

CB₁ kannabinoid receptorok szubcelluláris eloszlásának vizsgálata korrelált konfokális és szuperrezolúciós STORM képalkotás felhasználásával

XXXII. OTDK Biológia Szekció

Készítette:

Miczán Vivien

PPKE – ITK

Orvosi biotechnológia MSc

II. évf.

Témavezető:

Dr. Katona István

MTA – KOKI

Belső konzulens:

Dr. Horváth András

PPKE – ITK



2014

Tartalomjegyzék

1. Rövidítésjegyzék	4
2. Összefoglalás	6
3. Bevezetés	7
3. 1. A szinaptikus endokannabinoid jelpálya	7
3. 2. A CB ₁ receptorok eloszlása	9
3. 3. A szuperrezolúciós mikroszkópia lehetőségei a molekuláris neuroanatómiában....	10
3. 4. A STORM képalkotás.....	12
3. 5. Vizualizációs és analízis eszközök STORM szuperrezolúciós mikroszkópiához ...	15
3. 6. Célkitűzés.....	16
4. Anyag és módszer.....	17
4. 1. Perfúzió és metszetek készítése	17
4. 2. Immunfestés.....	17
4. 3. Kombinált konfokális/STORM képalkotás	18
4. 4. Kombinált konfokális/STORM képfeldolgozás	19
4. 5. Intrazsinaptikus - extraszinaptikus sűrűséganalízis	19
4. 6. Statisztikai analízis és ábrakészítés.....	20
4. 7. A korrelációs szoftverben használt speciális algoritmusok	21
4. 7. 1. Aktív kontúr	21
4. 7. 2. Alternatív eszközök STORM koordináták megjelenítésére.....	22
5. Eredmények és értékelésük	24

5. 1. A korrelációs szoftver funkcióinak bemutatása	24
5. 1. 1. A STORM koordináták megjelenítése	25
5. 1. 2. Konfokális és STORM adatok korrelált megjelenítése.....	25
5. 1. 3. Korrelált konfokális és STORM adatok sejttípus- és szubcelluláris domén- specifikus analízise	27
5. 1. 4. STORM adatok három dimenziós megjelenítése.....	28
5. 1. 5. STORM z-tömbök feldolgozása és megjelenítése	29
5. 1. 6. A Delaunay-háromszögelés felhasználása STORM adatok vizualizációjára ..	31
5. 1. 7. Könnyen kezelhető grafikus felhasználói felület	31
5. 2. CB ₁ receptorok eloszlásának analízise hippocampusz CA1 piramisrétegében	33
5. 2. 1. A CB ₁ receptorok száma korrelál az axonvégződés méretével.....	36
5. 2. 2. CB ₁ receptorok szubcelluláris kompartmentsspecifikus sűrűségének összehasonlítása	37
5. 3. Az eredmények értékelése	38
5. 3. 1. Szoftver fejlesztése STORM és konfokális adatok korrelált elemzésére.....	38
5. 3. 2. A CB ₁ receptorok szubcelluláris eloszlásának vizsgálata	39
6. Köszönetnyilvánítás	41
7. Szerzői hozzájárulás	42
8. Irodalomjegyzék	43

1. Rövidítésjegyzék

Rövidítés	Angol/latin elnevezés	Magyar elnevezés
2-AG	2-Arachidonoylglycerol	2-arachidonoilglicerol
APD	Avalanche Photodiode	lavina fotodióda
CA	Cornu Ammonis	Ammon-szarv, a hippocampusz része
CB₁	Cannabinoid Receptor Type-1	1-es típusú kannabinoid receptor
CCD	Charge Coupled Device	töltéscsatolt eszköz
CCK	Cholecystokinin	cholecystokinin
DAG	Diacylglycerol	diacilglicerol
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole	4,6-diamino-2-fenilindol
DGL-α	Diacylglycerol Lipase- α	diacilglicerol-lipáz- α
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein	zöld fluoreszcens protein
EMCCD	Electron Multiplying Charge Coupled Device	elektronsokszorozó töltés-csatolt eszköz
GLU	Glutamate	glutaminsav
HEK	Human Embryonic Kidney	humán embrionális vese
IP₃	Inositol Trisphosphate	inozitol-triszfoszfát
MACWE	Morphological Active Contours Without Edges	élmentes morfológiai aktív kontúrok
MGL	Monoacylglycerol Lipase	monoacilglicerol-lipáz
mGluR	Metabotrope Glutamate Receptor	metabotróp glutamát receptor
NLP	Number of Localization Points	lokalizációs pontok száma
NMDA	N-methyl-D-aspartate	N-metil-D-aszpartát
PALM	Photoactivated Localization Microscopy	fotoaktivációs lokalizációs mikroszkópia
PB	Phosphate Buffer	foszfát puffer
PFA	Paraformaldehyde	paraformaldehid
PFS	Perfect Focus System	fókuszstabilizáló rendszer
PIP₂	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate	foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát
PLC-β	Phospholipase C- β	foszfolipáz C- β
PMT	Photomultiplier Tube	fotoelektron-sokszorozó
PSD	Postsynaptic Density	posztzinaptikus denzitás
PSF	Point Spread Function	pontválasz függvény
PSM	Perisynaptic Signaling Machinery	periszinaptikus jelátviteli rendszer
SIM	Structured Illumination Microscopy	strukturált megvilágítás mikroszkópia
STED	Stimulated Emission Depletion Microscopy	stimulált emisszió depléción mikroszkópia

STORM	STochastic Optical Reconstruction Microscopy	sztochasztikus optikai rekonstrukciós mikroszkópia
TBS	Tris-buffered Saline	Tris puffer fiziológiás sóval
THC	Delta-9-Tetrahydrocannabinol	delta-9-tetrahidrokannabinol
TIRF	Total Internal Reflection Fluorescence	teljes belső visszaverődés fluoreszcencia
VGlut	Vesicular Glutamate Transporter	vezikuláris glutamát transzporter
VIP	Vasoactive Intestinal Polypeptide	vazoaktív intesztinális polipeptid

6. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni a munkám során nyújtott sok segítséget és útmutatást Dr. Katona Istvánnak, Dudok Barnának, Barna Lászlónak, Pintér Baláznak, Tischler Erikának, valamint az MTA-KOKI Molekuláris Neurobiológiai Kutatócsoportjának további tagjainak az általuk nyújtott ismeretekért és inspirációért. A Python szoftver fejlesztéséhez nagyon hasznos tanácsokat kaptam Dr. Horváth Andrástól, ezúton is köszönöm. A CB₁ immunfestéshez használt antitestet Masahiko Watanabe (Hokkaidói Egyetem, Sapporo, Japán) biztosította.

7. Szerzői hozzájárulás

A szerző a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül:

- az agyak beágyazását,
 - az agyak metszését
 - az immunfestéseket
 - a szeletek fedőlemezre való kirakását
 - a STORM és konfokális képalkotást
 - a STORM és konfokális képfeldolgozást
 - a statisztikai analízist és ábrakészítést
 - a korrelációs szoftver fejlesztését
- végezte el.

8. Irodalomjegyzék

- [1] P. Pacher, S. Batkai, and G. Kunos, "The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy," *Pharmacol Rev*, vol. 58, pp. 389-462, Sep 2006.
- [2] I. Katona, B. Sperlagh, A. Sik, A. Kafalvi, E. S. Vizi, K. Mackie, *et al.*, "Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons," *J Neurosci*, vol. 19, pp. 4544-58, Jun 1 1999.
- [3] I. Katona, G. M. Urban, M. Wallace, C. Ledent, K. M. Jung, D. Piomelli, *et al.*, "Molecular composition of the endocannabinoid system at glutamatergic synapses," *J Neurosci*, vol. 26, pp. 5628-37, May 24 2006.
- [4] A. I. Gulyas, B. F. Cravatt, M. H. Bracey, T. P. Dinh, D. Piomelli, F. Boschia, *et al.*, "Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala," *Eur J Neurosci*, vol. 20, pp. 441-58, Jul 2004.
- [5] D. Piomelli, "The molecular logic of endocannabinoid signalling," *Nat Rev Neurosci*, vol. 4, pp. 873-84, Nov 2003.
- [6] R. I. Wilson and R. A. Nicoll, "Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses," *Nature*, vol. 410, pp. 588-92, Mar 29 2001.
- [7] A. Tanimura, M. Yamazaki, Y. Hashimoto, M. Uchigashima, S. Kawata, M. Abe, *et al.*, "The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol produced by diacylglycerol lipase α mediates retrograde suppression of synaptic transmission," *Neuron*, vol. 65, pp. 320-7, Feb 11 2010.
- [8] I. Katona and T. F. Freund, "Endocannabinoid signaling as a synaptic circuit breaker in neurological disease," *Nat Med*, vol. 14, pp. 923-30, Sep 2008.
- [9] R. Nyilas, L. C. Gregg, K. Mackie, M. Watanabe, A. Zimmer, A. G. Hohmann, *et al.*, "Molecular architecture of endocannabinoid signaling at nociceptive synapses mediating analgesia," *Eur J Neurosci*, vol. 29, pp. 1964-78, May 2009.
- [10] A. Ludanyi, L. Eross, S. Czirjak, J. Vajda, P. Halasz, M. Watanabe, *et al.*, "Downregulation of the CB1 cannabinoid receptor and related molecular elements of the endocannabinoid system in epileptic human hippocampus," *J Neurosci*, vol. 28, pp. 2976-90, Mar 19 2008.
- [11] N. D. Volkow, R. D. Baler, W. M. Compton, and S. R. Weiss, "Adverse health effects of marijuana use," *N Engl J Med*, vol. 370, pp. 2219-27, Jun 5 2014.
- [12] D. M. Lovinger, "Presynaptic modulation by endocannabinoids," *Handb Exp Pharmacol*, vol. 184, pp. 435-77, 2008.

- [13] T. Ohno-Shosaku, T. Maejima, and M. Kano, "Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals," *Neuron*, vol. 29, pp. 729-38, Mar 2001.
- [14] J. O'Keefe and J. Dostrovsky, "The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat," *Brain Research*, vol. 34, pp. 171-175, 1971.
- [15] P. Somogyi and T. Klausberger, "Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus," *J Physiol*, vol. 562, pp. 9-26, Jan 1 2005.
- [16] T. Klausberger and P. Somogyi, "Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations," *Science*, vol. 321, pp. 53-7, Jul 4 2008.
- [17] D. W. Cope, G. Maccaferri, L. F. Marton, J. D. Roberts, P. M. Cobden, and P. Somogyi, "Cholecystokinin-immunopositive basket and Schaffer collateral-associated interneurons target different domains of pyramidal cells in the CA1 area of the rat hippocampus," *Neuroscience*, vol. 109, pp. 63-80, 2002.
- [18] L. A. Matsuda, S. J. Lolait, M. J. Brownstein, A. C. Young, and T. I. Bonner, "Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA," *Nature*, vol. 346, pp. 561-4, Aug 9 1990.
- [19] W. A. Devane, F. A. Dysarz, 3rd, M. R. Johnson, L. S. Melvin, and A. C. Howlett, "Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain," *Mol Pharmacol*, vol. 34, pp. 605-13, Nov 1988.
- [20] W. A. Devane, L. Hanus, A. Breuer, R. G. Pertwee, L. A. Stevenson, G. Griffin, *et al.*, "Isolation and Structure of a Brain Constituent That Binds to the Cannabinoid Receptor," *Science*, vol. 258, pp. 1946-1949, Dec 18 1992.
- [21] A. Ameri, "The effects of cannabionoids on the brain," *Prog Neurobiol*, vol. 58, pp. 315-348, 1999.
- [22] T. F. Freund, I. Katona, and D. Piomelli, "Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling," *Physiol Rev*, vol. 83, pp. 1017-66, Jul 2003.
- [23] A. C. Howlett, "The cannabinoid receptors," *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, vol. 68-9, pp. 619-631, Aug 2002.
- [24] D. Piomelli, M. Beltramo, A. Giuffrida, and N. Stella, "Endogenous cannabinoid signaling," *Neurobiol Dis*, vol. 5, pp. 462-73, Dec 1998.
- [25] N. Stella, P. Schweitzer, and D. Piomelli, "A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation," *Nature*, vol. 388, pp. 773-778, Aug 21 1997.
- [26] K. Chen, A. Ratzliff, L. Hilgenberg, A. Gulyas, T. F. Freund, M. Smith, *et al.*, "Long-term plasticity of endocannabinoid signaling induced by developmental febrile seizures," *Neuron*, vol. 39, pp. 599-611, Aug 14 2003.

- [27] G. Nyiri, C. Cserep, E. Szabadits, K. Mackie, and T. F. Freund, "CB1 cannabinoid receptors are enriched in the perisynaptic annulus and on preterminal segments of hippocampal GABAergic axons," *Neuroscience*, vol. 136, pp. 811-22, 2005.
- [28] L. Mikasova, L. Groc, D. Choquet, and O. J. Manzoni, "Altered surface trafficking of presynaptic cannabinoid type 1 receptor in and out synaptic terminals parallels receptor desensitization," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 105, pp. 18596-601, Nov 25 2008.
- [29] J. D. Pollock, D. Y. Wu, and J. S. Satterlee, "Molecular neuroanatomy: a generation of progress," *Trends Neurosci*, vol. 37, pp. 106-23, Feb 2014.
- [30] L. Schermelleh, R. Heintzmann, and H. Leonhardt, "A guide to super-resolution fluorescence microscopy," *J Cell Biol*, vol. 190, pp. 165-75, Jul 26 2010.
- [31] A. Dani, B. Huang, J. Bergan, C. Dulac, and X. Zhuang, "Superresolution imaging of chemical synapses in the brain," *Neuron*, vol. 68, pp. 843-56, Dec 9 2010.
- [32] W. Wallace, L. H. Schaefer, and J. R. Swedlow, "A workingperson's guide to deconvolution in light microscopy," *Biotechniques*, vol. 31, pp. 1076-8, 1080, 1082 passim, Nov 2001.
- [33] C. Cremer and T. Cremer, "Considerations on a laser-scanning-microscope with high resolution and depth of field," *Microsc Acta*, vol. 81, pp. 31-44, Sep 1978.
- [34] R. Heintzmann, V. Sarafis, P. Munroe, J. Nailon, Q. S. Hanley, and T. M. Jovin, "Resolution enhancement by subtraction of confocal signals taken at different pinhole sizes," *Micron*, vol. 34, pp. 293-300, 2003.
- [35] B. Huang, H. Babcock, and X. Zhuang, "Breaking the diffraction barrier: super-resolution imaging of cells," *Cell*, vol. 143, pp. 1047-58, Dec 23 2010.
- [36] M. J. Rust, M. Bates, and X. Zhuang, "Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)," *Nat Methods*, vol. 3, pp. 793-5, Oct 2006.
- [37] J. C. Vaughan, S. Jia, and X. Zhuang, "Ultrabright photoactivatable fluorophores created by reductive caging," *Nat Methods*, vol. 9, pp. 1181-4, Dec 2012.
- [38] A. L. McEvoy, D. Greenfield, M. Bates, and J. Liphardt, "Q&A: Single-molecule localization microscopy for biological imaging," *BMC Biol*, vol. 8, p. 106, 2010.
- [39] B. Huang, W. Wang, M. Bates, and X. Zhuang, "Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy," *Science*, vol. 319, pp. 810-3, Feb 8 2008.
- [40] G. T. Dempsey, M. Bates, W. E. Kowtoniuk, D. R. Liu, R. Y. Tsien, and X. Zhuang, "Photoswitching mechanism of cyanine dyes," *J Am Chem Soc*, vol. 131, pp. 18192-3, Dec 30 2009.

- [41] G. T. Dempsey, J. C. Vaughan, K. H. Chen, M. Bates, and X. Zhuang, "Evaluation of fluorophores for optimal performance in localization-based super-resolution imaging," *Nat Methods*, vol. 8, pp. 1027-36, Dec 2011.
- [42] M. Bates, B. Huang, G. T. Dempsey, and X. Zhuang, "Multicolor super-resolution imaging with photo-switchable fluorescent probes," *Science*, vol. 317, pp. 1749-53, Sep 21 2007.
- [43] S. Wolter, A. Loschberger, T. Holm, S. Aufmkolk, M. C. Dabauvalle, S. van de Linde, *et al.*, "rapidSTORM: accurate, fast open-source software for localization microscopy," *Nat Methods*, vol. 9, pp. 1040-1, Nov 2012.
- [44] R. Henriques, M. Lelek, E. F. Fornasiero, F. Valtorta, C. Zimmer, and M. M. Mhlana, "QuickPALM: 3D real-time photoactivation nanoscopy image processing in ImageJ," *Nat Methods*, vol. 7, pp. 339-40, May 2010.
- [45] Y. Fukudome, T. Ohno-Shosaku, M. Matsui, Y. Omori, M. Fukaya, H. Tsubokawa, *et al.*, "Two distinct classes of muscarinic action on hippocampal inhibitory synapses: M2-mediated direct suppression and M1/M3-mediated indirect suppression through endocannabinoid signalling," *Eur J Neurosci*, vol. 19, pp. 2682-92, May 2004.
- [46] H. Babcock, Y. M. Sigal, and X. Zhuang, "A high-density 3D localization algorithm for stochastic optical reconstruction microscopy," *Optical Nanoscopy*, vol. 1, 2012.
- [47] M. Kass, A. Witkin, and D. Terzopoulos, "Snakes - Active Contour Models," *International Journal of Computer Vision*, vol. 1, pp. 321-331, 1987.
- [48] P. Marquez-Neila, L. Baumela, and L. Alvarez, "A morphological approach to curvature-based evolution of curves and surfaces," *IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell*, vol. 36, pp. 2-17, Jan 2014.
- [49] D. Baddeley, M. B. Cannell, and C. Soeller, "Visualization of localization microscopy data," *Microsc Microanal*, vol. 16, pp. 64-72, Feb 2010.
- [50] S. T. Dieck, L. Sanmarti-Vila, K. Langnaese, K. Richter, S. Kindler, A. Soyke, *et al.*, "Bassoon, a novel zinc-finger CAG/glutamine-repeat protein selectively localized at the active zone of presynaptic nerve terminals," *Journal of Cell Biology*, vol. 142, pp. 499-509, Jul 27 1998.
- [51] R. I. Wilson, G. Kunos, and R. A. Nicoll, "Presynaptic specificity of endocannabinoid signaling in the hippocampus," *Neuron*, vol. 31, pp. 453-62, Aug 16 2001.
- [52] F. Varoqueaux, S. Jamain, and N. Brose, "Neurologin 2 is exclusively localized to inhibitory synapses," *Eur J Cell Biol*, vol. 83, pp. 449-56, Sep 2004.
- [53] V. T. Takacs, T. F. Freund, and G. Nyiri, "Neurologin 2 is expressed in synapses established by cholinergic cells in the mouse brain," *PLoS One*, vol. 8, p. e72450, 2013.

- [54] B. Dudok, L. Barna, M. Ledri, S. I. Szabo, E. Szabadits, B. Pinter, *et al.*, "Cell-specific STORM super-resolution imaging reveals nanoscale organization of cannabinoid signaling," *Nat Neurosci*, doi. 10.1038/nn.3892, 12/08/online 2014.
- [55] A. A. Coutts, S. Anavi-Goffer, R. A. Ross, D. J. MacEwan, K. Mackie, R. G. Pertwee, *et al.*, "Agonist-induced internalization and trafficking of cannabinoid CB1 receptors in hippocampal neurons," *J Neurosci*, vol. 21, pp. 2425-33, Apr 1 2001.
- [56] W. Jin, S. Brown, J. P. Roche, C. Hsieh, J. P. Celver, A. Kover, *et al.*, "Distinct domains of the CB1 cannabinoid receptor mediate desensitization and internalization," *J Neurosci*, vol. 19, pp. 3773-80, May 15 1999.
- [57] C. Foldy, A. Neu, M. V. Jones, and I. Soltesz, "Presynaptic, activity-dependent modulation of cannabinoid type 1 receptor-mediated inhibition of GABA release," *J Neurosci*, vol. 26, pp. 1465-9, Feb 1 2006.