

Az asztrociták nyúlványrendszerének szuper-rezolúciós megjelenítését lehetővé tevő módszer kidolgozása az endokannabinoidokat lebontó MGL enzim asztrocitákban való vizsgálatára

Az idegsejtek közti kommunikáció mélyebb szintű megismerése elengedhetetlen az idegrendszeri betegségek mechanizmusának megértéséhez és azok hatásos kezeléséhez. Az elmúlt két évtized kutatásai megmutatták, hogy az idegrendszer különös sejtjei, az úgynevezett asztrociták nem "csak" az idegsejtek általános működésében, hanem az azok közti kommunikációban, így a tanulási- és memóriafolyamatokban is kiemelkedő szerepet játszanak. Az asztrocitákról felhalmozott, rendelkezésünkre álló tudásanyag viszont igen csekély, melynek fő oka, az asztrociták egyedi morfológiája. Vékony nyúlványrendszerük a hagyományos mikroszkópok felbontási határa alatt van, így vizsgálatuk komoly nehézségekbe ütközik. Márpedig az idegsejtek közti jelátvitel asztrociták általi szabályozásának megértéséhez elengedhetetlen, hogy ismerjük az egyes fehérjék (a fő szabályozóelemek) asztrocitákon való pontos elhelyezkedését, előfordulásuk törvényszerűségeit. Állatkísérletes engedélyünket egy olyan projektre kérjük, melyben kidolgoznánk egy új jelölési módszert egerek egyedi asztrocitáinak jelölésére. Módszerünk segítségével a sejtek vékony nyúlványrendszere szuperfelbontású mikroszkópia segítségével megjeleníthető, valamint a nyúlványokban az egyes fehérjék előfordulása vizsgálható.

Az asztrocita nyúlvány jelölő módszer kidolgozása során jól karakterizált és az irodalomban elfogadott eljárást (elektroporáció) fogunk használni, melyet kutatócsoportunk is rutinszerűen alkalmaz. Elektroporációs eljárással az adott időben és helyen keletkező sejtek a helyes időablak megválasztásával szelektíven jelölhetők. Az asztrocita sejtek az egér embrionális fejlődésének végén, illetve születés utáni első napokban képződnek. Az elektroporációs eljárást ebben az időablakban végezve az asztrocita sejtek szelektíven jelölhetők. Az eljárás során egér embriókba vagy 0-2 napos kis egerek agykamrájába üvegkapilláris segítségével jelölő plazmid DNS-t juttatunk, ami ezután elektromos impulzus hatására az éppen osztódó sejtek belsejébe jut. A plazmid DNS-t felvett sejtek sejthatára (membránja), így a nyúlványaik is jelölődni fognak.

Az elektroporáció sikerességét a már felnőtt egereken ellenőrizzuk. Ekkor kíméletesen, altatásban termináljuk őket és szuperfelbontású mikroszkópos eljárást alkalmazva megvizsgáljuk az agyukban a jelölt asztrocita sejteket. Ennek segítségével a sejtek nyúlványrendszeréről olyan mikroszkópos képeket fogunk felvenni, melyek jóval részletgazdagabbak, a hagyományos mikroszkópos technikáknál egy nagyságrenddel jobb felbontással rendelkeznek. Ezután számos mikroszkópos kontroll kísérletet és a helyettesítés (replacement) elvére törekedve modellezést fogunk végezni annak érdekében, hogy módszerünk használható egyedi fehérjék előfordulásának az asztrocita nyúlványrendszerben való igazolására.

A módszer kidolgozása után, a jelölő eljárást egy olyan fehérje (monoacilglicerol-lipáz enzim (MGL)) vizsgálatára fogjuk használni, aminek az eloszlása asztrocitákban ismeretlen, azonban két fontos jelátviteli út szabályozásában is részt vesz: a szinaptikus jelátvitel egyik fő szabályozó rendszerében, az endokannabinoid jelátvitelben, illetve a gyulladásos folyamatok mediátorait, a prosztaglandinokat előállító útvonalban. Az MGL enzim fontos és diverz feladatai miatt az elmúlt években kitüntetett terapeutikus célpont lett olyan jól ismert betegségekben, mint az Alzheimer- és Parkinson kór, vagy a krónikus fájdalomérzet.

A fentebb felsorolt kísérleti célok megvalósításához két egértörzset, vad típusú CD1-es és MGL génkiütött törzset használnánk. Az elektroporációs kísérletekhez összesen 231 anya műtésére kérjük engedélyünket. A kísérleti eredmények helyes interpretációjához nem több, mint 190 elektroporáláson átesett állat elegendő lenne (melyhez maximum 664 állat kíméletes körülmények közti felhasználása szükséges).

A projekt várható előnyei: 1) Asztrocita jelölő eljárás kidolgozása, mely számos, az asztrociták működésének megértését célul kitűző kutatás hasznos eszköze lehet. A módszer lehetőséget nyit a kutatók előtt az asztrocitákban előforduló fehérjék vizsgálatára. 2) Az MGL előfordulásáról nyert mélyebb tudásunk hozzájárulhat ahhoz, hogy megértsük a különböző betegségek gyógyítására bevezetni kívánt MGL enzimet célzó gyógyszerek működési mechanizmusát és lehetséges mellékhatásait. 3) MGL szerepének tisztázása gyulladásos folyamatokban. Eredményeink hozzájárulhatnak a gyakori humán betegségek, köztük kiemelten az Alzheimer- és Parkinson kór, vagy a krónikus fájdalomérzet molekuláris mechanizmusainak megismeréséhez, ezen ismeretek alapján pedig lehetséges új diagnosztikai és terápiás módszerek kifejlesztéséhez.

Az egyes kísérletekhez szükséges állatszámok megállapítása során törekedtünk a minimalizálásra (reduction) előzetes mintaelemszám kalkuláció és power analízis alkalmazásával, illetve alapos, racionális kísérlettervezéssel. Az anyaállatokat, a fel nem használt (nőstény) és felhasznált (sikeres génkifejező hím) utódokat is egybevetve, 5 év alatt 1845 állat vesz részt a kísérletekben. Az állatokat a törvény által előírt módon és körülmények között tartjuk (refinement), gondozásukat és egészségügyi állapotuk monitorozását szakképzett személyzet végzi. A törvény által előírt módokon törekszünk az állatok fájdalmának, szenvedésének minimalizálására és kíméletes végpontok alkalmazására. A kísérleteket kizárólag a törvény által előírt jogosultsággal rendelkező, hozzáértő személyek végzik.