

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**A 2-AG degradációjában résztvevő mechanizmusok vizsgálata a gerincvelő hátsó
szarvában, és CB1 receptort túltermelő sejt kultúrában**

Dócs Klaudia

Témavezető: Dr. Antal Miklós, az MTA doktora



DEBRECENI EGYETEM
Idegtudományi Doktori Iskola
Debrecen, 2018

**A 2-AG DEGRADÁCIÓJÁBAN RÉSZTVEVŐ MECHANIZMUSOK VIZSGÁLATA
A GERINCVELŐ HÁTSÓ SZARVÁBAN, ÉS CB1 RECEPTOR TÚLTERMELŐ
SEJTKULTÚRÁBAN**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Dócs Klaudia okleveles biológus

Készült a Debreceni Egyetem Idegtudományi Doktori Iskolája keretében

Témavezető: Dr. Antal Miklós, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Dr. Csiba László, akadémikus
tagok: Dr. Helyes Zsuzsanna, az MTA doktora
Dr. Alpár Alán, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja és helyszíne: Debreceni Egyetem ÁOK
Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet könyvtára
2018. szeptember 12. 11 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Puskár Zita, PhD
Dr. Pál Balázs, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Dr. Csiba László, akadémikus
tagok: Dr. Helyes Zsuzsanna, az MTA doktora
Dr. Alpár Alán, az MTA doktora
Dr. Puskár Zita, PhD
Dr. Pál Balázs, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK
Belgyógyászati Intézet, „A” épület tanterme
2018. szeptember 12. 13 óra

BEVEZETŐ

„Egy növény segítségével, amely évezredek óta előttünk hevert, egy felbecsülhetetlen jelentőségű új élettani rendszert fedeztünk fel.” Az idézet Raphael Mechoulamtól származik, aki 1964-ben felfedezte a különböző *Cannabis* fajok pszichoaktív hatásaiért felelős delta-9-tetrahidrokannabinolt (Δ^9 -THC), s akinek úttörő munkássága nyomán a kannabinoidokkal foglalkozó kutatások az idegtudományok egyik legvirágzóbb területévé váltak.

A THC-ről nagyon korán kiderült, hogy hidrofób természete miatt vízben szinte oldhatatlan, lipidekben azonban kiválóan oldódik, ezért sokáig úgy hitték, hogy a hatását nem specifikus módon, azaz nem valamilyen receptorhoz kötődve fejti ki, hanem csupán a sejtmembránba beoldódva, és annak fluiditását módosítva idéz elő biológiai hatást (Lawrence and Gill 1975). Biológiai aktivitása azonban sztereoszelektív (Jones et al. 1974), és a cAMP felhalmozódás gátlásán keresztül valósul meg (Howlett and Fleming 1984). A THC receptorát végül 1990-ben Matsuda és mtsi. klónozták sikeresen, és 1. típusú kannabinoid receptornak (CB_1) nevezték el (Matsuda et al. 1990). A receptor azonosításától kezdve valószínűsítették, hogy az emlősökben található CB_1 nem elsősorban a növényi kannabinoidok hatását hivatott közvetíteni, és számos kutatócsoport kezdte keresni a fitokannabinoidok endogén megfelelőjét. Az elsőként azonosított endokannabinoid ligandot, melynek izolálására 1992-ben került sor, leírói a szanszkrit „ananda” - vagyis belső gyönyör - szó alapján anandamidnak nevezték el (Devane et al. 1992). Ezt követte 1995-ben a 2-arachidonil-glicerin (2-AG), mely ismereteink szerint az anandamid mellett a másik legfontosabb endogén kannabinoid ligand (Mechoulam et al. 1995). Az elmúlt csaknem 30 év endokannabinoid kutatásainak eredményeként mára nemcsak az endokannabinoidok által közvetített intercelluláris kommunikáció molekuláris eszköztárát ismerhettük meg, hanem az endokannabinoid rendszer kulcsfontosságú szerepét is a legkülönbözőbb életfolyamatok szabályozásában, illetve számtalan betegség patogenezésében. Így, bár a marijuána a hippy-mozgalomnak köszönhetően elsősorban rekreációs drokként vált általánosan ismertté, a kannabinoidok lassan elfoglalták a helyüket a megemelkedett intraokuláris nyomás (Nucci et al. 2007), az atopiás dermatitis (Bíró et al. 2009) és számos további kórkép humán terápiájában is. Morfológiai, fiziológiai és farmakológiai módszerekkel sikerült azt is bizonyítani, hogy a fiziolgiás és pathologiás fájdalomfeldolgozás endokannabinoidfüggő szabályozása perifériás, gerincvelői és szupraspinális szinten egyaránt bekövetkezhet (Agarwal et al. 2007; Drew et al. 2008; Herkenham et al. 1991; Pertwee 2001). A gerincvelői szintű nociceptív információfeldolgozás kannabinoidfüggő modulálásának hátterében feltételezhetően egy meglehetősen komplex mechanizmus húzódik, a CB_1 receptor

ugyanis bár változó mértékben, de jóformán a gerincvelő fájdalomfeldolgozásban elsődleges szerepet játszó felületes hátsó szarvának valamennyi sejt típusán kimutatható, serkentő és gátló axonterminálisokon éppúgy, mint asztrocitákon és mikroglia sejteken (Hegyi et al. 2009). Az anandamid és 2-AG szintézisében részt vevő két legfontosabb enzim, a NAPE-szelektív foszfolipáz D (NAPE-PLD) és a diacilglicerol-lipáz α (DGL α) ugyancsak jelen van a gerincvelői neuronoknak elsősorban a szomatodendritikus kompartmentjén és gliasejteken is (Hegyi et al. 2012). A CB₁ receptorok aktivációját, és így a kannabinoid rendszer hatásának erősségét ugyanakkor nem önmagában az endokannabinoidok mobilizálása határozza meg, hanem elsősorban a ligandok mindenkori koncentrációja, amit alapvetően az endogén kannabinoidok szintézisének és lebontásának egymáshoz való viszonyított aránya állít be. Kísérleteink kezdetekor azonban az irodalomban semmilyen adat nem állt rendelkezésre az endokannabinoidok bontását végző enzimek gerincvelői expressziójáról. Így, tekintettel a 2-AG jelpálya jelentőségére a gerincvelői szintű fájdalomfeldolgozás szabályozásában, jelen értekezés témájául két, a 2-AG koncentrációjának csökkentésében szerepet játszó mechanizmus vizsgálatát választottuk. A 2-AG lebontásáért elsősorban felelős enzim, a monoglicerol-lipáz gerincvelői expressziójának leírása mellett vizsgáltuk a 2-AG régóta ismert spontán molekuláris átrendeződésének szerepét a 2-AG-függő jelátvitel szabályozásában.

CÉLKITŰZÉSEK

Az elmúlt csaknem 30 évben a kannabinoidokkal foglalkozó közlemények száma rohamosan emelkedett, és az endokannabinoid rendszernek a különböző fiziológiás és patológias folyamatokban betöltött szerepéről alkotott képünk egyre összetettebb lett. A rendelkezésre álló könyvtárnyi irodalom ellenére azonban ismereteink sok ponton továbbra is hiányosak. Így például a fájdalom gerincvelői szinten megvalósuló kannabinoiderg kontrolljának, azon belül is a 2-AG jelátviteli útvonal működésének számos kérdése vár tisztázásra. Ezek közül is az egyik legfontosabb a 2-AG mediált jelátvitel leállításának mechanizmusa, amelyről a gerincvelő hátsó szarva vonatkozásában alig tudunk valamit. Ezért kísérleteink kezdetekor célunk az volt, hogy megvizsgáljuk:

- a 2-AG degradációjáért elsődlegesen felelősnek gondolt enzimnek, az MGL-nek a disztribúcióját a gerincvelő felületes hátsó szarvában és expresszióját annak sejttypusain és az ott végződő axonterminálisokon

Mivel az MGL expressziója az axonterminálisokon és a gerincvelő hátsó szarvának sejtjein nagyon csekély mértékűnek mutatkozott, felvetődött a kérdés hogy a 2-AG inaktiválása valóban főleg enzimatisus úton történik e. A 2-AG-ról köztudott volt az izomerizációs képessége, kevés adat szolgált azonban a keletkező 1-AG-ról. Ezért egy egyszerű modellrendszerben, CB1 receptort expresszáló COS7 sejteken vizsgálni kívántuk

- a 2-AG izomerizációjának kinetikáját
- a 2-AG-ból keletkező 1-AG biológiai aktivitását, továbbá azt,
- hogy a 2-AG izomerizációjával keletkező 1-AG befolyásolja-e a 2-AG – CB₁ jelátviteli útvonal működését

ANYAG ÉS MÓDSZER

Kísérleti állatok és a szöveti metszetek előkészítése

A kísérleteket kilenc felnőtt patkányon (Wistar-Kyoto, 250-300 g, Gödöllő, Magyarország), két vad-típusú és egy MGL génkiütött egéren végeztük. Az állatkísérleteket a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága által kiadott protokoll alapján végeztük, melyek megfeleltek az Európai Unió előírásainak. Az állatok előzetes nátrium-pentobarbitállal (50 mg/kg, i.p.) történő mély altatását követően Tyrode oldattal, majd pedig 0.1 M foszfát pufferben (pH 7,4) oldott 4%-os paraformaldehid oldattal transzkardiálisan perfundáltuk. A perfúziót követően a gerincvelő L3-L5 lumbális szegumentumait eltávolítottuk, négy órán keresztül az eredeti fixáló oldatban utófixáltuk, majd 0.1M PB-ben feloldott szacharóz 20%-os oldatába merítettük, amíg le nem süllyedt. Ezt követően a sejtmembrán átjárhatóságának növelése érdekében a gerincvelők lumbális szegmenseit folyékony nitrogénnel fagyasztottuk, majd szobahőmérsékletű 0.1M PB-be merítettük. Ezt követően a mintákat 8%-os agarba ágyaztuk, majd vibrotóm segítségével 50 µm vastagságú metszeteket készítettünk.

Immunhisztokémia

Az MGL gerincvelői eloszlásának vizsgálatára, ill. az MGL ellenes antitest specificitásának igazolására egyszeres immunfestést végeztünk patkány, továbbá vad típusú és MGL génkiütött egerek gerincvelőjéből származó mintákon. Ehhez az úszó metszeteket 10%-os normál kecske szérummal blokkoltuk 50 percig, ezt követően nyúlban termeltetett anti-MGL (hígítás: 1:30, katalógus sz.: MGL-Rb-Af200, Frontier Science Co., Ishikari, Hokkaido, Japan) antitesttel inkubáltuk 48 órán át 4 °C-on, majd kecskében termeltetett, biotinilált anti-nyúl-IgG (hígítás: 1:200, katalógus sz.: PK-4001, Vector Labs., Burlingame, California, USA) antitesttel 12 órán át 4 °C-on. Végül avidin-biotinált tormaperoxidázzal (hígítás: 1:100, Vector Labs., Burlingame, California, USA) 5 órán keresztül inkubáltuk a metszeteket, majd a reakciót 3,3-diaminobenzidin (katalógus sz.: D-5637, Sigma, St. Louis, Missouri, USA) kromogén reakcióval tettük láthatóvá. Az antitestek hígítása 10 mM trisz-foszfát pufferelt izotóniás sóoldattal (TPBS, pH 7.4) történt, melyhez 1%-os normál kecskeszérumot (katalógus sz.: S-1000, Vector Labs., Burlingame, California, USA) adtunk. A reakciót követően a metszeteket tárgylemezre szedték és Permout neutrális médiummal lefedték.

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk az MGL immunreaktivitás kolokalizációját a nociceptív primer afferensek axonterminálisainak, valamint a glutamáterg és GABAerg interneuronok axonterminálisainak, továbbá az asztrocita és mikroglia sejtek markereivel, kettős immunfestési protokollt alkalmaztunk. Az úszó metszeteket először 10% normál kecske szérummal blokkoltuk 50 percig, majd primer antitestek keverékével inkubáltuk, amely a nyúlban termeltetett anti-MGL mellett az alábbi markerek egyikét tartalmazta: a.) tengerimalacban termeltetett anti-kalcitonin gén-relációs peptid (CGRP) (1:2,000, katalógus sz.: T5027, Peninsula Labs, San Carlos, California, USA), b.) biotinilált izolektin B4 (IB4) (1:2,000, katalógus sz.: I21414, Invitrogen, Eugene, Oregon, USA), c.) tengerimalacban termeltetett anti-vezikuláris glutamát transzporter 2 (VGLUT2) (1:2,000, katalógus sz.: AB2251, Millipore, Temecula, California, USA), d.) tengerimalacban termeltetett anti-vezikuláris GABA transzporter (VGAT) (1:600, katalógus sz.: 131004, Synaptic Systems, Göttingen, Németország), e.) egérben termeltetett anti-gliális fibrilláris savas fehérje (GFAP) (1:1,000, katalógus sz.: MAB3402, Millipore, Temecula, California, USA), f.) egérben termeltetett anti-CD11b (1:500, katalógus sz.: MCA275G, AbD Serotec, Oxford, UK). A metszeteket a primer antitestek oldatával 2 napig 4 °C-on inkubáltuk, majd 1% normál kecske szérummal való mosást követően 2 órán keresztül szekunder antitestekkel inkubáltuk, melyeket a primer antitesteknek megfelelően az alábbiak közül választottunk ki: a.) Alexa Fluor 488-cal konjugált kecske – anti-nyúl IgG (1:1,000, katalógus sz.: A11034, Invitrogen, Eugene, Oregon, USA), b.) Alexa Fluor 555-tel konjugált kecske – anti-tengerimalac IgG (1:1,000, katalógus sz.: A21435, Invitrogen, Eugene, Oregon, USA), c.) Alexa Fluor 555-tel konjugált kecske – anti-egér IgG (1:1,000, katalógus sz.: A21422, Invitrogen, Eugene, Oregon, USA), d.) Alexa Fluor 555-tel konjugált streptavidin (1:1,000, katalógus sz.: S11225, Invitrogen, Eugene, Oregon, USA). Az antitesteket 1%-os normál kecske szérumban hígítottuk. A reakció végeztével a metszeteket PBS-ben mostuk (3x15 min), majd tárgylemezre szedtük és Vectashilddel (katalógus sz.: H-1000, Vector Labs, Burlingame, California, USA) fedtük le.

Immuncitokémia

A transzfektált COS7 sejteket 24 lyukú sejtenyésző edényeken növesztettük, majd 0.1 M foszfát pufferben oldott 4%-os paraformaldehid oldattal fixáltuk 10 percig. Ezt követően a sejteket 30 percig 10% normál kecske szérummal kezeltük, melyet a sejtek CB1 elleni primer antitesttel történő kezelése követett (2 óra, 1:2000, Cayman Chemicals, Ann Arbor, USA,

katalógus sz.: 10006590). Alapos mosás után a sejteket Alexa Fluor 488-al konjugált kecske anti-nyúl IgG másodlagos antitesttel (1:1000, Invitrogen) inkubáltuk 1 órán keresztül, mostuk 15 percen keresztül, majd Vectashield-DAPI-val lefedtük. Az inkubálás összes lépését szobahőmérsékleten végeztük. A fluoreszcensen jelölt COS7 sejtekről Olympus IX-81 inverz mikroszkópra épített differential spinning disc-kel (DSD2, Andor Technology) illetve Andor Zyla 5.5 sCMOS típusú kamerával felvételeket készítettünk. Ehhez egy 60x PlanApo N olaj-immériós objektívet (NA: 1.40) használtunk, majd az így elkészített képeket Adobe Photoshop CS5 szoftverrel elemeztük.

Western blot analízis

A Western blot analízishez az állatok lumbális gerincvelői szegmentumait eltávolítottuk, majd szonikáltuk 20mM koncentrációjú Tris lízis pufferben, amely a következő proteáz gátlókat tartalmazta (mM): EDTA (4.0), EGTA (2.5), PMSF (0.002) benzamidine (0.013), pepstatin A (0.004), szójabab tripszin inhibitor (0.001), leupeptin (0.001) és aprotinin (0.001). A szonikált mintákból a sejtörmelékeket centrifugálással (1,500 rcf, 10 min, 4 °C) eltávolítottuk, majd ezt követően a felülúszót újra centrifugáltuk (12,000 rcf, 20 min, 4 °C). A pellet újraszuszpendálásához 1% Triton X-100 és 0.1 % SDS-t tartalmazó lízis puffert használtunk, majd az így előkezelt mintát 10 % SDS-poliakrilamid gélen megfuttattuk, és elektroforetikusan PVDF membránra vittük át. Ezt követően a mintán a fentieknek megfelelő módon egyszeres immunfestési protokollt végeztünk.

A COS7 sejtekből származó mintákat a Western blot és nátrium dodecil szulfát - poliakrilamid-gél elektroforézis (SDS PAGE) analízishez a következőképpen készítettük elő: proteáz inhibitorokkal (4 mM EDTA, 2.5 mM EGTA, 2 nM PMSF, 26 µM benzamidin, 8 µM pepstatin A, 2 µg/ml szójabab tripszin inhibitor, 2 µg/ml leupeptin, 2 µg/ml aprotinin) kiegészített 20mM TRIS (pH 7.4) lízis pufferben szonikáltuk. A sejtörmelékeket centrifugálással eltávolítottuk (10 perc, 1500 g, 4 °C) majd a felülúszót újból centrifugáltuk (20 perc, 12,000 g, 4 °C). Ezt követően a pelletet 1% TRITON-X-100 és 0.1% SDS-t tartalmazó lízis pufferben reszuszpendáltuk. A mintákat felhasználásig -70 °C-on tároltuk.

A minták protein koncentrációjának megállapítására a detergens kompatibilis BCA protein assayt használtuk (Pierce, Rockford, USA). A mintákat redukáló ágenssel kiegészített pufferben (50 µg protein/sáv) feloldottuk, majd 10% SDS-poliakrilamid gélen megfuttattuk (Laemmli 1970). Az így elválasztott fehérjéket PVDF membránra vezettük át (Millipore, Bedford, USA).

A membránokat TTBS (20 mM TRIS, 500 mM NaCl, pH 7.5, 0.05% Tween-20) oldatban feloldott 10%-os borjú szérum albuminnal blokkoltuk (Sigma). Ezt követően a membránokat CB₁ receptor elleni antitesttel (1:1000, Cayman Chemicals, Ann Arbor, USA, Cat. No: 10006590) inkubáltuk szobahőmérsékleten 2 órán keresztül. A membránokat alaposan mostuk TTBS oldattal, majd anti-nyúl IgG-HRP másodlagos antitesttel (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) inkubáltuk. Az általunk vizsgált fehérjét jelölő sávokat 3, 3'-diaminobenzidinnel (Sigma) tettük láthatóvá.

Immunfluoreszcens jelölések vizsgálata konfokális mikroszkóppal

A z-tengely mentén, az egyes rétegek közti 0,5 µm vastagságú átfedéssel 1 µm vastagságú optikai szeleteket készítettünk egy Olympus FV1000 típusú konfokális mikroszkóppal. A fényképezéshez 60x nagyítású olaj-immérziós objektívet (NA: 1.42) használtunk nagy figyelmet fordítva arra, hogy a konfokális mikroszkóp beállításai (lézer erősség és intenzitás, konfokális apertúra mérete, gyorsítófeszültség) az optikai szeletek készítése során azonosak maradjanak, valamint ügyelve arra, hogy az immunreaktív foltokhoz tartozó pixelek ne legyenek túltelítettek. Az így elkészített felvételeket Adobe Photoshop CS5 szoftver segítségével dolgoztuk fel.

Három állat lumbális gerincvelőjének három-három véletlenszerűen kiválasztott metszetén, mindkét hátsó szarvában (összesen 18 mérési terület) elvégeztük az MGL és a korábban felsorolt markerek kolokalizációjának elemzését a következők szerint: első lépésben meghatároztuk a hátsó szarv I-II. lamina helyzetét a gerincvelői keresztmetszeteken, a fehérállomány-szürkeállomány határától kezdődő, 150 µm szélességű, dorzoventrális kiterjedésű területnek megfelelően. Ezen a területen belül - kikerülve a gerincvelőnek azon mediális területeit, ahol az axonok belépnek - egy 10x10-es standard négyzethálót helyeztünk a felületes hátsó szarv középső részére (az egyes négyzetek éleinek hossza 4 µm, a négyzetháló teljes mérete tehát 40x40 µm). A négyzetrács elhelyezését pontosító kritériumok a következők: (a) a gerincvelő hátsó szarva és a hátsó köteg határa beazonosítható az immunfestés intenzitása alapján, (b) a II. ill. III. lamina határa előzetes ultrastrukturális leírások alapján, a mielinizált axonok hiánya (II. lamina) vagy jelenléte (III. lamina) alapján azonosítható (Molander et al. 1984). A négyzetrácsot egyfajta, a vizsgálótól független szelekciós kritériumként használtuk a markerek kolokalizációjának vizsgálatánál. Ennek megfelelően a mennyiségi analízisnél csak azokat az immunreaktív foltokat vettük figyelembe, melyek a négyzetrács élein helyezkedtek el. Tekintettel arra, hogy az MGL-t jelölő immunreaktív foltok átmérője minden esetben

alulmaradt az axonterminálisok és különösen a gliasejtek méretéhez képest, a kolokalizáció megítélése nem volt lehetséges a hagyományos, a mindkét csatornában egyaránt pozitív pixelek számszerűsítésén alapuló módszerek (pl. Pearson koefficiens) segítségével. Ezért minden kettős immunfluoreszcens jelölés esetén, a fentebb leírtaknak megfelelően meghatározott (kettős festésenként 18) mérési területen a négyzet rácson elhelyezkedő és az adott markerre pozitív immunreaktív profilokat egyesével megvizsgáltunk, hogy azoknak bármelyik részlete mutat-e átfedést a másik markerrel. Az így kapott adatokból átlagot és standard hibát (standard error of the mean) számoltunk.

Elektronmikroszkópos vizsgálatok

Az MGL celluláris megoszlásának vizsgálatára immunhisztokémiai módszert alkalmaztunk. A metszeteket nyúl ellen termeltetett anti-MGL elsődleges antitesttel inkubáltuk 48 órán keresztül 4 °C-on, majd kecskében termeltetett, biotinilált anti-nyúl antitesttel további 12 órán át szintén 4 °C-on. Ezt követően a metszeteket avidin-biotinált tormaperoxidáz komplexszel inkubáltuk 5 órán keresztül szobahőmérsékleten, majd a reakciót 3,3-diaminobenzidin kromogén reakcióval vizualizáltuk.

Az így előkészített metszeteket 0.5%-os ozmium-tetroxid oldattal utófixáltuk 45 percig, majd víztelenítést követően Durcupan ACM gyantába ágyasztuk (katalógus sz.: 44610, Sigma, St. Louis, Missouri, USA). A további feldolgozásra kiválasztott metszeteket műgyantába újraágyasztuk, ultravékony metszeteket készítettünk belőlük, melyeket uranil-acetáttal és ólom-citráttal kontrasztoltuk. Az így előkészített metszeteket JEOL 1010 elektronmikroszkóp (Akishima, Tokió, Japán) segítségével vizsgáltuk, és Veleta 4MP TEM kamerával (EMSIS, Münster, Németország) felvételeket készítettünk.

A 2-AG izomerizációja vizes oldatban

A 2-AG izomerizációjának analízisét korábban leírt módszerek alapján (Higuchi et al. 2010; Zhang et al. 2010; Zoerner et al. 2012), a Debreceni Egyetem Szerves Kémiai Tanszékén és Növénytani Tanszékén dolgozó kollaborációs partnereink végezték, néhány módosítással: 0.625 µg/mL anandamidot tartalmazó 250 µl HBSS-t 2-AG-val (Cayman Chemical) vagy 1-AG-val (Cayman Chemical) spike-oltak, melyet acetonitrilben oldottak fel (végső koncentráció 0.25 µg/mL) majd 37 °C-on inkubáltak 1.25, 2.5, 5 és 10 percen keresztül. Ezt követően a mintákat folyékony nitrogénben tartották a feldolgozásig. A 0 perces mintákat a folyékony

nitrogénes fagyasztást követően spike-olták 2-AG-val. A minta előkészítés során a fagyasztott mintákhoz 10 µl trifluorecetsavat (TFA) és 1000 µl *n*-hexánt adtak, majd 1400 rpm-mel való rázatás közben felolvasztották. Ezzel az endokannabinoidokat közvetlenül az olvadásukat követően szerves fázisba vitték. A bázis-katalizált izomerizációt TFA hozzáadásával állították le. Ezt követően a fázisokat 13000 rpm-en 1 percig tartó centrifugálással választották el. A szerves fázis 800 µl-ét (hexán) tartalmazó aliquotot vákuumban szárazra párolták, majd újra feloldották 40 µl 0.1% hangyasavat tartalmazó acetonitrilben. Ezt követően a folyadékkromatográfia-tömegspektrometriai (LC-MS) vizsgálatokhoz ebből az oldatból 20 µl-t injektáltak. A kísérletet háromszor ismételték meg.

A 2-AG és az 1-AG mennyiségi meghatározása LC-MS-sel

A 2-AG és 1-AG mennyiségében és arányaiban történő változásait egy YMC-Triart C₁₈ (100 mm x 3.0 mm, 1.9 µm, 12nm, YMC Co., Ltd, Kyoto 600-8106, Japán) típusú kromatográfias oszlopon vizsgálták, Accela HPLC (Thermo Electron Corp, San Jose, CA, USA) rendszert használva, 0.1% (V/V) hangyasavat tartalmazó víz (A) -0.1% (V/V) hangyasavat tartalmazó acetonitril (B) gradienssel: 0 – 2 min: 60% B, 2 – 7 min: 60 – 90 % B, 7 – 13 min : 90% B. Az elválasztás 30 °C-on történt (kolonna hőmérséklet). Az LC rendszert egy Thermo LTQ XL tömegspektrométerhez (Thermo Electron Corp., San Jose, CA, USA) kapcsolták, pozitív módú HESI ionizációt alkalmazva. Az ESI paraméterek a következők voltak: porlasztó feszültség: 5 kV, forrás hőmérséklet: 280 °C, kapilláris hőmérséklet: 300 °C, porlasztógáz áram: 25 arb N₂, segédgáz áramlás: 8 arb N₂.

A mennyiségi meghatározás SRM módban történt, amikor a referencia tömegspektrumokkal azonos spektrumokat kaptak. Az 1-AG és 2-AG esetében a 379-287, az anandamid esetében a 348-287 átmenetet használták. Az 1-AG és a 2-AG retenciók idő alapján megkülönböztethető egymástól a fenti módszerrel. A kvantifikálás pontos kalibrációs egyenes segítségével történt. Belső standardként minden minta extrakció előtt anandamidot adtak a mintához. Minden vizsgált anyag esetében a visszanyerés 85% fölött volt, ami jó összhangban van a Zoerner és mts. (Zoerner et al. 2012) által közölt eredményekkel.

Plazmid konstrukció

A CB₁ COS7 sejtvonalon történő overexpressziójához pcDNA3-CB₁ típusú emlős expressziós vektort használtunk (Mary Abood ajándéka, Addgene plazmid # 13391, (Abood et

al. 1997). A transzfekció sikerességét egy, a pcDNA3-CB₁ plazmid CMV promótere által ellenőrzött CMV-Brainbow-1.0 H (Joshua Sanes ajándéka, Addgene plazmid #18720) típusú, piros fluoreszcens fehérjét (RFP) kódoló expressziós vektor koexpressziójával ellenőriztük (Livet et al. 2007).

Sejtkultúra és transzfekció

A COS7 sejteket (forrás: ATCC, a Debreceni Egyetem Biofizikai és Sejtbiológiai Intézete által fenntartva) 10%-os borjú szérummal (Sigma-Aldrich, USA), 100 U/ml penicillinnel, 100 µg/ml streptomycinnel és 2mM glutaminnal kiegészített DMEM (Gibco, USA) táptalajon növesztettük 90%-os konfluenciáig (10^4 sejt/cm²) 5% CO₂ és 95% oxigén keverékében 37°C-on. Az elektroporációt megelőzően a 75 cm² területű tenyésztő flaskák aljára letapadt sejteket Trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich, USA) felválasztottuk, centrifugáltuk (900 x g 10 min) és DMEM-ben reszuszpendáltuk (1.9×10^5 sejt/ml). Ezt a sejtsuszpenziót alkalmaztuk a CB₁/RFP kotranszfekcióhoz (4µg/ml RFP plazmid) és a kontroll RFP transzfekcióhoz (4µg/ml RFP plazmid) is. Az elektroporációt egy ECM830 típusú elektroporátorral végeztük (BTX, Harvard Apparatus, USA) 2 mm átmérőjű egyszerhasználatos pipettával (Model No. 620, BTX, Harvard Apparatus, USA) a következő protokoll szerint: 220V, két 500 µs hosszúságú impulzus 1 másodperces intervallumokkal.

Ca²⁺ mérések

A Ca²⁺ méréseket megelőzően a transzfektált COS7 sejteket 1 µM 0,01% pluronic F127-et tartalmazó Fluo-8-AM Ca²⁺ indikátor festékkel inkubáltuk 30 percig szobahőmérsékleten. A Ca²⁺ méréseket egy Olympus IX-81 inverz mikroszkópon végeztük, egy differential spinning dischez (DSD2, Andor Technology) kapcsolt Andor Zyla 5.5 sCMOS típusú kamera segítségével. Andor iQ3 szoftver használatával másodpercenkénti 15 felvétel sebességgel, 10x objektívvel (NA:0.25) 540x306 pixel felbontású képeket készítettünk (1400x790 µm látótérben 200-250 sejt). A Fluo-8 festék gerjesztését 488 nm-en, az emittált fényt pedig 510 nm felett detektáltuk. A kísérletek minden esetben megegyező mérési paraméterek mellett történtek (megvilágítás intenzitása, expozíciós idő, kiolvasási idő, sebesség). A fluoreszcencia intenzitás változásait az RFP-vel jelölt, éles kontúrral rendelkező COS7 sejteken vizsgáltuk, a sejtek teljes sejtfelszínét szabadkézzel kijelölve. Az intracelluláris Ca²⁺ koncentráció változásait a fluoreszcencia intenzitásnak az alapvonalhoz viszonyított változása alapján ítéltük meg ($\Delta F/F_0$,

ahol F_0 a kezdeti fluoreszcencia intenzitás értéke). A fluoreszcencia intenzitás változását az alkalmazott ligandra adott válasznak tekintettük, amennyiben az alkalmazását követően az adott sejten mért $\Delta F/F_0$ érték legalább 5 egymást követő felvételen magasabb volt, mint az alapvonal szórásának háromszorosa. A $\Delta F/F_0$ értékeket a Microsoft Excel 2013 programban számoltuk ki (Microsoft), a görbe alatti területeket pedig OriginPro 8.0 szoftverrel (Originlab, Northampton, MA) határoztuk meg. A statisztikai analízisekhez két-mintás nem parametrikus Mann-Whitney U tesztet használtunk. A különbségeket $p < 0.05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

EREDMÉNYEK

Az MGL immunreaktivitás megoszlása a gerincvelő hátsó szarvában

Az MGL gerincvelői megoszlásának vizsgálatára elvégzett peroxidáz alapú immunreakció erőteljes MGL immunreaktivitást mutatott a gerincvelő lumbális szakaszában, ahol ez mindenekelőtt a gerincvelő hátsó szarvának I. ill. II. laminájában volt megfigyelhető. A II. lamina belső része mutatta a legerősebb festődést, de a pontozott megjelenésű immunreakció a felületes hátsó szarv többi részén is erőteljesnek bizonyult. Míg a vad típusú egér ill. a patkány gerincvelőjében határozott, megoszlásában és intenzitásában hasonló MGL immunreaktivitás figyelhető meg, addig az MGL génkiütött egér gerincvelőjéből származó mintán a specifikus immunfestődés teljesen hiányzik, ami az antitest specificitását igazolja. Ezt erősíti a Western blot analízis eredménye is, ahol az immunfestés csak egy, az MGL fehérje molekulatömegének megfelelő 33 kDa molekulásúlyú sávot eredményezett.

Az MGL immunreaktivitás kolokalizációja nociceptív primer afferensek axonterminálisainak markereivel

A gerincvelő felületes hátsó szarva a perifériáról érkező szenzoros ingerületek, így a nociceptív primer afferensek által szállított fájdalmas információknak elsődleges átkapcsoló állomása. Ezen primer afferensek egy populációja a serkentő axonterminálisokra jellemző neurotransmitter, a glutamát mellett neuropeptidek, többek között CGRP felszabadítására is képes, így ezeknek a peptiderg primer afferenseknek a terminálisai a CGRP jelenléte alapján azonosíthatók. A nociceptív primer afferensek másik csoportjának glyocalyx izolektin-B4 kötő képességgel rendelkezik, ezek az ún. nem-peptiderg primer afferensek csoportját alkotják (Willis and Coggeshall 2004a).

A vizsgálataink során a négyzetháló vonalain azonosított 225 CGRP immunreaktív folt 17.0 ± 3.5 % volt MGL pozitív is, míg 387 MGL immunfestett profilból 10.0 ± 2.5 % bizonyult CGRP-re is pozitívnak. Erőteljes IB4 kötődés volt megfigyelhető a gerincvelői hátsó szarv II laminájának belső részében, ám annak ellenére, hogy ezen a területen a legintenzívebb az MGL elleni immunreakció, rendkívül alacsony kolokalizációt találtunk a két marker között. A 964 IB4 pozitív folt csupán 1.1 ± 0.3 %-a volt MGL-re is pozitív, míg az 1090 MGL immunreaktív profil csupán 1.1 ± 0.3 %-a volt IB4-ra is pozitív.

Az MGL kolokalizációja a glutamáterg és GABAerg interneuronok axonterminálisainak markereivel

A központi idegrendszer serkentő neuronjainak többségének jellemző neurotranszmittere a glutamát, így a serkentő neuronok többségének axonterminálisai valamely vezikuláris glutamát transzporter jelenléte alapján azonosíthatók. Mivel Alvarez és mts. azt találták, hogy dorzális rizotómiát követően a VGLUT2 immunreaktivitás érintetlen marad a gerincvelő hátsó szarvában (Alvarez et al. 2004), azaz döntően nem a primer afferensek axonterminálisaihoz kötődik, ezért a gerincvelő hátsó szarvi serkentő interneuronok axonterminálisainak a jelölésére a VGLUT2 elleni immunreakciót alkalmaztuk. Ugyanakkor mind a GABAerg, mind a glicinerg gátló interneuronok axonterminálisai expresszálják a vezikuláris GABA transzportert (VGAT, vezikuláris gátló aminosav transzporterként, VIAAT-ként is ismert) (Chaudhry et al. 1998), így a VGAT ideális markere a gátló interneuronok axonterminálisainak. A VGLUT2 elleni immunreakció erőteljes, pontszerű jelölődést mutatott az I. ill II. laminákban, ahol a 751 VGLUT2 immunreaktív foltból 10.7 ± 1.0 % mutatott MGL pozitivitást, míg a megszámlolt 1251 MGL immunfestett profil 6.3 ± 0.5 %-a volt VGLUT2 pozitív is.

A VGLUT2 mintázatahoz hasonlóan a VGAT homogén immunfestődést mutatott a gerincvelő hátsó szarvában. Az MGL-el való kolokalizációjának vizsgálata során azt találtuk, hogy a 609 VGAT-ot jelző jelölés csupán 2.4 ± 0.7 %-a volt MGL pozitív is, és az 524 MGL immunreaktív folt mindössze 2.9 ± 0.8 %-a köthető VGAT-tal jelölt gátló axonterminálisokhoz.

Az MGL immunreaktivitás kolokalizációja az asztrociták és mikroglia sejtek markereivel

Kutatócsoportunk korábban igazolta, hogy a gerincvelő hátsó szarvának gliasejtjei expresszálják az endokannabinoid rendszer molekuláris eszköztárának számos komponensét (Hegyi et al. 2009; Hegyi et al. 2012). Navarrete és Araque azt is igazolták, hogy a neuronok által termelt endokannabinoidok képesek az asztrocitákon található CB₁ receptorok aktiválására, melynek következtében a gliasejtekből felszabaduló glutamát visszahat a neuronokra, azok NMDA receptorait aktiválva (Navarrete and Araque 2008). Mivel a 2-AG által mediált endokannabinoid jelátvitel terminálásáért a központi idegrendszerben a 2-AG hidrolízisét katalizáló MGL a felelős több, mint 80%-ban, a továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy megtalálható-e az MGL a gerincvelői gliasejteken.

Korábbi adatokkal egybehangzóan azt találtuk, hogy a gerincvelő hátsó szarvában mind az asztrociták, mind a mikroglia sejtek specifikus markere erőteljesen expresszálódik. A GFAP immunreaktivitás alapján azonosított 674 asztrocita profiloknak 20.2 ± 0.9 %-a mutatott MGL pozitivitást, míg a megszámlolt 794 MGL-t jelölő immunreaktív folt 17.4 ± 1.1 %-át sikerült asztrocitákon azonosítani.

Az asztrocitáktól eltérően szinte teljes szegregációt találtunk az MGL és a mikrogliaikat jelölő CD11b immunreaktivitás között. A megszámlolt 455 CD11b immunreaktív profilnak mindössze 2.3 ± 1.4 %-a volt MGL pozitív is, illetve az 1245 MGL immunreaktív foltból csupán 1.0 ± 0.4 % volt mikroglia sejtekhez köthető.

Az MGL immunreaktivitás ultrastrukturális megoszlása

Az MGL sejtípusfüggő expressziójának meghatározása után az enzim szubcelluláris elhelyezkedését vizsgáltuk elektronmikroszkópos módszerekkel, DAB alapú immunhisztokémiai reakciót követően. A központi idegrendszer más területeihez hasonlóan az MGL-t jelölő immunprecipitátum mindenekelőtt az axonokban és a glia sejtek nyúlványaiban sikerült azonosítani, de ugyanakkor a neuronok perikaryonjában is találtunk jelölést. Az MGL immunjelölést, sejtípustól függetlenül, mindig a sejt plazmamembránjához asszociáltan, a sejtmembrán belső felszínén figyeltük meg. Az axonterminálisokban az immunprecipitátumot mindig a szinaptikus kapcsolatok közvetlen közelében találtuk, míg a neuronok perikaryonjaiban az MGL-t jelző DAB csapadékot az endoplazmás retikulum ill. Golgi készülék membránjához asszociáltan találtuk (ezen eredmények nincsenek feltüntetve).

A glianyúlványokban megfigyelt MGL jelölés erőteljes kompartmentalizációt mutatott, az immunprecipitátum jellemzően a glianyúlványok kisebb területein koncentrált. Fontos megjegyezni ugyanakkor, hogy az asztrociták ill. mikroglia sejtek nyúlványai - a sejtekre jellemző speciális markerek használata nélkül, pusztán a nyúlványok ultrastruktúrája alapján - elektronmikroszkóppal nem különböztethetők meg.

A 2-AG spontán 1-AG-vá alakul vizes oldatban

A 2-AG átrendeződését vizes közegben 1-AG-vá számos korábbi tanulmány dokumentálta. Saját *in vitro* kísérleteink körülményeinek a lehető legjobb szimulálása érdekében Hank-féle pufferelt sóoldattal (HBSS) 2-AG-val spike-oltunk, és a dekompozíciós görbét LC-MS segítségével $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on határoztuk meg. A folyadék-folyadék extrakció és az injekció során

fellépő pontatlanságok kiszűrésére anandamidot használtunk belső standardként, a 2-AG-val ellentétben ugyanis az anandamid a mintaelőkészítés és analízis során végig stabil marad (Zoerner et al. 2012). Az anandamidhoz tartozó csúcs nem változott az idő függvényében.

Más, RPMI médiumot használó kutatócsoportok által írt közleményekkel (Rouzer et al. 2002) megegyezően a 2-AG gyorsan átalakul 1-AG-vá még HBSS-ben is. Az átalakulás félélet ideje 16.16 ± 3.74 perc (szérum nélkül, extrapolált) és 8.81 ± 2.51 min (szérummal). A különbségek fakadhatnak a médiumból, és a 2-AG kezdeti koncentrációjából, hiszen Rouzer és mts. (Rouzer et al. 2002) $2 \mu\text{g/mL}$ -t használtak ($5 \mu\text{M}$ -al egyenlő), míg a mi kísérletes beállításainkkal az oldat koncentrációja megközelítette a sejtek vizsgálatakor alkalmazott koncentrációt (0.6 mM). Az LC-MS kromatogramon az 1-AG-nak és a 2-AG-nak megfelelő csúcsoaránya jelentősen változik 2 perc alatt. Hozzá kell azonban tennünk, hogy a mi kísérleteink sejt- illetve biológiai membránoktól mentes, tiszta fiziológiás oldatokkal végeztük, melyek segítették a minta előkészítésre szükséges időt illetve az izomerizációs műtermékek létrejöttét. Ez a megközelítés különbözik azoktól publikációktól, melyekben a 2-AG-t és az 1-AG-t a biológiai mintákból hosszadalmas tisztítási lépésekkel izolálták, melyek megnövelik a poszt-izolációs műtermékek kialakulását (Ferrer et al. 2003; Suplita et al. 2006).

Fontos megjegyezni, hogy az acil migráció bármilyen protonos oldószerben (vizet is beleértve) végbemehet, sőt fiziológiás pH mellett a jelenlévő OH^- -csoport katalizálja a reakciót (Rouzer et al. 2002). Ezért feltételezzük, hogy a 2-AG izomerizációja 1-AG-vá perces időskálán történik minden vizes oldatban, beleértve az általunk használtat is. Ezen túlmenően, a 2-AG átalakulását a fehérjék jelenléte fokozza, amely katalitikus felületként szolgál meggyorsítva a reakciós időt. Mivel a szervezetben szinte minden intra- vagy extracelluláris folyadék tartalmaz fehérjét, az acil migráció *in vivo* is releváns lehet.

A CB₁ receptor overexpressziója COS7 sejtekben

A kannabinoidok által mediált retrográd neurotranszmisszió általánosan elterjedt volta miatt elengedhetetlen, hogy az endokannabinoid ligandok, így a 2-AG felszabadulását követően rendelkezésre álljon a ligand eltávolítására valamilyen mechanizmus. Annak ellenére azonban, hogy korábbi közlemények alapján a központi idegrendszerben a 2-AG lebontásáért több mint 80%-ban az MGL felel, a gerincvelő felületes hátsó szarvának kannabinoid kontroll alatt álló sejtjeinek és szinapszisainak csak töredékében sikerült MGL-t kimutatni. Emiatt kutatócsoportunk alternatív, a 2-AG eltávolításában szerepet játszó mechanizmusokat is vizsgálni kívánt, elsőként a 2-AG mindenféle enzimtől függetlenül lezajló spontán átalakulását

1-AG-vá. Azonban az, hogy a 2-AG átalakulása 1-AG-vá inaktiválási mechanizmus-e vagy sem, a vonatkozó irodalom ellentmondásosan értékeli, mert korlátozottan áll rendelkezésre közlemény az 1-AG biológiai hatásairól, ha egyáltalán vannak. Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a 2-AG izomerizációját 1-AG-vá, illetve az acilvándorlás következményeit a 2-AG sejtekre kifejtett hatásának tekintetében, egy egyszerű *in vitro* modellt hoztunk létre, melyhez COS7 sejtekbe pcDNA3 CB1 plazmid vektort juttattunk be elektroporáció segítségével. A sejtekben a CB₁ overexpresszióját 5-7 passzálást követően immuncitokémiai vizsgálatokkal ellenőriztük. A CB₁-et jelölő immunreaktív foltok az RFP-t expresszáló sejtek membránjában ill. citoplazmájában is megfigyelhetők. A CB₁ mennyiségének meghatározására Western blot analízist végeztünk, amely igazolta, hogy a kontroll (nem transzfektált) COS7 sejtekhez viszonyítva a CB₁ expressziója a transzfektált sejtekben 5.6-szorosára emelkedik.

A 2-AG CB₁ receptoron kifejtett biológiai hatását az 1-AG alig módosítja

Mivel a 2-AG izomerizációjának következtében a mennyisége HBSS-ben fokozatosan csökken, ez a folyamat befolyásolhatja a 2-AG hatásosságát. Ennek vizsgálatára a CB₁-gyel transzfektált COS7 sejteket fluoreszcens Ca²⁺ indikátor festékkel töltöttük meg, majd vizsgáltuk az intracelluláris Ca²⁺ koncentráció változásait csökkenő koncentrációjú 2-AG adagolását követően. A CB₁-el transzfektált sejteket RFP pozitivitásuk alapján szelektáltuk. Minden Ca²⁺ mérés végén 180 μM ATP-t adtunk a sejtekhez az életképességük igazolására. Az egyes sejtek által adott maximális válasznak az ATP által kiváltott Ca²⁺ tranziens görbe alatti területét (AUC) vettük. A sejtek kannabinoidokra adott Ca²⁺ válaszában AUC értékeit a maximális válasz százalékaként kifejezett értéként adtuk meg. A sejteket csak egyszer kezeltük kannabinoid liganddal, hogy elkerüljük a CB₁ receptor deszenzitizációját. Ezekkel a kísérleti beállításokkal a sejteket először 1 μM koncentrációjú 2-AG-val kezeltük, melyet vagy rögtön a megfelelő koncentrációjú 2-AG oldat elkészítését követően („0-perces” kísérlet), vagy az oldat 2.5, 5 ill. 10 perces szobahőmérsékleten történő előinkubálása után adtunk a sejtekhez. Ahogy azt a 12. ábra és az 1. táblázat is mutatja, a frissen elkészített 2-AG oldat a sejtekben az intracelluláris Ca²⁺ koncentráció erőteljes tranziens emelkedését váltja ki. A „0-perces” kísérletben kapott AUC értékekkel szinte azonos értékek jellemzőek azokra a sejtekre, melyekhez a 2-AG oldatát 2.5 perccel az elkészítését követően adtuk hozzá, és csak kis változás figyelhető meg a sejtek Ca²⁺ válaszában a 2-AG további 2.5 perces előinkubálásával is. Tíz perccel a 2-AG oldat elkészítését követően is csak elhanyagolható különbség figyelhető meg a sejtek intracelluláris Ca²⁺ koncentrációjában a „0-perces” kísérlethez viszonyítva. Annak

ellenére tehát, hogy a 2-AG izomerizáció féléletideje a kísérleteinkben 8.8 percnél adódott, eredményeink alapján az acilvándorlás miatt folyamatosan csökkenő koncentrációjú 2-AG-t tartalmazó oldatok által kiváltott Ca^{2+} tranziensek görbe alatti területei nem különböztek egymástól szignifikánsan (13. ábra).

Az 1-AG aktiválja a CB_1 receptort, és koncentráció-dependens módon növeli a sejtek intracelluláris Ca^{2+} koncentrációját

Ahogy a 2-AG arachidonilcsoportha a glicerol második szénatomjáról az első pozícióban levőre vándorol, nem csak a 2-AG koncentrációja csökken folyamatosan, de ezzel egyidejűleg az 1-AG koncentrációja emelkedik, és ez a folyamat addig tart, amíg el nem éri a 2-AG és 1-AG közti egyensúlyt 1:9 aránynál. A 2-AG izomerizációjának biológiai következményeit azonban szinte lehetetlen a rendelkezésre álló irodalom alapján megítélni, ugyanis az 1-AG biológiai aktivitását vizsgáló kísérletes munkák ellentmondásos eredményeket közölnek. Több kutatócsoport úgy találta, hogy az 1-AG biológiailag inaktív molekula (Weis et al. 2010; Zoerner et al. 2012), sőt a kannabinoid receptorok egyikéhez sem kötődik (van der Stelt et al., 2002), amiből feltételezhető, hogy a 2-AG izomerizációja valódi inaktivációt jelent. Ezzel szemben azonban olyan adatok is rendelkezésre állnak, melyek szerint az 1-AG egy biológiailag aktív molekula, amely a CB_1 receptoron hatva megnöveli az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációt (Sugiura et al. 1999), sőt a TRPV1 receptor aktiválására is képes (Zygmunt et al. 2013). Így az acilvándorlás és az ennek következtében keletkező 1-AG hatással lehet az endokannabinoid szignalizációra, akár úgy, hogy elősegíti a 2-AG hatásának terminációját, de akár egy olyan új molekula létrejöttét is eredményezheti, amely a prekursorához hasonlóan ugyanazokat a receptorokat képes aktiválni. Ez utóbbi forgatókönyv egy, a biológiában elég szokatlan mechanizmus lenne, így ugyanis a CB_1 aktivációja és a kannabinoidokra adott válasz erőssége a két izomer relatív koncentrációjától, illetve hatékonyságától és hatásosságától függne. Ezért legelőször azt vizsgáltuk, hogy képes-e az 1-AG a CB_1 aktiválására. Ezért a CB_1 receptorral transzfektált COS7 sejteket 10 nM-tól 100 μM -ig terjedő koncentrációjú 1-AG oldattal kezeltük, és vizsgáltuk, hogy megfigyelhető-e bármilyen változás az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációjában az adott koncentrációjú 1-AG hatására. Az 1-AG képes Ca^{2+} tranzienszt kiváltani a transzfektált COS7 sejtekben, melynek amplitúdója az 1-AG koncentrációjától függ.

Hogy összehasonlítsuk a két izomer hatásosságát és hatékonyságát, megismételtük a kísérletet, ezúttal azonban a sejteket 2-AG-val kezeltük, melyhez az 1-AG esetében is alkalmazott

növekvő koncentráció skálát használtunk. Korábbi eredményeknek megfelelően (Sugiura et al. 1999) a 2-AG már nanomolos koncentrációban is képes volt Ca^{2+} tranziens kiváltására. Az 1-ill. 2-AG koncentráció-hatás görbéjéből azonban jól látszik, hogy a 2-AG hatékonysága ($\text{ED}=0.35 \mu\text{M}$) egy nagyságrenddel magasabb, mint az 1-AG-é ($\text{ED}=4.67 \mu\text{M}$).

Annak bizonyítására, hogy az 1-AG ill. 2-AG által indukált Ca^{2+} tranziensek a CB_1 receptor aktiválása következtében alakulnak ki, a szelektív CB_1 antagonistá AM251-t alkalmaztuk. Az $5 \mu\text{M}$ AM251 előkezelést követően a $10 \mu\text{M}$ 1-AG adagolásával a sejtek $99.37 \pm 0.51 \%$ -ban nem sikerült Ca^{2+} tranziens kiváltani, ami alátámasztja, hogy az 1-AG CB_1 receptor aktiválásán keresztül emeli az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációt. Az AM251 alkalmazása szinte teljesen kivédte a 2-AG által kiváltott Ca^{2+} tranziensek kialakulását, ugyanakkor az AM251 előkezelés ellenére a sejtek $2.33 \pm 0.89 \%$ -a továbbra is válaszolt $1 \mu\text{M}$ 2-AG-ra. Ezekben a sejtekben az AM251 ugyan mérsékelte a kiváltott Ca^{2+} tranziensek amplitudóját, de nem védte ki teljesen a sejtek 2-AG-ra adott válaszát. Az AM251 előinkubálás a sejtek $6,16 \pm 0,91$ százalékában az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció csökkenését okozta. Ez a jelenség valószínűleg a bazális endokannabinoid tónus gátlásának eredménye lehet, de az AM251, mint a CB_1 receptor inverz agonistája, a konstitutív CB_1 aktivitás mérséklésén keresztül hasonló hatást válthat ki. Így az alapvonal AM251 által indukált esése vélhetően szintén CB_1 -dependens, de a jelenség hátterében nem zárhatók ki más mechanizmusok, mint például az adenosin A_1 receptorok AM251 általi gátlásának szerepe sem.

A 2-AG koncentráció esésével párhuzamosan felhalmozódó 1-AG ellensúlyozza a CB_1 receptor mediált Ca^{2+} tranziensek gyengülését

A 2-AG izomerizációja egy nagyon érdekes szituációt teremthet, hiszen az arachidonil-glicerinn mindkét izomere szolgálhat a CB_1 receptor ligandjaként, ebből adódóan a CB_1 receptorok megfelelő ligandkötő helyeiért versengés alakulhat ki. Valószínűsíthető, hogy a két izomer relatív koncentrációja, hatékonysága és a környezetükben lévő szabad ligand kötő helyek együttesen határozzák majd meg, hogy az 1-AG és 2-AG kombinált hatása additív vagy antagonisztikus lesz-e. Hipotézisünk alapján az izomerizáció előrehaladtával az 1-AG felhalmozódásából fakadóan az antagonisztikus hatása egyre inkább előtérbe kerül, amely a 2-AG által kiváltott biológiai válasz csökkenésében nyilvánulhat meg. Ehhez először azt vizsgáltuk, hogy egy 10 perces időskálán hogyan változik a két izomer aránya. Méréseink alapján a 2-AG 1-AG-hoz viszonyított aránya 0.5, 2.6, 4.2 és 9.8 perccel a 2-AG HBSS-ben

való feloldását követően 9:1, 8:2, 6:4 és 5:5. Ennek modellezésére a COS7 sejteket vagy a 2-AG csökkenő koncentrációjú oldatával (0.9, 0.8, 0.6, 0.5 μM) kezeltük, vagy egy olyan keverékkel, amely ugyanilyen koncentrációjú 2-AG mellett, annak csökkenő koncentrációjának megfelelően, az izomerizációt tükrözőnővekvő koncentrációjú 1-AG-t (0.1, 0.3, 0.4, 0.5 μM) is tartalmazott. A 2-AG korábban felvett koncentráció-válasz görbéjének (15. ábra) megfelelően a 2-AG koncentrációjának fokozatos csökkenését a Ca^{2+} tranziensek gyengülése követte. Meglepő módon az 1-AG hatását a 2-AG által kiváltott Ca^{2+} tranziensekre nagyban befolyásolta a két izomer relatív koncentrációja. Habár a 0.1 μM koncentrációjú 1-AG hatása a 0.9 μM koncentrációjú 2-AG-val szemben gyengén antagonisztikusnak bizonyult, méréseink alapján az 1-AG hatása a koncentrációjának fokozatos növekedésével additívvá válik, és mérsékli a 2-AG mennyiségének csökkenése miatt várható csillapodást az indukált Ca^{2+} tranziensek amplitúdójában. A csökkenő koncentrációjú 2-AG és növekvő koncentrációjú 1-AG párok koncentráció-hatás görbéjének esése meglepően jól utánozta a 2-AG által kiváltott Ca^{2+} válaszok időfüggő, de nem szignifikáns változásait. Eredményeink azt is mutatják, hogy az 1-AG hatása a 2-AG által kiváltott Ca^{2+} válaszokra 0.8 μM 2-AG és 0.2 μM 1-AG aránynál neutrálisak, amely számításaink szerint 2.3 perccel az izomerizáció kezdetét követően áll be

MEGBESZÉLÉS

Az endokannabinoidok által mediált retrográd neurotranszmisszió a központi idegrendszeri szinapszisok működésének egyik kulcsfontosságú szabályozási módja. A 2-AG jelátviteli útvonal működése szigorúan szabályozott folyamat, melynek hatékonysága és időtartama elsősorban az erőteljesen aktivitásfüggő ligand szintézisnek, valamint a ligand degradációjának egymáshoz viszonyított aránya befolyásol. A központi idegrendszerben a 2-AG lebontásának döntő részét végző MGL-t preszinaptikus terminálisok citoplazmájában mutatták ki (Straiker et al. 2009; T P Dinh et al. 2002; Gulyas et al. 2004), így az enzim lokalizációja ideális az ugyancsak preszinaptikusan elhelyezkedő CB₁ receptoron ható 2-AG lebontására.

MGL az axonterminálisokon és glia sejteken

Az MGL expressziója a központi idegrendszer számos területén heterogén mintázatot mutat. A kisagyban például erőteljes MGL expresszió figyelhető meg a parallel rostok terminálisiban, azonban ez annak ellenére sem mondható el a kúszórostok, valamint a kosár- és csillagsejtek axonterminálisairól, hogy bővelkednek CB₁ receptorban (Ohno-Shosaku et al. 2012). Ez a heterogenitás figyelhető meg a gyrus dentatusban is, ahol az MGL a CB₁ pozitív és CB₁ negatív GABA-erg interneuronok axonterminálisiban egyaránt kimutatható (Uchigashima et al. 2011).

A CB₁ jelenlétét sikerült kimutatni nemcsak az agyban, de a gerincvelőben is, melynek hátsó szarva a fájdalommal kapcsolatos ingerek feldolgozásának egyik legfontosabb központja. Kutatócsoportunk korábbi eredményei igazolták, hogy a CB₁ jelen van a peptiderg primer afferensek axonterminálisainak több mint felén, és a nem peptiderg primer afferensek axonterminálisainak több mint 20 %-án. A serkentő interneuronok axonterminálisainak egyharmada és a gátló interneuronok axonterminálisainak kb. 20 %-a ugyancsak expresszál CB₁ receptort (Hegyi et al. 2009). Jelen kísérleteink során azt találtuk, hogy a peptiderg primer afferensek axonterminálisainak csupán 17 %-a és a serkentő interneuronok axonterminálisainak csupán 10 %-a mutatott MGL pozitivitást. A nem peptiderg primer afferensek, illetve a gátló interneuronok axonterminálisain azonban csak rendkívül csekély százalékában sikerült MGL-t azonosítani. Ezek a morfológiai adatok azt mutatják, hogy az MGL a gerincvelő felületes hátsó szarvának CB₁ receptort hordozó axonterminálisainak csak töredékében expresszálódik, ráadásul szinte teljesen hiányzik a nem peptiderg primer afferensek és gátló interneuronok axonterminálisáiból. Ebből arra következtethetünk, hogy a 2-AG mediált retrográd jelátvitel intenzitása és időbeli lefutása a gerincvelőhátsó szarvának

CB₁ pozitív axonterminálisain az MGL jelenlététől vagy hiányától függően nagyon változatos lehet. Így a 2-AG felszabadulás előidézhetheti a gyors és rövid ideig tartó DSE kialakulását az MGL-t tartalmazó szinapszisokban, melyet a peptiderg primer afferensek és serkentő interneuronok axonterminálisainak egy része alkot. Ugyanakkor a CB₁ receptor expresszió alapján a gátló interneuronok axonterminálisainak nagyjából 20 %-ban alakulhat ki a 2-AG mediált DSI, amely - az 2-AG bontását végző MGL hiánya miatt - valószínűleg egy időben elhúzódó, illetve elnyújtottabb lecsengésű szabályozó mechanizmus lehet a gerincvelő hátsó szarvában. A 2-AG inaktiválásában ugyanakkor részt vehetnek a szinapszisok közvetlen közelében található asztrociták, melyek a nyúlványaikon expresszáldó MGL segítségével járulhatnak hozzá a 2-AG lebontásához azon az axonterminálisokon esetében is, amelyekben teljesen hiányzik az MGL.

Korábbi tanulmányokban bizonyították már az MGL jelenlétét gliasejteken, többek között a kisagy radiális glia sejtjein, a gyrus dentatus és a hypothalamus asztrocitáin, csakúgy mint tenyésztett mikroglia sejteken, azaz a neuronok mellett a gliasejtek is képesek a 2-AG lebontására (Walter and Stella 2003; Walter et al. 2004; Stella 2009).

Eredményeink alapján hasonlóképpen a gyrus dentatus és hypothalamus asztrocitáihoz a gerincvelő felületes hátsó szarvában található asztrociták, de nem mikroglia sejtek egy populációja MGL-t expresszál. Így az asztrociták szinapszisokkal való szoros közelsége befolyásolhatja a stimulus-dependens módon felszabaduló 2-AG mennyiségét az extracelluláris közegben, különös tekintettel azokra a primer afferens- és serkentő interneuronok axonterminálisaira, amelyek CB₁-t is hordoznak, és amelyeknek aktivációja poszt-szinaptikus 2-AG felszabadulást okozhat (Di et al. 2013). Az asztrociták funkcionális változásainak következtében változhat a pufferelő képességük is, melynek következtében a 2-AG kidiffundálhat a felszabadulásának helyétől és heteroszínaptikusan hathat (Kano et al. 2009; Uchigashima et al. 2011; Ohno-Shosaku et al. 2012; Di et al. 2013).

Érdemes megjegyezni, hogy a mikroglia sejtek az asztrociták és a neuronok mellett fontos szerepet játszanak a gerincvelői endokannabinoid rendszer működésében, hiszen CB₁-t expresszálnak és 2-AG felszabadításra is képesek (Hegyi et al. 2009; Hegyi et al. 2012). Korábbi irodalmi adatokkal összhangban ugyanakkor az MGL expresszióját a mi munkacsoportunknak sem sikerült bizonyítani a mikroglia sejteken. Bár a kísérleteink nem terjedtek ki további, a 2-AG lebontását végző enzim vizsgálatára, feltételezzük, hogy a 2-AG degradációját a gerincvelői mikrogliaiban - BV-2 sejtekhez hasonlóan - az ABHD6 végzi (Marrs et al. 2010; Muccioli et al. 2007). Mindez felveti annak a lehetőségét, hogy az asztrociták és mikroglia sejtek különböző szerepet játszanak a gerincvelői szintű

fájdalomfeldolgozás kannabinoid-mediált szabályozásában, és a különböző gliasejtek részvétele a patológiás fájdalom indukciójában és fenntartásában a 2-AG eltérő lebontási mechanizmusai miatt szintén nagyon különböző lehet.

Tekintettel arra, hogy az MGL-t hordozó szinapszisok és gliasejtek aránya elmarad a CB₁ receptort expresszálókétól, feltételezzük, hogy a kannabinoid kontroll alatt álló, de MGL-t nem tartalmazó sejtekben a 2-AG lebontásáért más mechanizmus felelős. Ugyan a 2-AG lebontásában az MGL mellett további enzimek is részt vesznek (Muccioli 2010; Marrs et al. 2010), jelenleg semmilyen adat nem áll rendelkezésre az ABHD6/12 vagy a FAAH gerincvelői expressziójáról. Így azoknak a szinapszisoknak és gliasejteknek az esetében, amelyeket a 2-AG - CB₁ jelpálya szabályoz, de MGL-t nem expresszálnak, saját és irodalmi adatok alapján sem tudunk nyilatkozni arról, hogy milyen mechanizmus felelős a 2-AG eltávolításáért.

Fontos megemlíteni továbbá, hogy kísérleteinkkel, illetve az MGL gerincvelői megoszlását bemutató közleményünkkel jóformán egyidejűleg egy másik magyar kutatócsoport is igazolta az MGL jelenlétét a gerincvelő felületes hátsó szarvában, és munkájuknak a mi adatainkkal tartalmilag átfedő részei az eredményeinket szinte pontról pontra megerősítették (Horváth et al. 2014).

Az acilmigráció szerepe a 2-AG degradációjában

Az endokannabinoidok a szervezet legáltalánosabban előforduló szabályozó molekulái közé tartoznak, melyek szerepét számos fiziológias és patológiás folyamatban bizonyították. Habár az endokannabinoid rendszer működését szinte minden szervben és szövettípusban tanulmányozták (Kano et al. 2009; Maccarrone et al. 2015), a kannabinoid jelátvitel számos kérdését nem sikerült eddig megnyugtatóan tisztázni (Piomelli 2014). Ezek közül az egyik a 2-AG koncentrációját csökkentő és hatását termináló komplex folyamatok közé tartozik, tekintve hogy a leginkább tanulmányozott enzimatis útvonalak mellett a 2-AG, mint a 2-monoglicerol család tagja, termodinamikailag instabil molekulaként hajlamos az acilvándorlásra, melynek eredményeként 1-AG keletkezik (Martin 1953). Ez a jelenség nagyban megnehezíti a 2-AG biológiai mintákból történő mennyiségi kimutatását (Vogesser and Schelling 2007; Astarita and Piomelli 2009; Pastor et al. 2014), és komplikálja a 2-AG CB₁ és TRP receptorokon kifejtett hatásának értelmezését (Zygmunt et al. 2013). A kísérleteinkben a 2-AG 1-AG-vá alakulásának kinetikáját vizsgáltuk és azt tapasztaltuk, hogy az izomerizáció viszonylag gyors folyamat, mely HBSS-ben 37 °C-on 16.16 perces, míg 10% szérumot tartalmazó HBSS-ben 8.8 perces felezési idővel megy végbe. Habár a kísérleteinket

sejtmentes fiziológiás oldatban végeztük, ezek az eredmények mégis utalhatnak a 2-AG izomerizációjának biológiai relevanciájára sejtes rendszerekben is, hiszen a 2-AG-t degradáló hidrolázok sejtsűrűségtől függően 19-28 perces felezési idővel bontják a 2-AG-t. Ebből következik, hogy az acilvándorlás és ennek következtében az 1-AG kialakulása akár kétszer gyorsabban is végbemehet, mint az enzimatis inaktiváció. Fontos megjegyezni, hogy eredményeink - azaz a közegben megjelenő és felhalmozódó 1-AG - nem kérdőjelezi meg az idézett folyóirat 2-AG hidrolízisére vonatkozó állításait, hiszen a vizsgált hidrolázok egyformán fogadják el az 1- és 2-monoglicerolokat, és a katabolizmusuk ugyanazon végtermékek, azaz arachidonsav és glicerol kialakulásához vezet (Törnqvist and Beltrami 1976; Di Marzo et al. 1999). Olyan endokannabinoid-mediált jelátviteli folyamatokban azonban, amelyekben a 2-AG szignalizáció féléletideje rövidebb, mint az izomerizáció, a keletkező 1-AG mennyisége és hatása valószínűleg elhanyagolható. Ez a helyzet állhat fenn a 2-AG által mediált retrográd szinaptikus transzmisszió esetében is, ahol a depolarizáció indukált rövid plaszticitási folyamatok (DSE és DSI) féléletideje 15-40 másodperc közé esik (Kano et al. 2009).

Korábbi tanulmányok alapján a 2-AG izomerizációja mindenekelőtt a pH-tól és részben a közeg ionos összetételétől függ, ezekben a kísérletekben azonban a mi méréseinknél gyorsabb acilvándorlást találtak: szérumentes közegben az izomerizáció féléletidejét 10 percben, szérummal dúsított RPMI táptalajban 2.3 percben határozták meg 37 °C-on. Habár a jelen és korábbi vizsgálatok eredményei közötti különbséget nem tudjuk teljes mértékben magyarázni, feltételezzük, hogy a gyorsabb acilvándorlás hátterében az alapvetően gazdagabb RPMI táptalaj állhat. Az általunk leírt, valamivel lassabb kémiai átalakulás ugyanakkor továbbra is azt mutatja, hogy a monoacil-glicerineket lebontó enzimek jelenléte ellenére a 2-AG vizes közegbe történő felszabadulása 1-AG kialakulásához, és valószínűleg átmeneti felhalmozódásához is vezet, emiatt az 1-AG esetleges hatását, vagy éppen inaktivitása a CB₁ receptorokon egyaránt fontos biológiai következményekkel járhat. Ezért a következőkben azt vizsgáltuk, hogy van-e az 1-AG-nak CB₁-mediált biológiai hatása, és azt találtuk, hogy az 1-AG dózisfüggő módon átmenetileg növeli az intracelluláris Ca²⁺ koncentrációt, ami korábbi tanulmányokkal összhangban (Sugiura et al. 1999) azt mutatja, hogy az 1-AG valóban bioaktív molekula mely képes a CB₁ aktiválására. Méréseink alapján az 1-AG EC₅₀ értéke egy nagyságrenddel magasabb, mint a 2-AG-é, illetve a 2-AG által kiváltott maximális válasz is nagyobb a CB₁-gyel transzfektált COS7 sejteken, azaz a 2-AG hatékonysága és hatáserőssége is magasabb. Ettől függetlenül az 1-AG ugyanúgy a CB₁ agonistájának tekinthető, így a 2-AG izomerizációja nem tekinthető nem-enzimatis inaktivációs folyamatnak, hiszen egy új,

bioaktív molekula kialakulásához vezet. Hozzá kell azonban tennünk, hogy fiziológiai körülmények között, sejtes környezetben és különösen a 2-AG hidrolitikus enzimeinek jelenlétében az 1-AG mennyisége valószínűleg sosem ér el olyan magas koncentrációt, amely képes maximális válasz kiváltására.

A 2-AG felszabadulását követő acilmigráció mégis egy különleges helyzetet teremthet, melyben a monoacilglicerol koncentráció viszonylag állandó, azonban a két izomer aránya gyorsan változik, hiszen a 2-AG-t a fokozatosan keletkező 1-AG helyettesíti, így a két ligand versenghet a CB₁ receptor ligandkötő helyeiért. Ezért a következőkben ennek a folyamatnak a következményeit vizsgáltuk olyan oldatok készítésével, melyben a két ligand aránya tükrözi a mennyiségükben végbemenő változásokat az idő függvényében. Az idő előrehaladtával a 2-AG által indukált Ca²⁺ tranziensek amplitudója fokozatosan, de nem szignifikáns mértékben csökkent. Ezt a folyamatot meglepően pontosan utánózták az izomerek mesterségesen előállított keverékei, melyek az izomerizáció előrehaladtának egyes időpontjait voltak hivatottak tükrözni. Ugyanakkor mindkét kísérlet eredményei nagyban eltértek attól az erőteljes és szignifikáns csökkenéstől, melyet a pontosan kimért, csökkenő mennyiségű 2-AG-val kiváltott Ca²⁺ tranziensek amplitudójában tapasztaltunk. Ez arra enged következtetni, hogy a felhalmozódó 1-AG stabilizálja a kannabinoid szignalizációt, és elfedi az izomerizáció miatt csökkenő 2-AG koncentráció biológiai következményeit. Ez megmagyarázhatja, hogy a 2-AG termodinamikai instabilitása miért nincs szembevetendő hatással az olyan kísérletes felállásokban, melyeknek időtartama 5-10 perc vagy még hosszabb (Szabo et al. 2006; De Luca et al. 2014; Stanley and O'Sullivan 2014; Griebel et al. 2015).

Az 1-AG CB₁-en keresztül kifejtett biológiai hatása, valamint az, hogy az 1-AG képes a 2-AG viszonylag gyors átalakulásának következményeit kompenzálni, egy olyan mechanizmusra utalhatnak, amely segít a 2-AG hatását és talán egy endokannabinoid tónust is fenntartani.

Eredményeink interpretációjának azonban megvannak a limitációi. Kísérleteinket transzfektált sejteken végeztük, melyek a sejtek fiziológiáját, metabolizmusát, sejtek közötti kapcsolatait és extracelluláris közegét tekintve a legtöbb *in vivo* körülménytől alapvetően különbözhetnek. Ráadásul a monoacilglicerolokat hidrolizáló enzimek a két izomer arányát valószínűleg erőteljesen képesek befolyásolni. Az MGL ugyanis mindkét izomert egyformán elfogadja szubsztrátként, azonban az ABHD6 és ABHD12 az 1-AG-t preferálja a 2-AG-val szemben (Navia-Paldanius et al. 2012). Ezért ezen enzimek esetlegesen eltérő expressziója különböző sejttípusokon és szövetekben az 1-AG 2-AG-hoz viszonyított arányát különbözőképpen módosíthatja. Az izomerizáció *in vivo* jelentőségét ezen felül a 2-AG-nak az alapvetően vízbázisú extracelluláris közegbe történő felszabadítása kevésbé ismert folyamat (Bisogno et

al. 1997; Sugiura and Waku 2000; Di Marzo et al. 2005), melyet a 2-AG sejtmembránba való beoldása és abban a vándorlása laterális diffúzióval nagyban bonyolít, hiszen lassíthatja vagy akár teljesen meg is akadályozhatja az acilvándorlást (Makriyannis et al. 2005; Hurst et al. 2010). Mindezek alapján a gyors endokannabinoid-mediált jelátvitel, mint például a homoszinaptikus retrográd neurotranszmisszió esetén valószínűleg a 2-AG szerepe meghatározó. A kannabinoidok elnyújtott biológiai hatásai kapcsán azonban, mint amilyen a tónusos kannabinoid receptor aktiváció (Sagar et al. 2010), az 1-AG részvétele a kannabinoid jelátvitel erősségének stabilizálásában és a kannabinoid receptor aktiváció fenntartásában kiemelten fontos lehet. Ez utóbbi esetben felmerül a kérdés hogy vajon a két izomerrel történő hosszantartó inkubálás előidézheti-e a CB₁ különböző mértékű deszenzitizációját, tovább bonyolítva ezzel az izomerizáció végkimenetelét.

ÖSSZEFOGLALÁS

A nociceptív információfeldolgozásért felelős neuronhálózatok megfelelő működését számos mechanizmus szabályozza, többek között az endokannabinoid rendszer is. Ezt bizonyítja az endokannabinoid rendszer komponenseinek a jelenléte a fájdalomfeldolgozásban érintett idegrendszeri területeken, így a gerincvelő felületes hátsó szarvában is. Laboratóriumunk korábbi eredményei alapján a 2-AG hatását közvetítő CB₁ és a szintéziséért felelős enzim jelenléte is kimutatható a gerincvelő hátsó szarvának felületes lamináiban, ezzel szemben kevés adat áll rendelkezésünkre a lebontásáért felelős enzim, az MGL gerincvelői szintű expressziójáról. Ezért kísérleteink egyik célja az MGL celluláris és ultrastrukturális megoszlásának vizsgálata volt rágsálók gerincvelőjének felületes hátsó szarvában, immunhisztokémiai módszerek segítségével, fény- és elektronmikroszkópos szinten egyaránt. Eredményeink alapján a peptiderg primer afferensek közel 20%-a és a serkentő interneuronok axonterminálisainak 10%-a volt MGL pozitív. Ezen túlmenően az asztrociták 20%-ában figyelhető meg az MGL jelenléte a gerincvelő I. ill. II. laminájában. Eredményeink ugyanakkor azt is kimutatták, hogy a gerincvelő neuronális és gliális elemei közül a nem peptiderg primer afferensek és gátló interneuronok axonterminálisain illetve a mikroglia sejteknek csupán kevesebb mint 3%-án mutatható ki az MGL. Ez meglepő adat ha figyelembe vesszük, hogy ezen képletek jelentős részében CB₁ expresszió figyelhető meg, tehát valószínűleg endokannabinoid kontroll alatt állnak, ám ebben az esetben a 2-AG hatásának terminálásáért minden bizonnyal más enzim felelős.

A 2-AG eliminálásában ugyanakkor nem elhanyagolható a 2-AG termodinamikai instabilitása, melynek következtében a 2-AG hajlamos a spontán molekuláris átrendeződésre, tehát a molekula arachidonil csoportja a glicerin 2. szénatomjáról az 1. szénre vándorol. Ezt a folyamatot acilvándorlásnak hívjuk és következtében egy termodinamikailag stabilabb molekula, az 1-AG keletkezik. Az acilvándorlás az endokannabinoid szignalizáció egyik befolyásoló tényezője lehet, hiszen az így keletkező 1-AG támogatja a 2-AG eliminációját ha nincs biológiai aktivitása. Azonban az 1-AG a 2-AG-hez való szerkezeti hasonlósága miatt aktiválhatja a CB₁-t, ebben az esetben a 2-AG izomerizációja az endokannabinoid rendszer működésének egy szokatlan finomhangolását jelentheti, melyben a 2-AG indukált válasz erősségét és időbeli lefutását a keletkező 1-AG által kiváltott szignalizáció befolyásolhatja. Ezért további kísérleteinkben CB₁-gyel transzfektált COS7 sejteken vizsgáltuk, hogy mutat-e biológiai aktivitást az 1-AG, és ha igen, hatással van-e az izomerizáció miatt folyamatosan csökkenő koncentrációjú 2-AG hatásaira az egyidejűleg növekvő koncentrációjú 1-AG.

Eredményeink azt mutatják, hogy az 1-AG a CB₁ aktiválásán keresztül Ca²⁺ tranzienszt indukál, tehát az 1-AG bioaktív metabolitnak, illetve a CB₁ agonistájának tekinthető. Fontos azonban megjegyezni, hogy a 2-AG-nak megfelelő hatás eléréséhez egy nagyságrenddel nagyobb koncentrációjú 1-AG szükséges, azaz az izomerizációval keletkező 1-AG gyengébb agonista. Kísérleteinkből kiderült továbbá, hogy alacsony koncentrációban az 1-AG a 2-AG kompetitív antagonistájaként viselkedik, a fokozatosan növekvő koncentrációjú 1-AG azonban additív hatásának bizonyult, ugyanis a folyamatosan csökkenő koncentrációjú 2-AG mellett kialakuló 1-AG hatékonyan kompenzálta a 2-AG mérséklődő biológiai hatásait.

Eredményeink azt mutatják, hogy a 2-AG izomerizációjával kialakuló 1-AG bioaktív ligandnak tekinthető, és elsősorban időben elhúzódó, tónusos kannabinoid dependens biológiai jelenségek kialakításához járul hozzá. Mivel az MGL gerincvelői expressziója a vártnál kisebb mértékűnek mutatkozott és az acilvándorlás sem járul hozzá a 2-AG mediált jelátviteli folyamatok terminálásához, feltételezzük, hogy a gerincvelő felületes hátsó szarvában további 2-AG bontó enzimek is fontos szerepet játszhatnak a 2-AG degradációjában.



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/25/2018.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Dócs Klaudia
Neptun kód: DFAZTG
Doktori Iskola: Idegstudományi Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Dócs, K.**, Mészár, Z. M., Gonda, S., Kiss-Szikszai, A., Holló, K., Antal, M., Hegyi, Z.: The Ratio of 2-AG to Its Isomer 1-AG as an Intrinsic Fine Tuning Mechanism of CB1 Receptor Activation. *Front. Cell. Neurosci.* 11, 1-13, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fncel.2017.00039>
IF: 4.555 (2016)
2. **Dócs, K.**, Hegyi, Z., Holló, K., Kis, G., Hegedűs, K., Antal, M.: Selective axonal and glial distribution of monoacylglycerol lipase immunoreactivity in the superficial spinal dorsal horn of rodents. *Brain Struct. Funct.* 220 (5), 2625-2637, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00429-014-0813-x>
IF: 5.618





További közlemények

3. Balázs, A., Mészár, Z. M., Hegedűs, K., Kenyeres, A., Hegyi, Z., **Dócs, K.**, Antal, M.: Development of putative inhibitory neurons in the embryonic and postnatal mouse superficial spinal dorsal horn.
Brain Struct. Funct. 222 (5), 2157-2171, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00429-016-1331-9>
IF: 4.698 (2016)
4. Holló, K., Ducza, L., Hegyi, Z., **Dócs, K.**, Hegedűs, K., Bakk, E., Papp, I., Kis, G., Mészár, Z. M., Bardóczi, Z., Antal, M.: Interleukin-1 receptor type 1 is over-expressed in neurons but not in glial cells within the rat superficial spinal dorsal horn in complete Freund adjuvant induced inflammatory pain.
J. Neuroinflammation. 14 (1), 1-18, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12974-017-0902-x>
IF: 5.102 (2016)
5. Javdani, F., Holló, K., Hegedűs, K., Kis, G., Hegyi, Z., **Dócs, K.**, Kasugai, Y., Fukazawa, Y., Shigemoto, R., Antal, M.: Differential expression patterns of K⁺/Cl⁻ cotransporter 2 in neurons within the superficial spinal dorsal horn of rats.
J. Comp. Neurol. 523 (13), 1967-1983, 2015.
IF: 3.331

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 23,304

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
10,173**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2018.01.25.

