

Mintavételezés, patkány hippocampális dendrittüskéiben található WAVE-1 fehérje eloszlásának vizsgálatához

Szakdolgozati témám, a patkány hippocampus CA1 régiójának stratum radiatum rétegében található dendrittüskék spinoplazmájában, a citoskeletáris vázelemekhez kapcsolódó WAVE-1 fehérje eloszlásának monitoring vizsgálata. Napjainkra elfogadott tényé vált, hogy a szinaptikus hatékonysággal (LTP) szoros kapcsolatban álló dendrit tüske morfológiában bekövetkező változásokat a főként F-aktin polimerből álló citoskeleton határozza meg. Az aktin filamentumok, aktin kötő fehérjék és jelátviteli molekulák által közvetített újraszerveződése teszi lehetővé, hogy végbe menjenek a tanulási folyamatok molekuláris alapjául szolgáló tüskealakbéli változások. A preszinaptikus mintázattól függő átszerveződés összetett biokémiai útvonalakat foglal magába, melyek nélkülözhetetlen alkotóeleme a WAVE-1, Wiskott-Aldrich szindróma Verprolin homológ struktúr fehérje. A WAVE-1 jeleket közvetít a kis molekula tömegű Rac GTP-ázoktól az Arp 2/3 komplexhez, mely az elágazó aktin polimerizációban, ezáltal a tüske növekedésében vesz részt.

A kísérlet során vizsgált minták fiatal: 7, 14 és 21 napos illetve felnőtt (3-5 hónapos) Sprague-Dawley patkányok hippocampusának CA1 régiójának stratum radiatum rétegéből származnak. A kiválasztott életkorok jól szemléltetik az állatok idegfejlődési sajátosságainak egyes állomásait, melyek esetén szembetűnő különbségek fedezhetők fel a spinogenezis folyamatának különböző stádiumaiban lévő képződmények felépítésében, pl.: a PSD receptor komplexének összetételében. A patkányok korai egyedfejlődése során figyelemmel kísérhető, miként válnak alkalmassá érzékszerveik a környezeti ingerek egyre szélesebb tartományának felfogására és ezzel párhuzamosan, hogyan alakulnak ki ideghálózatuk kapcsolatai. Az újszülöttek (P0- posztnatalis fejlődés 0. napja) teljesen vakok, süketek, így a külső környezet ingereit kis mértékben képesek érzékelni (bajusz szálak), csupán spontán mozgásokat végeznek. A hippocampális dendritek kezdetleges tüskére utaló felszíni képletekkel, filopodiumokkal rendelkeznek. Az éretlen fázisban a dendritikus kinövések vékonyak és hosszúak, nem különíthető el rajtuk az érett tüskékre jellemző feji, nyaki régió. A kialakuló tüskékre jellemző, AMPA, metabrotób glutamát receptor illetve számos „scaffolding” fehérjét tartalmazó elektrondenz membrán vastagodás, a PSD-ben, egészen a 14. születés utáni napig több alegységből (NR2A és NR2B) álló NMDA receptorok találhatóak. Az NR2A egységeket is tartalmazó receptorokat a fejlődés 21. napjára felváltják a csupán NR2B-t tartalmazók, továbbá túlsúlyba kerülnek az érett hippocampális dendritekre jellemző vékony, zömök és

gomba alakú dendrittüskék a filopodiumok ellenében. A tüske érési folyamat során a tüske sűrűségben bekövetkező fokozódás, hossz csökkenés és filopodium szám csökkenés következik be. Ezek alapján eltérő életkorú egyedek esetén feltételezhetjük a fehérjék tüskebeli eloszlásának különbségét. A 14-15. napon kísérleti alanyaink szemük kinyílik, elkezdnek mászkálni, a hippocampális formáció részét képező gyrus dentatus szemcse-sejtjeinek fejlődése is ekkorra fejeződik be, 21 napos állatok hippocampus nem mutat szerkezeti eltérést a felnőtt állatokéitól.

A hippocampus Ramon y Cajal nomenklatúrája szerint régió superiorra és régió inferiorra osztható, míg a hagyományos nevezéktan CA1-CA4-vel jelölt területeket különít el. Mintáink az azonos oldali hippocampus CA1 régiójából származnak. Ennek oka, hogy a szinaptikus plaszticitás emlősökben előforduló egyik formáját az LTP-t a Gyrus dentatus szemcse-sejtjeitől a CA3 régió óriás piramis sejtjeihez irányuló moharost szinapszisoknál és azoktól a CA1 régióhoz futó Schaffer kollaterális szinaptikus kiterjedésekben tanulmányozták legalaposabban in vitro farmakológiai kutatások során, (a temporális lebeny epilepszia gátlástalanítást igénylő kísérletei során a CA3 régióban gyakorta jelentkező epileptiform aktivitást kísérő agyvérzés vizsgálatok egész sorát tette tönkre.)

A hippocampus szövettani felépítését tekintve lamelláris szerkezetű, vagyis a jellegzetes triszinaptikus kapcsoltsági kör kb. a hippocampus hossz tengelyére merőlegesen szerveződik, 4 rétege jól elkülöníthető a hippocampális keresztmetszeteken. Közülük a CA1 régió stratum radiatum rétegét helyezük figyelmünk középpontjába. Mintavételezésünk során transzmissziós elektronmikroszkóppal pásztázzuk körül az uranil-acetát-ólomcitrát kontrasztfokozásnak alávetett, Meses gridre felvett metszetet és az erre szolgáló AnalySIS software segítségével készítünk felvételeket az aranyszemcsét tartalmazó dendrit tüskékről, melyek úgy metsződtek el, hogy a szinapszist kialakító axonterminális és tüske PSD-t hordozó szinaptikus membrán közötti szinaptikus rés jól elkülöníthető, ezáltal pontos axodendritikus távolság mérést tesz lehetővé a későbbiekben. Törekszünk a lehető legtöbb, ezen kritériumnak eleget tevő tüske lefényképezésére. Az általunk vizsgált rétegben számos transzmitter vezikulát tartalmazó, mitokondriumban gazdag axonterminális, dendritörzsek, asztrociták és befűződésekkel taglalt interneuronok is hordozhatnak jelölést a tüskéken kívül. Elszórtan velőshüvelyes axon átmetszetekkel és kapillárisokkal is találkozhatunk. „Megfelelő egyed” észlelésekor többnyire 50-75.000-szeres nagyítással készítünk felvételt a tüskéről a kép élességét úgy beállítva, hogy az aranyszemcse körvonalai tisztán kirajzolódjanak. A stratum pyramidale, piramis sejtek sejttestjeit tartalmazó rétege alatt elhelyezkedő, a sejtek apikális dendritjeinek teret adó stratum radiatum rétegében homogén tüskepopuláció található.

A minta, egy 70-80 microméter vastagságú, vibratómmal készített trapéz alakú metszeten preembedding arany jelöléssel láthatóvá tett fehérjéket tartalmazó tüskék halmaza. A fehérjék ellen termeltetett antitestekkel való inkubáció lehetővé teszi a metszet felszínéhez viszonyított, felső 3-5 (8) micron vastagságú réteg jelölését.

Az immunarany reakció mennyiségi analízise során Image J softwarrel 3 távolság kerül lemérésre. Az axodendritikus távolság, abban az esetben, ha az aranyszemcse a tüske membránon belül található, a PSD két szélé által meghatározott, szinaptikus membránra állítható merőleges egyenesek közti tartományban lévő aranyszemcse, szinaptikus membrántól (PSD) való legrövidebb távolsága. A szinaptikus specializációhoz viszonyított tartományon kívül eső szemcséket kihagyjuk a mérésből. (Az axodendritikus távolságot, ugyanazzal a tüskével szinaptizáló preszinaptikus axonterminálisban található jelölt vezikulá(k)tól is lemérjük az esetben ha teljesül rá az előbb említett feltétel. Radiális távolságon az aranyszemcse nem szinaptikus membrántól való legrövidebb távolságát értjük, melyet nem mérünk le, ha az a PSD két szélé és a tüske geometriai középpontja által meghatározott háromszögön belül helyezkedik el. Az aranyszemcsék geometriai távolságát a tüske geometriai középpontja és a membrán legközelebbi pontja közti szakasz adja meg. A normalizált radiális távolságot:

$dN=d1/(d1+d2)$ egyenletből számítjuk, ahol $d1$ a radiális és $d2$ a tüske geometriai középpontjától való távolság. Így 0, egy a plazmamembránnál lévő szemcsének, 1 a tüske centrumban lévőnek felel meg. Az aktin kötő fehérje és a tüskeparaméterek (figyelembe véve a PSD-t, endocitotikus zónát és a tüske nyakat) közti kapcsolat felfedése érdekében szintén szintén elemezni fogjuk az aranyszemcsék PSD-től vett tangenciális távolságát a tüskehéjban. Adataink normalizációját követően a PSD szélével határos aranyszemcsék 0, míg a PSD két szélétől egyenlő távolságra fekvők 1 értéket vehetnek fel. A normalizálást követően az adatok ábrázolása felfedi, hogy az adott ABP előfordulása elsődlegesen a tüske mely részterületén helyezkedik el.

Felhasznált irodalom

1. Cordon M. Shepherd: The Synaptic Organization of of the Brain (1974, 1979, 1990)
2. Carlo Sala: Molecular Regulation of Dendritic Spine Shape and Function, Neurosignals 2002; 11:213-223
3. Bence Rác és Richard J. Weiberg által írt kísérlet menet