

Pohyb kanabinoidních receptorů na povrchu kortikálních neuronů *in vitro*

ABSTRAKT

Presynaptické kanabinoidní receptory (CB1R) jsou hlavní mediátory retrográdní synaptické plasticity na excitačních i inhibičních synapsích a účastní se mnoha fyziologických procesů. Zda presynaptické receptory, jako je například CB1R, mají schopnost funkčně relevantních pohybů na povrchu membrány neuronů, není doposud známo. Analyzovali jsme laterální pohyb nativních CB1R na povrchu kortikálních neuronů s použitím vysoko-rozlišovací mikroskopie a nanočástic (Q-dots) = single quantum dot imaging. Zjistili jsme, že CB1R jsou vysoce mobilní a rychle difundující receptory dovnitř a vně presynaptických oblastí. Agonistou vyvolaná desenzibilizace snížila počet povrchových CB1R a zároveň dramaticky zpomalila laterální pohyb CB1R na povrchu neuronů. Desenzibilizace specificky odstranila CB1R ze synapsí a zvýšil počet imobilních receptorů v extrasynaptickém prostoru.

Naše výsledky ukazují, že snížení laterální mobility a odstranění receptorů ze synapsí může být jedním z hlavních mechanismů desenzitizace CB1R – nejčastěji se vyskytujícího GPCR (receptor spřažený s G proteinem) v mozku.

METODIKA

Sledování jednotlivých receptorů a výpočet povrchové difúze: Pro specifické trekování povrchových CB1 receptorů v reálném čase jsme použili polyklonální protilátky proti extracelulární N-koncové doméně CB1R vázané se sekundární protilátkou konjugovanou s nanočásticí 655 nm (Qdots). Synapse byly vizualizovány pomocí fluorescenčního markeru aktivních mitochondrií, MitoTrackerGreen, který kolokalizuje s presynaptickými klastry synaptotagminu. Real-time videa pohybů CB1R-Qdots byly natáčeny na povrchu kortikálních neuronů starých 9 až 10 dnů *in-vitro* (32°C). Koeficient okamžité difúze (D), procento mobilních receptorů, doba setrvání na synapsi, procento synaptických receptorů, a prostorová difúze (mean square displacement - MSD) byly vypočítávány z rekonstruovaných CB1R-Qdot trajektorií.

ZÁVĚR

Naše data poprvé popisují dynamické chování nativních presynaptických CB1R a naznačují, že jemné regulace mobility hrají důležitou roli v komplexní molekulové kaskádě agonistou indukované desenzibilizace CB1R. Výše popsany mechanismus má významné důsledky pro studium mechanismů desenzitizace (tolerance) dalších presynaptických GPCRů.

Klíčová slova: pohyb receptorů, CB1R, G-proteinem spojený receptor (GPCR)