

'Virusinio somatostatino promoterio kontroliuojamų baltymų ekspresijos specifškumo tikrinimas imunohistochemijos metodais žiurkės smegenų riekelėse'

'Analysis of viral somatostatin promoter specificity by immunohistochemical staining of adult rat brain sections following expression of viral proteins'

Projekto vykdytojai: Gytis Baranauskas, Andrius Kaselis, Tatiana Tkatch

Siūlomas projektas yra tęsinys visuotinės dotacijos projekto VP1-3.1-ŠMM-07-K-02-05 "Dėmesio ir sensorinės informacijos virsmų mechanizmų tyrimas panaudojant genetinius neuronų aktyvumo moduliacijos metodus" ir kartu yra dalis Neurofiziologijos laboratorijos Neuromokslų institute tyrimų vystymo strategijos, kurios tikslas yra išmokti naudoti šiuolaikinius metodus, tame tarpe optogenetinius. Optogenetiniai metodai leidžia su šviesos pagalba kontroliuoti neuronų aktyvumą ir tokiu būdu tirti jų funkciją. Kadangi šviesai jautrūs kanalai yra ekspresuojami genų, kurių aktyvumą kontroliuoja promoteriai, galima pasiekti šviesai jautrių kanalų ekspresiją tik tam tikrose neuronų grupėse, ir tokiu būdu tirti būtent tų specifinių neuronų grupių funkciją. Šis projektas kaip tik ir siekia sukurti promoterį, tinkamą virusinei šviesai jautrių kanalų ekspresijai išimtinai somatostatino neuronuose.

Somatostatino neuronai sudaro apie trečdajį visų interneuronų žievėje ir jų yra daug kitose smegenų srityse, tame tarpe ir viršutiniuose kalneliuose, kuriuos tiriamo mūsų Neurofiziologijos laboratorijoje. Yra jau parodyta, kad regos žievėje pelėse somatostatino neuronai dalyvauja regos atsakų sumavime. Deja, kol kas nėra žinoma, ar tokia pat funkciją somatostatino neuronai atlieka viršutiniuose kalneliuose. Dar daugiau, nėra žinomos biofizikinės somatostatino neuronų savybės viršutiniuose kalneliuose. Todėl mes norime iširti neurofiziologiniais ir optogenetiniais metodais šių ląstelių savybes ir jų funkciją. Šis projektas būtų pirmas svarbus žingsnis šia kryptimi.

Konkrečiai yra siūloma patikrinti mūsų turimo viruso su mūsų sukurtu promoteriu (darbą atliko dr. Tatiana Tkatch) ir ekspresuojančio žaliajį fluorescuojantį baltymą (angl. GFP) ekspresiją žiurkės viršutinių kalnelių neuronuose. Mes darome šio viruso injekcijas į viršutinius kalnelius ir galime stebėti fluorescencija su mūsų turimu mikroskopu ir video kamera Andor Neo, kuri tinka fluorescencijos stebėjimui, kaip žadinantis šviesos šaltinis yra naudojamas 480 nm bangos ilgio LEDas. Mes taip pat darome viruso transdukcijos eksperimentus žievės neuronų kultūrose (darbą atliko dr. Andrius Kaselis) ir paskui fiksuotos kultūros buvo dažomos antikūnais MAP2, kuris skirtas neuronų žymėjimui, ir somatostatino antikūnais. Gauti rezultatai rodo, kad visos virusą ekspresuojančios ląstelės yra neuronai ir pusė virusą ekspresuojančių neuronų ekspresuoja ir somatostatino peptidą. Vaizdinė medžiaga pateikta žemiau.

Galimi keli paaiškinimai, kodėl ne visi virusą ekspresuojantys neuronai buvo pažymėti somatostatino antikūnais. Viena, gal antikūnai nėra pakankamai jautrūs, daro didelį foną ir mums sunku išskirti ląsteles su žemu somatostatino peptido lygiu. Antra, gali būti, kad kultūrose somatostatino neuronai nėra pilnai išsivystę. Kad patikrinti šią hipotezę, mes norime nustatyti, kiek virusą ekspresuojančių neuronų žiurkės viršutiniuose kalneliuose yra somatostatino neuronai. Tam mes norime daryti viruso injekcijas į viršutinius kalnelius, po 2 - 3 savaičių daryti plonus, ~10 um storio pjūvius ir juos dažyti su somatostatino antikūnais. Taip pat planuojame daryti kontrolinius eksperimentus dažant su parvalbumino, kalbindino ir CamKII antikūnais.

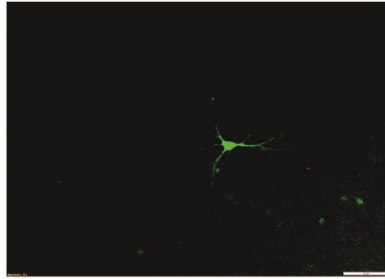
Gytis Baranauskas
Neurofiziologijos laboratorija
Eivenių g. 4, Kaunas LT-50009
e-mail: gytis11@yahoo.com

Neuronal markers

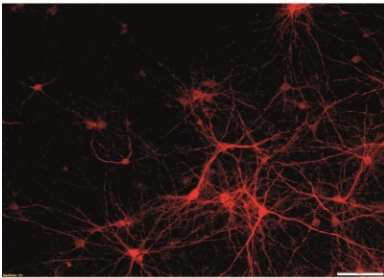
Bright field image with viral GFP fluorescence



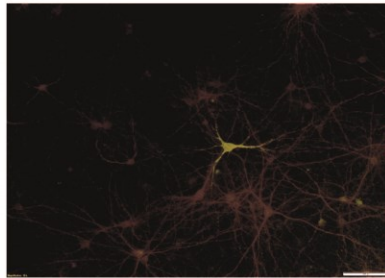
Virus GFP fluorescence



MAP2 antibody Alexa 594 labeling

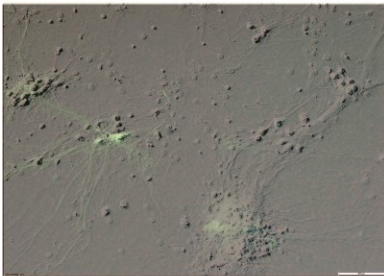


GFP and Alexa 594 overlap

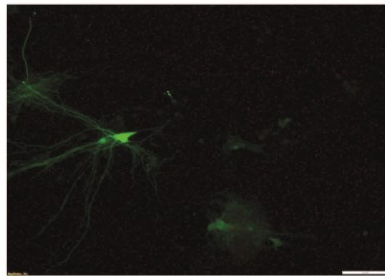


Somatostatin antibodies

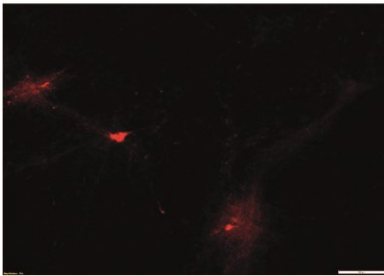
Bright field image with viral GFP fluorescence



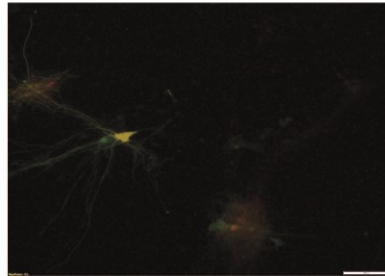
Virus GFP fluorescence



SST antibody Alexa 594 labeling



GFP and Alexa 594 overlap



Paveikslėlyje rodomi pavyzdžiai fiksuotų kultūrų, kurios buvo dažytos su MAP2 antikūnais (viršutinės dvi eilės) ir somatostatino antikūnais (apatinė dalis). Abiem atvejais viruso fluorescencija yra parodyta žalia spalva viršutinėse eilutėse, kairėje rodomas šviesaus lauko vaizdas sutapatintas su viruso fluorescentiniu vaizdu. Viršutinės eilutės kairėje rodoma tik viruso fluorescencija. Apatiniai eilutės abiem atvejais antikūnais gautas dažymas rodomas raudonai kairėje, o dešinėje pusėje yra sutapatinti antikūno ir viruso vaizdai. Sutapimas rodomas gelsvo atspalvio spalva,