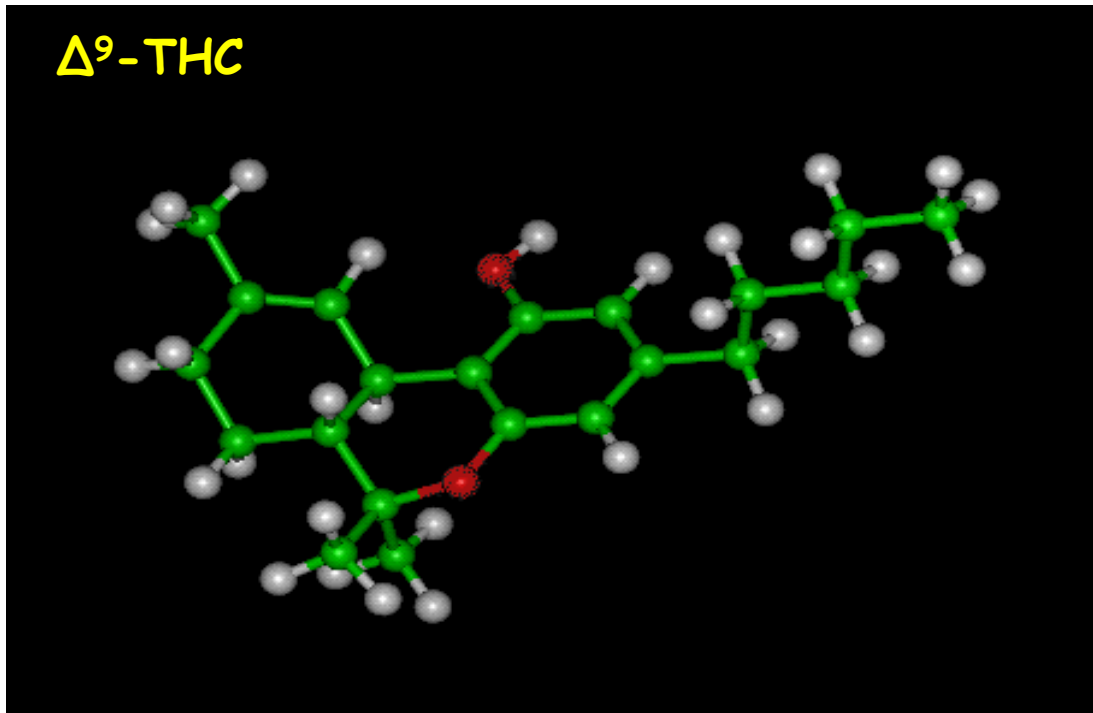
A kannabisz az egyik legősibb gyógynövényünk



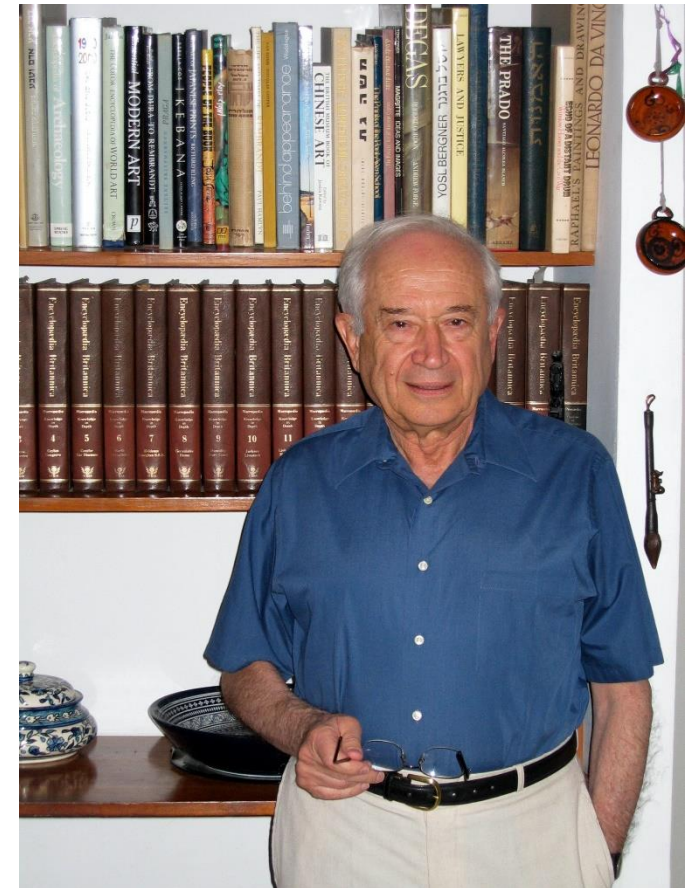
Cannabis sativa, Franz Eugen Köhler's *Medizinal-Pflanzen* című könyvéből, amely 1887-ben jelent meg. W. Müller alkotása.

Shen Nong (ie. ~2700)

Miért ilyen összetett hatású a kannabisz?



THC (Δ^9 -tetrahydrokannabinol)
a pszichoaktív kannabinoid



Raphael Mechoulam fedezte fel 1964-ben