

XXXII. OTDK  
Biológia Szekció

# **FOTOAKTÍV GLUTAMÁT VEGYÜLETEK DENDRITIKUS INTEGRÁCIÓ MÉRÉSÉHEZ**

Készítette: Madarász Miklós

SzIE-ÁOTK Biológia szak

MSc. II. évfolyam

Szent István Egyetem

MTA - Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet

Témavezető: Dr. Rózsa Balázs

Belső konzulens: Dr. Halasy Katalin

Budapest 2015

## TARTALOMJEGYZÉK

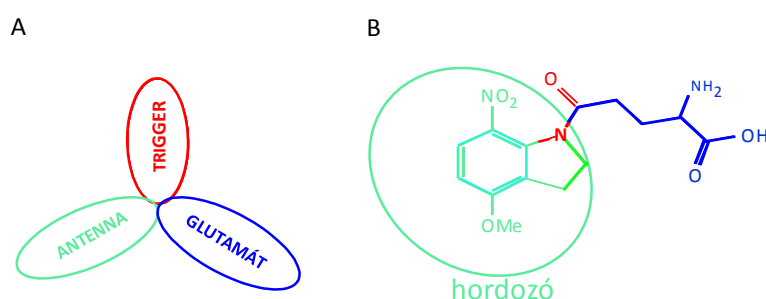
|                                                  |    |
|--------------------------------------------------|----|
| TARTALOMJEGYZÉK .....                            | 1  |
| BEVEZETÉS .....                                  | 2  |
| MÓDSZEREK .....                                  | 5  |
| Túlélő agyszelet-készítés .....                  | 5  |
| Elektrofiziológia .....                          | 5  |
| Két-foton képalkotás.....                        | 6  |
| Két-foton uncaging .....                         | 7  |
| A cage vegyületek szintézise .....               | 8  |
| A szintézisek összefoglalása .....               | 8  |
| Az MNI-Glu•TFA szintézise .....                  | 8  |
| A DNI-Glu•TFA szintézise.....                    | 9  |
| Az MNI-Ulg•TFA szintézise .....                  | 9  |
| Az DNI-Ulg•TFA szintézise .....                  | 9  |
| <i>Ab initio</i> kvantum kémiai modellezés ..... | 9  |
| A szabad glutamát koncentráció becslése .....    | 9  |
| Statisztika.....                                 | 10 |
| EREDMÉNYEK .....                                 | 11 |
| KONKLÚZIÓK .....                                 | 22 |

## BEVEZETÉS

A fotoaktív ketrec (cage) vegyületek felszabadításának két-foton mikroszkópos technikákkal (két-foton uncaging) nagy hatása volt a sejt- és idegtudományok számos területére. Jelentősége abban rejlik, hogy a hordozó vegyületekhez kötött neurotranszmitterek (vagy a tetszőlegesen kiválasztható molekulák) inaktívak maradnak gerjesztésükig, gerjesztéskor pedig lokalizáltan és gyorsan lehet leválasztani hordozójukról és így aktív állapotba hozni őket. Ez igen sokoldalú eszközzé teszi ezt a modern technikát, amely önmagában vagy más módszerekkel kombinálva számos kérdés megválaszolására alkalmazható sikerrel. Ilyen kérdés például az idegsejtek dendritikus integrációja, amely a modern idegtudomány egyik forrponja. Egy idegsejt egyetlen dendritágára is rövid idő alatt rengeteg bemenet érkezik más sejtektől, amelyek időzítésüktől és beérkezési helyüktől függően bonyolult módon hatnak egymásra. A két-foton uncaging-el imitálhatjuk a bemenetet adó sejtek szinaptikus neurotransmitter felszabadítását, mivel általunk meghatározott helyen, időzítéssel és mintázatban szabadíthatunk fel neurotranszmittereket (Matsuzaki, Ellis-Davies et al. 2001). A glutamát a központi idegrendszer egyik fő serkentő neurotranszmittere, ezért néhány típusú glutamát cage vegyületet már korábban kifejlesztettek (Kantevari, Matsuzaki et al. 2010; Warther, Gug et al. 2010). Ezeket leggyakrabban idegéletani kísérletekben használják a posztzinaptikus mechanizmusok és a dendritikus jel-integráció kutatására (Losonczy, Makara et al. 2008; Katona, Kaszás et al. 2011; Chiovini, Turi et al. 2014). Az egyetlen cage glutamát vegyület azonban, amelyet széles körben használnak két-foton kísérletekben, az MNI-Glutamát (*mononitroindolil-glutamát*, MNI-Glu). Egyeduralma annak köszönhető, hogy az ideális cage vegyületnek szigorú feltételeknek kell megfelelnie, mint a hordozott molekula a) magas hozamú felszabadulása, ( $\Phi$ ) b) gyors felszabadulása két-foton gerjesztésre, c) kis arányú spontán hidrolízis gerjesztetlen állapotban és d) a lehető legkevesebb és legkisebb mellékhatás (például aspecifikusság, excitotoxicitás) (Fino, Araya et al. 2009; Warther, Gug et al. 2010).

Az MNI-Glutamát ugyan alkalmas arra, hogy kevés pontban glutamátot szabadítsunk fel belőle két-foton uncaging-el, azonban különböző szinkron agyi oszcillációk, mint például a gamma- vagy a hippokampális Sharp Wave oszcilláció alatti bonyolult szinkron, nagy területen történő, nagyszámú aktív bemenetek mintázatának reprodukálásához több okból is elégtelennek bizonyul. Az MNI-Glutamát nagyarányú gerjesztéséhez szükséges nagy lézerenergia toxikus hatása a szövetekre, a felszabadítás azonban nem elég hatékony ahhoz, hogy kisebb lézerenergiával is reprodukáljuk ezeket a szinkron aktivitás mintázatokat. Ahhoz,

hogy a gerjesztés a toxikus energiaszint alatt maradjon, nem csak hatékony két-foton abszorpció ( $\sigma$ ) és a fotokémiai reakció gyors lejárásának szükséges, hanem az is, hogy adott gerjesztési energiával a lehető legmagasabb kvantum hozamot ( $\Phi$ ) érjük el. Tehát a gerjesztett cage molekulákból a lehető legnagyobb arányban szabaduljon fel glutamát fotokémiai úton. A glutamát felszabadítást gyors kinetikájú  $\text{Ca}^{2+}$  tranziensek kísérik a környező dendritszakaszokban. A  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció gyors változását a dendritekben  $\text{Ca}^{2+}$  kötő fluoreszcens festékekkel detektálni lehet (két-foton lézer szkennelés). A két-foton uncaging-el történő reprodukálást a legújabb 3D szkennelési technikák már képesek lekövetni (Katona, Kaszás et al. 2011; Cotton, Froudarakis et al. 2013; Go, To et al. 2013; Chiovini, Turi et al. 2014; Fernandez-Alfonso, Nadella et al. 2014; Quirin, Jackson et al. 2014), azonban a modern szkennelési módszerek mellett hatékonyabb cage anyagok is szükségesek. A cage molekuláknak, így az MNI-Glutamát-nak is, két fő része van, amelyek különböző funkciót látnak el (1. Ábra). Az első a gyűrűs szerkezetű 'antenna', amely a fotonok energiájának elnyeléséért felelős. Erre a gyűrűben lévő kettős kötések révén képes. Minél teljesebb a gyűrűs molekulában a kettős kötések rendszere, annál 'stabilabb', annál kevésbé hajlamos az átrendeződésre. A második építőkő a gyűrűhöz kapcsolt 'hasznos teher', amely gerjesztésre majd leválik a gyűrűről.



**1. Ábra: A cage molekulák fő részei.** A: sematikusan. B: Egy példa MNI glutamát cage molekula. A kapcsolt glutamát (kék) a gerjesztés során a triggernél (piros) leszakad a hordozójáról (zöld).

Az indol gyűrű és a hasznos teher közötti kötés erősségétől függ, hogy mennyire könnyen tud a hasznos teher, esetünkben a glutamát, disszociálni. Ha a kötés túl gyenge, a glutamát fényenergia közlése nélkül is leszakadhat a hordozóról (spontán alapállapotú hidrolízis). A glutamát ily módon történő felszabadulása a szabályozhatóság szempontjából hátrányos, így számunkra nemkívánatos esemény.

A legtöbb cage vegyület esetében ki lehet mutatni különböző fokú spontán hidrolízist élettani pH-n és hőmérsékleten (Hagen, Dekowski et al. 2008). A spontán hidrolízis a cage vegyület intenzív kicsapódását, dendritpuffadást, az elektrofiziológiai tulajdonságok robosztus változását vagy akár excitotoxicitást is eredményezhet (Pettit, Wang et al. 1997). A spontán hidrolízis jelenléte nem mindegyik cage vegyület esetében feltűnő, azonban hosszú mérések alatt a folyamatos glutamát felszabadulás spontán hidrolízisen és a fotokémiai útvonalon keresztül megemelheti a sejtközi alap vagy háttér glutamát koncentrációt. Ez elérheti a mikromolos nagyságrendet, ami már aktiválja az NMDA receptorok felét ( $EC_{50} \sim 2\mu M$ ) (Patneau and Mayer 1990; Herman and Jahr 2007; Moussawi, Riegel et al. 2011), deszenzitizálja az AMPA receptorokat (Trussell and Fischbach 1989) és aktiválhatja a metabotróp glutamát receptorokat is (Conn and Pin 1997). Még a széles körben alkalmazott MNI-Glutamátból is olyan ütemben szabadul fel glutamát, ami megduplázhhatja az élettani sejtközi glutamát koncentrációt ( $\sim 25nM$ ) (Herman and Jahr 2007) hosszú mérések során. Az eddig felsoroltak mellett fontos még megemlíteni, hogy az MNI-Glutamát gátló hatással van a  $GABA_A$  receptorokra: a gátló posztszinaptikus potenciálok amplitúdóját már az uncaging-hez szükséges koncentráció töredékénél a felére csökkenti (Fino, Araya et al. 2009). Ez a mellékhatás komolyan megváltoztatja az idegsejtek elektrofiziológiai tulajdonságait, kétségbe vonva ezzel az eredmények hitelességét.

Jelen dolgozatban bemutatok három MNI-Glutamát - analóg cage vegyületet (3. Ábra), melyeket biológiai kísérletekben teszteltem egér túlélő agyszeletekben. Az egyik tesztelt cage vegyület, a DNI-Glutamát (*dinitroindolil-glutamát*, DNI-Glu) a kísérletek során azonos gerjesztési lézere energiánál nagyobb szomatikus EPSP-ket (serkentő posztszinaptikus potenciál) és dendritikus  $Ca^{2+}$  változást produkált, mint az MNI-Glutamát. Az MNI-Glutamát szignifikáns  $GABA_A$  receptor blokkoló hatásával ellentétben a DNI-Glu-nak nem volt hatása a gátló posztszinaptikus áramokra (IPSC). A spontán hidrolízis negatív hatásait glutamát dehidrogenáz enzim és kofaktora,  $NADP^+$  hozzáadásával sikerült teljesen kiiktatni. Eredményeim alapján a DNI-Glutamát alkalmasabb cage molekula az MNI-Glutamátnál a dendritikus integráció és egyéb komplex neuronális folyamatok vizsgálatára.

## MÓDSZEREK

### Túlélő agyszelet-készítés

Minden kísérlet az állatok védelméről és kíméletéről szóló 1998. évi XXVIII. törvénynek megfelelően lett végrehajtva. A 16-20 napos BAC\_pva/gfp transzgén egereket izofluránnal elaltattam, majd agyukat kiemelttem és jéghideg vágóoldatba helyeztem, amely a következő összetevőket tartalmazta desztillált vízben oldva (mM-ban): 2.8 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 2 MgSO<sub>4</sub>, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, 10 D-glükóz, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 206 szukróz). Ezt követően vibratómmal (Vibratome 3000) túlélő agyszeleteket készítettem a hippokampális régióból. A 300 µm vastag horizontális szeleteket 25 °C-on tároltam mesterséges agyfolyadékban (artificial cerebrospinal fluid, aCSF), amely a következő összetevőket tartalmazta desztillált vízben oldva (mM-ban): 126 NaCl, 2.5 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub> és 10 glükóz (Rozsa, Zelles et al. 2004; Katona, Kaszás et al. 2011; Chiovini, Turi et al. 2014).

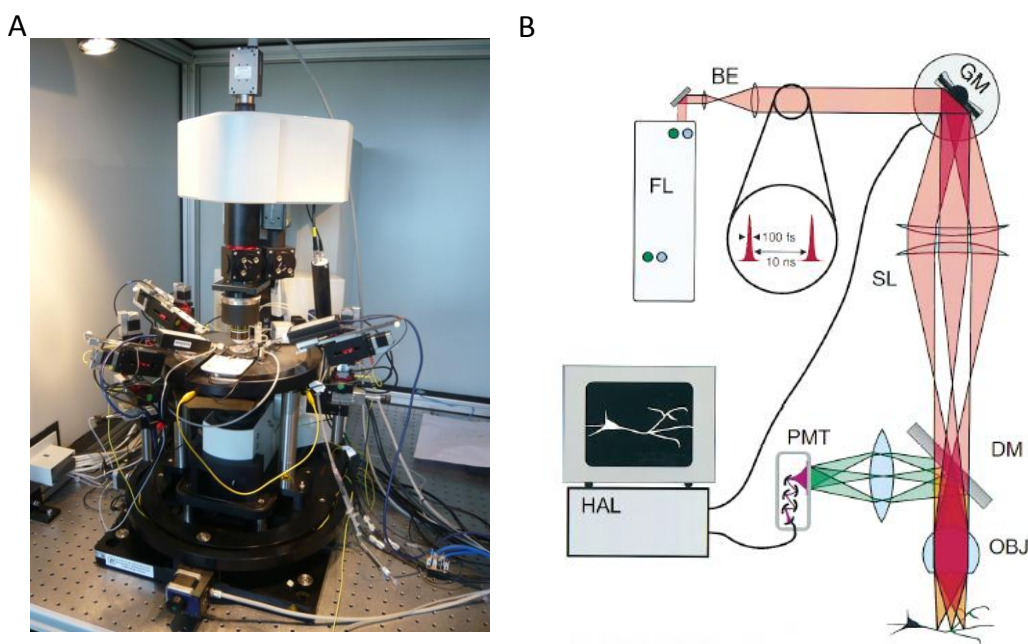
### Elektrofiziológia

A hippukampusz CA1-es régiójának neuronjait infravörös (900 nm) oldalsó, más néven súrló megvilágítással tettem láthatóvá. A sejtek membránpotenciál változásait 32 °C-on teljes sejt elvezetéssel (whole-cell patch clamp) rögzítettem (MultiClamp 700B, Digidata 1440; Molecular Devices). A patch clamphez üvegkapilláris elektródákat használtam (current-clamp ellenállás: 6-9 MΩ, voltage clamp ellenállás: 3-5 MΩ) amelyeket az alábbi, intracelluláris oldattal töltöttem fel (mM-ban): 125 K-glukonát, 20 KCl, 10 HEPES, 10 Di-Tri-só foszfokreatin, 0.3 Na-GTP, 4 Mg-ATP és 10 NaCl. A Ca<sup>2+</sup> koncentráció változás méréséhez az oldathoz alacsony affinitású, zöld Ca<sup>2+</sup> kötő (100 µM Fluo-4) fluoreszcens festéket adtam, illetve a sejtek dendritágainak jobb láthatósága érdekében ezt kiegészítettem piros anatómiai (ALEXA 594) fluoreszcens festékkel. A későbbi hisztológiai vizsgálatokhoz az intracelluláris oldathoz biocytint adagoltam (0.008 mM). A -50 mV-nál pozitívabb nyugalmi membránpotenciállal rendelkező sejteket nem vettem figyelembe a kísérletekben. Az összes mért sejtet hippokampális interneuronokként és piramissejtekként azonosítottam elektrofiziológiai és anatómiai tulajdonságaik alapján (4. Ábra). A GABA<sub>A</sub> receptorok által IPSC-eket aCSF-el töltött kapilláris elektródákkal (6-9 MΩ) váltottam ki (10-50 V, 0.1 ms, 1 stimulus) a szómától 10-15 µm-re, AP5 (60 µM, kompetitív antagonista NMDA receptor blokkoló) és CNQX (10 µM, kompetitív antagonista AMPA/kainát receptor blokkoló)

jelenlétében (Tocris Bioscience). Az adatokat pClamp8 vagy pClamp10 (Molecular Devices) és MES (Femtonics Ltd.) szoftverekkel rögzítettük.

### Két-foton képalkotás

A két-foton képalkotást a teljes sejt elvezetés elérése után 15-20 perccel kezdtem, miután a fluoreszcens festék teljesen szétterjedt a sejt dendritágaiban. A képalkotáshoz két-foton szkennelő rendszert használtam (Femto 2D Alba, Femtonics Ltd.)(2. ábra), femtoszekundumos pulzáló lézerrel, 830-850 nm-es hullámhosszon (Mai Tai HP, SpectraPhysics). A hosszú dendritszakaszok leképezése több egyenes szakasz egymást követő szkennelésével történt (Multiple Line Scanning Method). Minden kísérlet végén nagy felbontású képsorozatot készítettem különböző szöveti mélységekben (z stack) a mért sejtet tartalmazó térfogatban (4. Ábra). A mérések kivitelezését, a valós idejű adatgyűjtést és kiértékelést egyedi, MATLAB alapú szoftverrel (MES, Femtonics Ltd.) végeztem.



### 2. Ábra: Két-foton mikroszkóp

A: 2D két foton mikroszkóp. B: Két foton mikroszkóp sematikus felépítése (FL: Femtolézer, BE: Nyaláb tágító, GM: Galvo tükör, SL: fókuszlencse, DM: Dikroikus tükör, OBJ: objektív, PMT: detektor, HAL: számítógépes vezérlés). Forrás: Denk W. et al. Photon upmanship: Why multiphoton imaging is more than a gimmick, Neuron, 1997.

## Két-foton uncaging

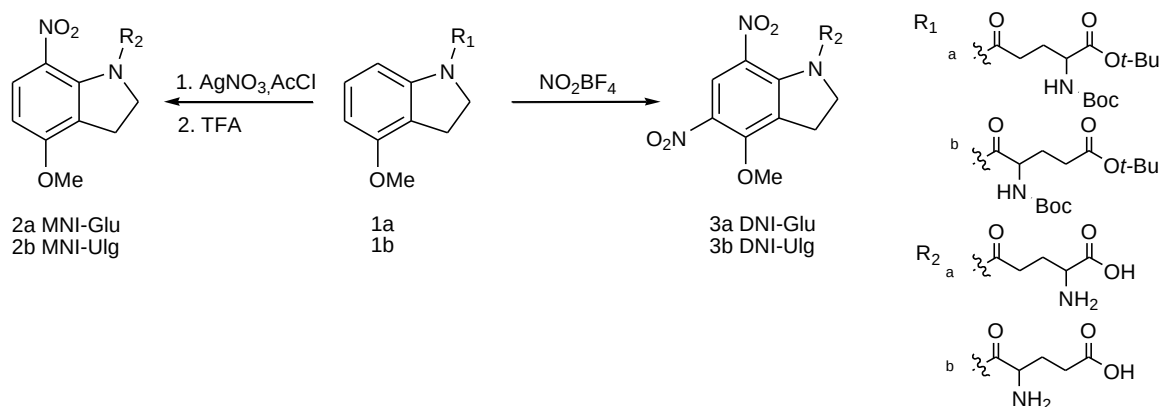
A kísérletek elején két-foton képalkotással meggyőződtem róla, hogy a teljes sejt elvezetett piramissejt vagy interneuron (továbbiakban: töltött sejt) feltöltődött a teljes sejt elvezetéshez használt üvegpipettában lévő 100  $\mu\text{M}$  Fluo-4  $\text{Ca}^{2+}$  kötő zöld és 100  $\mu\text{M}$  ALEXA 594 anatómiai piros fluoreszcens festékekkel (Invitrogen). Ez után a perfúziós aCSF oldathoz 2.5 mM koncentrációban MNI-Glu•TFA-t vagy DNI-Glu•TFA-t vagy MNI-Ulg•TFA-t vagy DNI-Ulg•TFA-t adtam. A glutamátot a cage vegyületekből ultragyors, pulzáló lézernyalábbal szabadítottam fel 690-830 nm-es hullámhosszon (Mai Tai HP, SpectraPhysics vagy Chameleon Ultra II, Coherent). A lézerintenzitást elektro-optikus modulátorral szabályoztam (350-80 LA, Conoptics). A képalkotási periódusok közben, rövid ( $<60 \mu\text{s}$ ) uncaging periódusok során 15-25 kiválasztott helyen glutamátot szabadítottam fel (5. Ábra). A glutamát felszabadítás helyeit a háttéről készített képek alapján választottam meg, úgy, hogy azok csoportosan helyezkedjenek el a dendritek menték, egymástól  $\sim 0.8 \mu\text{m}$ -re, a dendrittől  $\sim 1 \mu\text{m}$ -re. A minta kis elmozdulásait ( $0.1\text{-}0.2 \mu\text{m/perc}$ ) a szoftveren keresztül kézzel kompenzáltam.

A cage vegyületek páros összehasonlítása során minden esetben azonos idő- és térbeli mintázatot használtam, ugyanazon sejt ugyanazon dendritszakaszán. A perfúzió sebessége 6ml/perc volt. A perfúzióhoz a cage anyagokkal együtt L-glutaminsav dehidrogenázt (Sigma-Aldrich) és  $\beta$ -nikotinamid adenin dinukleotid foszfátot ( $\text{NADP}^+$ ) (200  $\mu\text{M}$ , Sigma-Aldrich) is adtam.

## A cage vegyületek szintézise

A cage vegyületeket szoros kollaborációs partnerek szintetizálták. A szintézis lépéseinek részletes ismertetése meghaladja e dolgozat kereteit és céljait. A részletes szintézis elérhető lesz a hamarosan közlésre kerülő publikációban (Szalay et al., előkészítés alatt).

### A szintézisek összefoglalása



### 3. Ábra: A cage vegyületek szintézisének összefoglalása.

1a: metoxi-indolil származék.

2b: MNI-Ulg•TFA.

1b: metoxi-indolil származék.

3a: DNI-Glu•TFA.

2a: MNI-Glu•TFA.

3b: DNI-Ulg•TFA.

R<sub>1a</sub>: C5- terminálisnál kapcsolt glutamát, a C1- terminálison és N-terminálison védőcsoporttal.

R<sub>1b</sub>: C1- terminálisnál kapcsolt glutamát, a C5- terminálison és N-terminálison védőcsoporttal.

R<sub>2a</sub>: C5 - terminálisnál kapcsolt glutamát.

R<sub>2b</sub>: C1 - terminálisnál kapcsolt glutamát.

Az aminosav származékok a Bachem-től (Bubendorf, Svájc) származnak. Minden más vegyület és reagens a Sigma-Aldrich-től (Seelze, Németország) származik. Minden felhasznált reagens az elérhető legnagyobb tisztaságú volt.

### Az MNI-Glu•TFA szintézise

A referenciaként használt MNI-Glutamát•trifluoracetát (*(2S)-2-amino-5-(4-metoxi-7-nitro-2,3-dihidro-indol-1-il)-5-oxo-pentánsav trifluoracetát*) (2a: MNI-Glu•TFA) szintézise az irodalomban korábban közöltek szerint történt (Matsuzaki, Ellis-Davies et al. 2001; Fedoryak, Sul et al. 2005; Papageorgiou, Ogden et al. 2005). A kristályos végtermék helyett azonban az MNI-Glutamát izolálása trifluoracetát sójaként történt, preparatív HPLC –vel.

### **A DNI-Glu•TFA szintézise**

A 2(S)-2-amino-5-(4-metoxi-5,7-dinitro-2,3-dihidro-indol-1-il)-5-oxo-pentánsav trifluoracetát (3a: DNI-Glu•TFA) szintézise a kiinduló molekula (1H-indol-1-pentánsav,  $\alpha$ -[[1,1-dimetiletoxi) karbonil] amino]-2,3-dihidro-4-metoxi- $\delta$ -oxo-, 1,1-dimetiletil észter, (Fedoryak, Sul et al. 2005) egy lépéses dinitráálásával történt.

### **Az MNI-Ulg•TFA szintézise**

A 4(S)-4-amino-5-(4-metoxi-7-nitro-2,3-dihidro-indol-1-il)-5-oxo-pentánsav trifluoracetát (2b: MNI-Ulg•TFA) szintézis kiinduló molekulája metoxi-indolil származék volt. Az L-Glutaminsav a karboxil-terminálásánál kapcsolódott az indolgyűrűhöz.

### **Az DNI-Ulg•TFA szintézise**

A 4(S)-4-amino-5-(4-metoxi-5,7-dinitro-2,3-dihidro-indol-1-il)-5-oxo-pentánsav trifluoracetát (3b: DNI-Ulg•TFA) szintézisének kiinduló molekulája az MNI-Ulg•TFA volt. A metoxi-indolil származék egy lépéses dinitrálása a karboxil terminálisnál kapcsolt glutamát esetében nem volt lehetséges.

### **Ab initio kvantum kémiai modellezés**

A kvantum kémiai modellezés a DALTON 2.0 szoftverrel történt (Angeli 2005). A reakcióutak egyes lépéseikhez tartozó energiaszint értékeket Gaussian09 szoftverrel lettek kiszámítva (Frisch 2003). A modellezést kollaborációs partnerek végezték, így annak menetét és eredményeit e dolgozatban nem tárgyalom. A kvantum kémiai modellezés menetének részletes bemutatása és eredményeinek ismertetése a hamarosan közlésre kerülő publikációban (Szalay et al.) lesz elérhető.

### **A szabad glutamát koncentráció becslése**

A DNI-Glu•TFA spontán hidrolízisének becslése közvetlenül a szabad glutamát koncentrációból történt, az orto-ftálaldehid (OPA) konvertált termék (OPA-Glutamát) mérésével (HPLC-UV, 280 nm). A szabad glutamát koncentráció becslését OPA-val kollaborációs partnerek végezték, így annak menetét és eredményeit e dolgozatban nem

tárgyalom. A glutamát koncentráció becslésének részletes bemutatása és eredményeinek ismertetése a hamarosan közlésre kerülő publikációban (Szalay et al.) lesz elérhető.

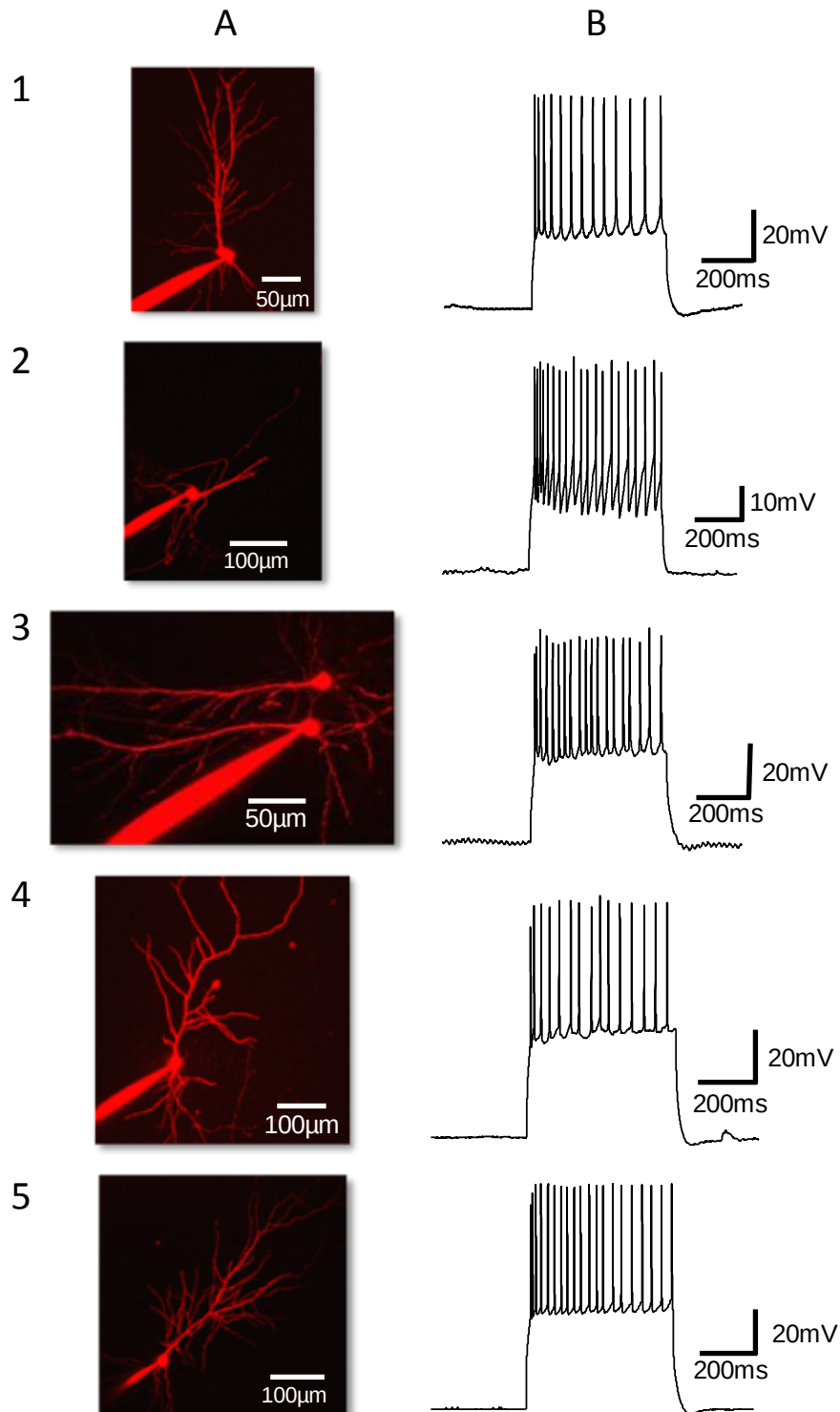
### **Statisztika**

Minden adat  $\pm$  az átlag standard hibájaként van megadva, amennyiben nincs külön feltüntetve. A statisztikai összehasonlításokhoz Student-féle páros t-próbát használtam, kivéve, ahol azt külön jelöltem. A fotokémiai hatékonyság kiszámítása (7. Ábra) kötetlen nemlineáris optimalizálással történt, amely a hamarosan közlésre kerülő publikációban kerül részletes ismertetésre (Szalay et al.).

## EREDMÉNYEK

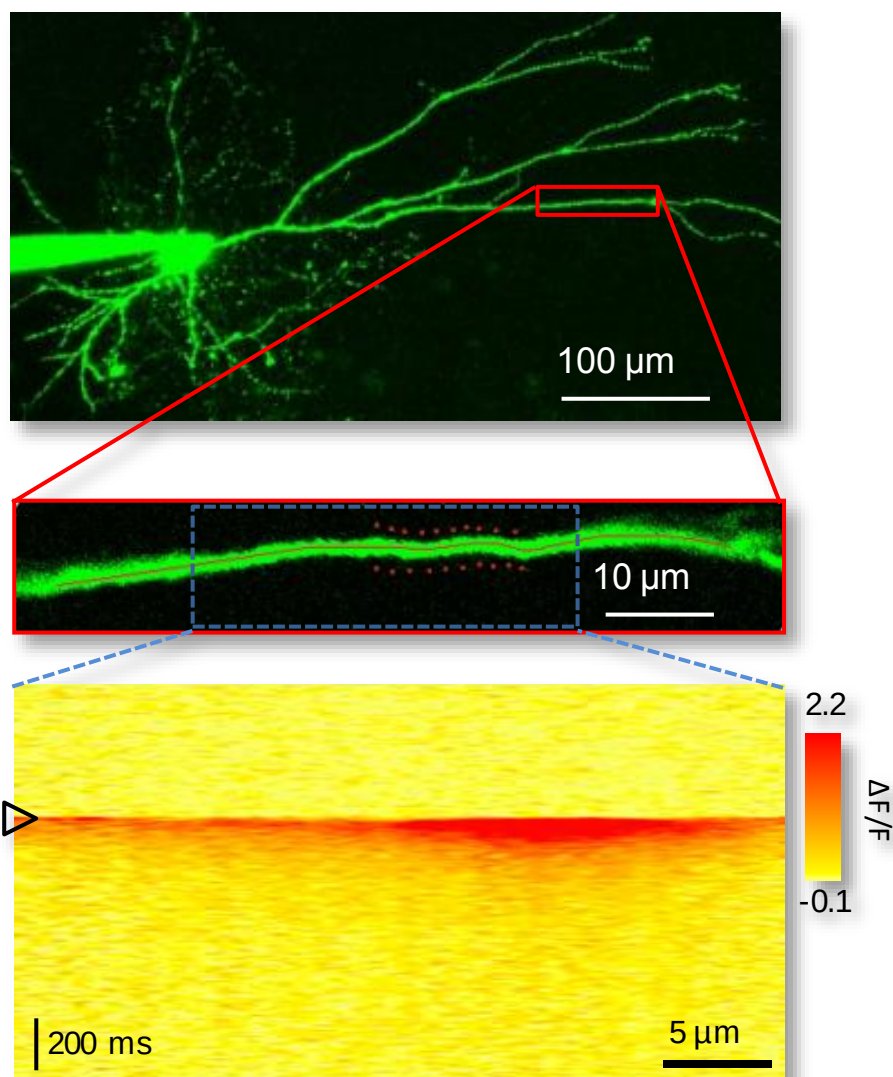
A biológiai kísérletek során egér akut, túlélő agyszeletekben vezettem el piramissejtek és interneuronok membránpotenciál változásait teljes sejt elvezetéssel (whole cell patch clamp), a hippocampusz CA1-es régiójában. A patch clamp során a pipettán keresztül a sejteket Fluo-4 és ALEXA 594 fluoreszcens festékekkel töltöttem fel (4. Ábra).

A Fluo-4 egy alacsony affinitású  $\text{Ca}^{2+}$  kötő zöld fluoreszcens festék, az ALEXA 594 pedig piros anatómiai festék. A sejt elektromos tulajdonságainak tesztelése céljából a pipettán keresztül áramimpulzusokat juttattam a sejtbe, amellyel kimozdítottam a membránpotenciált a nyugalmi értékéből (ramp teszt). Az egymást követő áramlépcsők egyre jobban depolarizálták a sejtmembránt, bizonyos mértékű depolarizáció felett, a küszöbértélet elérve pedig a sejt akciós potenciálokat generált (4. Ábra). Az áramlépcsőkre adott válaszok, illetve az akciós potenciálok alakja jellemző az adott sejttípusra (PING 2008). A ramp tesztre adott válaszok alapján az összes mért sejt hippocampális piramissejt vagy interneuron volt. Azután, hogy a Fluo-4 és az ALEXA 594 fluoreszcens festékek feltöltötték a sejt dendritágait, nagyfelbontású képeket készítettem a sejtről különböző z síkokban (z stack). A képeket a méréshez használt szoftverrel (MES) egymásra vetítettem, így a sejt teljes térfogatát lefedő képet kaptam, amelyen nagy felbontásban látszódott a töltött sejt szómája és legtöbb dendritága (4. Ábra). Ezt követően a töltött sejteket a különböző cage vegyületekből történő glutamát felszabadításával ingereltem a dendritágaik mentén (5. Ábra).



#### 4. Ábra: Töltött piramissejtek és interneuronok a CA1-es régióban.

1-5: Fluoreszcens festékkel töltött sejtek a hippocampusz CA1-es régiójában. A: A feltöltött sejtekről különböző z síkokban készült sorozatfelvétel egymásra helyezve, egy képen. B: A töltött sejtek membránpotenciál változásai elektromos stimulációra.

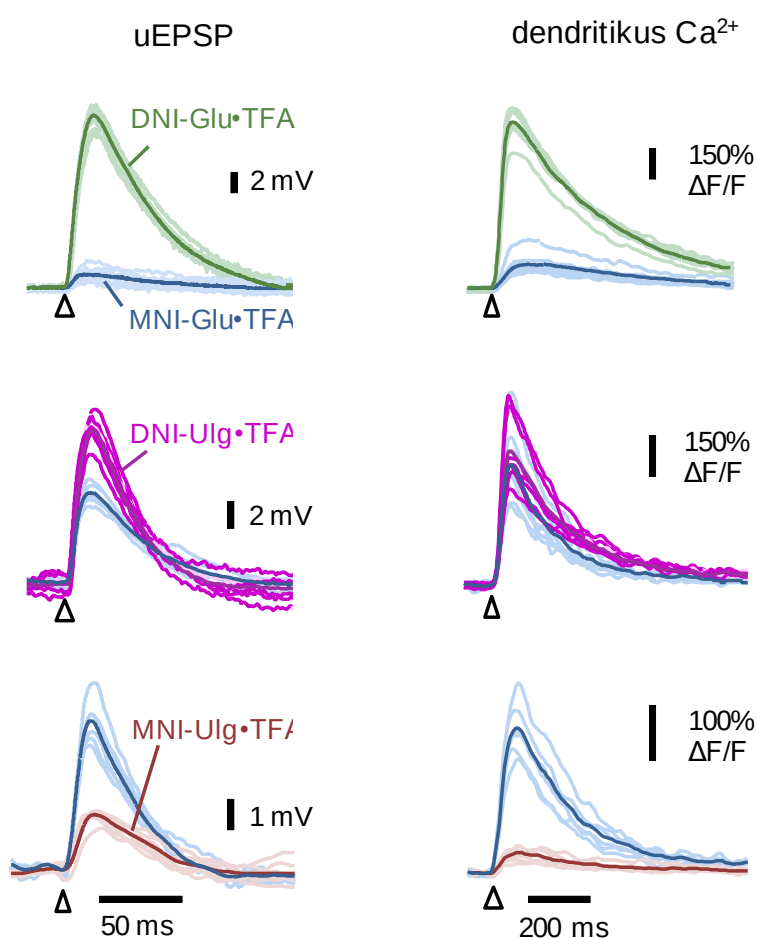


### 5. Ábra: Glutamát felszabadítás töltött sejt dendritje mellett.

Fent: Egy példa a whole cell patch clamp technikával mért sejtekre. Fluo-4 és ALEXA 594-el töltött interneuron z stack-je. Középen: A fenti képen lévő piros négyzetben belüli terület kinagyított képe. A dendritikus  $\text{Ca}^{2+}$  változás mérésének helyét (region of interest, RoI) a dendriten lévő vékony piros vonallal jelöltük ki. A piros pontok a dendrit két oldalán a glutamát uncaging helyeit jelölik. Alul: Egy példa a  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció változásának mérésére a mérésre kijelölt dendritszakaszon (RoI)(y tengely: idő, x tengely: a mérésre kijelölt dendritszakasz). A háromszögek az uncaging időpontját jelölik.

Minden cage vegyület esetében azonos lézere energiával, azonos idő- és térbeli mintázatban szabadítottam fel glutamátot, ugyanannyi pontban. A glutamát uncaging egyedi EPSP-eket és dendritikus  $\text{Ca}^{2+}$  válaszokat váltott ki, amelyeket a töltőpipettán keresztül (EPSP) illetve két-

foton lézer szkenneléssel mértem az uncaging-el egy időben, szimultán. A különböző cage molekulák jelenlétében kapott egyedi EPSP-eket (uEPSP) és dendritikus  $\text{Ca}^{2+}$  válaszokat az MNI-Glu•TFA jelenlétében kapott adatokhoz hasonlítottam (6. Ábra), mivel az MNI-Glu•TFA tulajdonságai már jól ismertek az irodalomban (Matsuzaki, Ellis-Davies et al. 2001; Fedoryak, Sul et al. 2005). Azonos lézerintenzitáson a glutamát felszabadítás MNI-Glu•TFA-ból (EPSP:  $1.43 \pm 0.15$  mV,  $d\text{Ca}^{2+}$ :  $1.22 \pm 0.11$   $\Delta\text{F}/\text{F}$ ) kisebb amplitúdójú EPSP-eket és kisebb dendritikus  $\text{Ca}^{2+}$  ( $d\text{Ca}^{2+}$ ) koncentráció növekedést váltott ki, mint DNI-Glu•TFA-ból (EPSP:  $15.22 \pm 0.28$  mV,  $d\text{Ca}^{2+}$ :  $7.95 \pm 0.25$   $\Delta\text{F}/\text{F}$ )(6. Ábra).

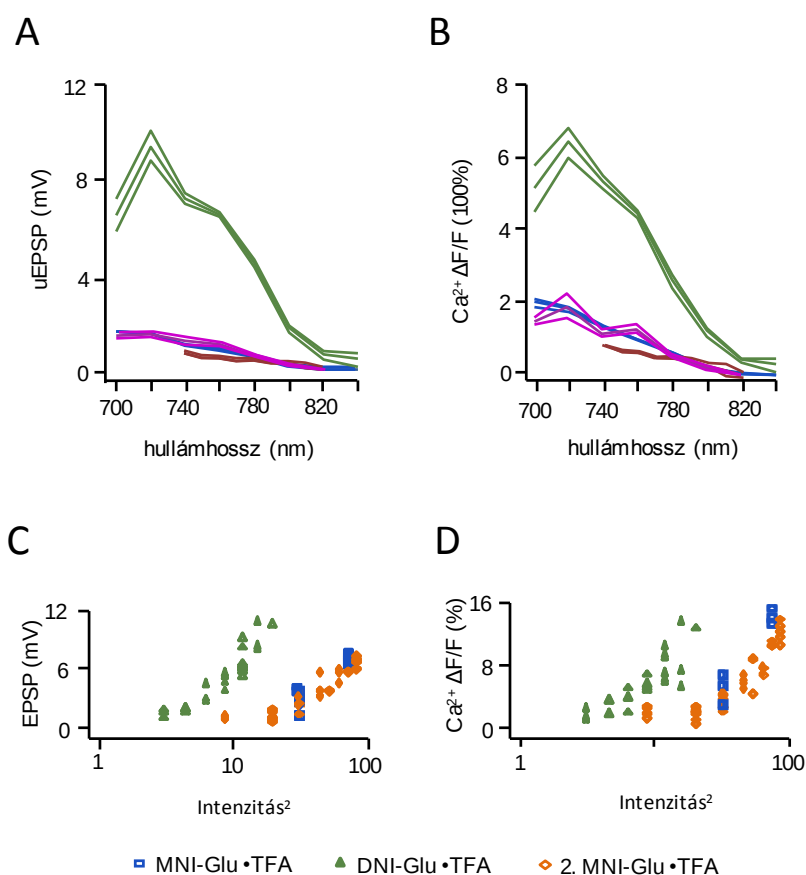


**6. Ábra: Uncaging-el kiváltott uEPSP-k és dendritikus  $\text{Ca}^{2+}$  válaszok különböző cage molekulák esetében.**

Uncaging-el kiváltott uEPSP-k (mV) (bal) és a szimultán mért dendritikus  $\text{Ca}^{2+}$  válaszok ( $\Delta\text{F}/\text{F}$ ) (jobb) DNI-Glu•TFA, MNI-Ulg•TFA és DNI-Ulg•TFA esetében, MNI-Glu•TFA-hoz hasonlítva. Minden cage molekulát 2.5 mM-os koncentrációban adtam a perfúzióhoz. A háromszögek az uncaging időpontját jelölik. Vékony vonalakkal jelöltem a külön mérései

egységeket, vastag vonallal pedig ezek átlagait. Kék: MNI-Glu•TFA, zöld: DNI-Glu•TFA, lila: DNI-Ulg•TFA, barna: MNI-Ulg•TFA.

Mivel azonban a dendritikus és szomatikus membrán kompartmentek képesek a nagy amplitúdójú EPSP-k nemlineáris felerősítésére (Yoneyama, Fukushima et al. 2011), a fotokémiai hatékonyságot nem lehet egyetlen lézer intenzitás érték alapján meghatározni. Ezért több különböző lézerintenzitáson is összehasonlítottam az uncaging-el kiváltott szomatikus EPSP-k amplitúdóját, illetve a dendritikus  $\text{Ca}^{2+}$  változást (7. Ábra). Ugyanakkora sejtválasz kiváltásához glutamát uncaging-el MNI-Glu•TFA-ból  $7.17 \pm 0.84$ -szer nagyobb két-foton gerjesztési energiára volt szükség, mint DNI-Glu•TFA-ból (kötetlen nemlineáris optimalizálás,  $p < 10^{-5}$ ,  $n=10$ ). MNI-Ulg•TFA-t használva az EPSP-k  $51.07 \pm 6.76$  %-al csökkentek ( $p < 0.001$ ,  $n=4$ ), DNI-Ulg•TFA használakor pedig mérsékelten,  $125.3 \pm 4.1$  %-ra emelkedtek ( $p = 0.003$ ,  $n=3$ ) az MNI-Glu•TFA által kiváltott EPSP-khez képest (6. Ábra).

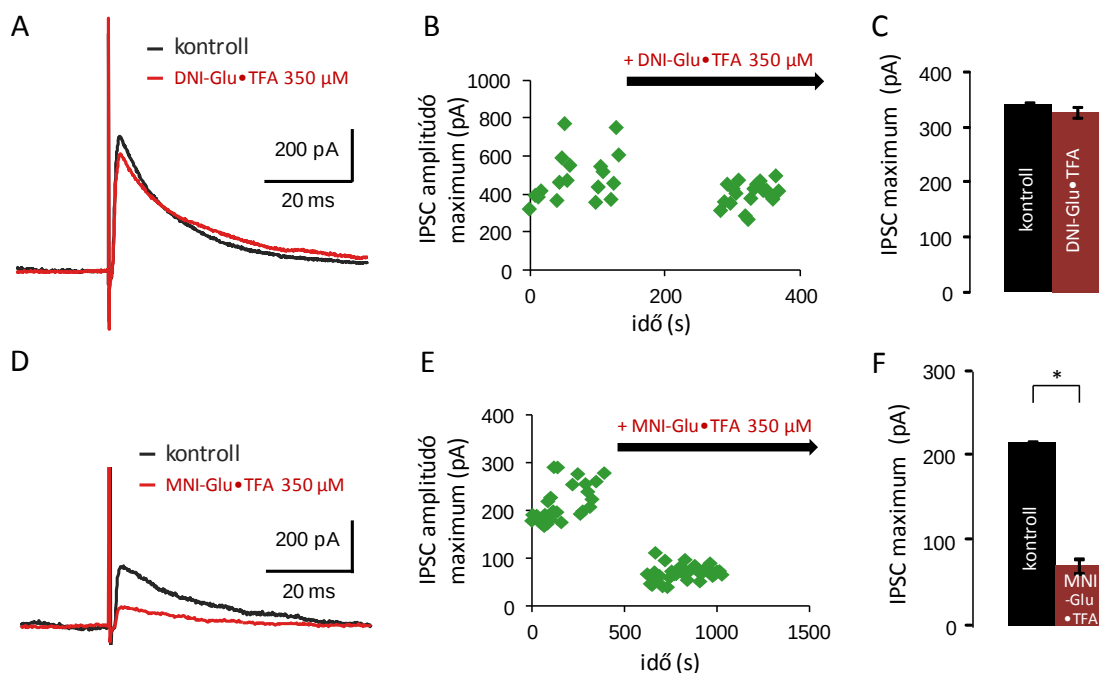


## 7. Ábra: Az uEPSP-k és a dendritikus $\text{Ca}^{2+}$ válaszok az uncaging-hez használt lézer hullámhosszának és intenzitásának függvényében.

A-B: Az uEPSP-k (A) és a dendritikus  $\text{Ca}^{2+}$  változás (B) a hullámhossz függvényében a négy tesztelt cage molekula esetében (Kék: MNI-Glu•TFA, zöld: DNI-Glu•TFA, lila: DNI-

Ulg•TFA, barna: MNI-Ulg•TFA). C-D: Az EPSP-k (C) és a dendritikus  $\text{Ca}^{2+}$  változás (D) a lézerenergia (intenzitás) függvényében. A töltött sejteket először MNI-Glu•TFA uncaging-el stimuláltuk (kék négyzetek), majd a perfúziót DNI-Glu•TFA-t tartalmazóra cseréltük és így is rögzítettük a sejtválaszokat (zöld háromszögek). Ezek után a perfúziót visszacseréltük az MNI-Glu•TFA-t tartalmazóra. Ugyanakkora sejtválasz kiváltásához glutamát uncaging-el MNI-Glu•TFA-ból  $7.17 \pm 0.84$ -szer nagyobb két-foton gerjesztési energiára volt szükség, mint DNI-Glu•TFA-ból.

Az MNI-Glu•TFA az irodalom szerint már  $300 \mu\text{M}$ -os koncentrációban felére csökkenti az IPSC-k amplitúdóját (Fino, Araya et al. 2009), az uncaging-hez szükséges  $2.5 \text{ mM}$ -os koncentrációban pedig teljesen blokkolja azokat. Ennek teszteléséhez a hippocampusz CA1-es régiójában sejteket töltöttem (Whole Cell patch clamp), majd aCSF-el töltött kapilláris elektródákkal IPSC-ket váltottam ki elektromos stimulációval ( $10\text{-}50 \text{ V}$ ,  $0.1 \text{ ms}$ , 1 stimulus) a sejt szómájától  $10\text{-}15 \mu\text{m}$ -re. A stimulációs protokoll során a glutamáterg szinaptikus transzmissziót AP5-el ( $60 \mu\text{M}$ ) és CNQX-al ( $10 \mu\text{M}$ ) gátoltam. MNI-Glu•TFA ( $350 \mu\text{M}$ ) jelenlétében, az irodalmi adatoknak megfelelően a kiváltott IPSC-k amplitúdója szignifikánsan kisebb volt, mint a kontroll esetében ( $53.4 \pm 4.0$ ,  $p=0.03$ ,  $n=5$ ; 8. Ábra). Ezzel szemben DNI-Glu•TFA ( $350 \mu\text{M}$ ) jelenlétében a kiváltott IPSC-k amplitúdójában nem volt változás ( $6.1 \pm 5.0$ ,  $p=0.28$ ,  $n=11$ ; 8. Ábra).

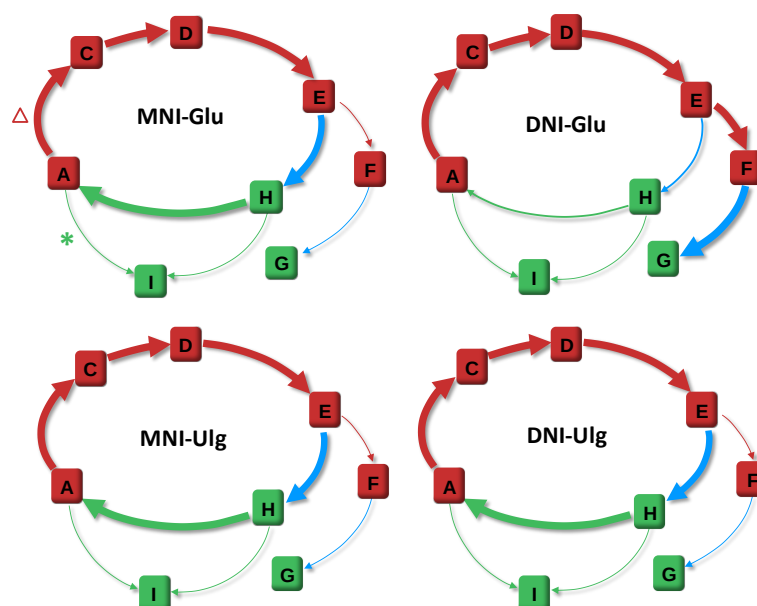


## 8. Ábra: A DNI-Glu•TFA és az MNI-Glu•TFA hatása az IPSC-kre.

A: Szemléltető IPSC-k kontroll körülmények között és 350  $\mu$ M DNI-Glu•TFA jelenlétében. A GABAerg áramok izolálásához a sejtválaszokat fokális elektromos stimulációval váltottam ki a glutamáterg szinaptikus transzmisszió gátlása alatt (10  $\mu$ M CNQX és 40  $\mu$ M AP5). B: Az IPSC-k amplitúdója az idő függvényében. A nyíl a DNI-Glu•TFA hozzáadásának időpontját jelöli. C: Az IPSC-k maximum amplitúdójának átlagai kontroll körülmények között és 350  $\mu$ M DNI-Glu•TFA jelenlétében. D-F: Az A-C ábrák az MNI-Glu•TFA-ra.

A glutamát felszabadulás fotokémiai reakciójának modellezése mind a négy vegyület esetében *ab initio* kvantum kémiai modellezéssel történt. A reakciútak egyes lépéseire tartozó energiaszint értékeket Gaussian09 szoftverrel lettek kiszámítva (Frisch 2003). A kvantum kémiai modellezés eredményeit és a lépésekhez becsült energiaszinteket a dolgozatban nem kerülnek részletes bemutatásra (lásd Módszerek: *Ab initio* kvantum kémiai modellezés). A modellezés alapján a DNI-Glu•TFA és az MNI-Glu•TFA között jelentős különbség van a fotokémiai reakció egyik lépésében (9. Ábra: E  $\rightarrow$  F átalakulás). A kérdéses lépésben az aktiválási energia a DNI-Glu•TFA számára  $\sim 18\%$  -al kisebb, mint az MNI-Glu•TFA számára, így kisebb az esélye annak is, hogy a számunkra kedvezőtlen legerjesztődés (E  $\rightarrow$  H) irányába haladjon tovább a reakció, amelynek vége így egy nemkívánatos végtermék (I) létrejötte. Emiatt DNI-Glu•TFA-ból a modell szerint hatékonyabban lehet glutamátot felszabadítani fotokémiai gerjesztéssel, mint MNI-Glu•TFA-

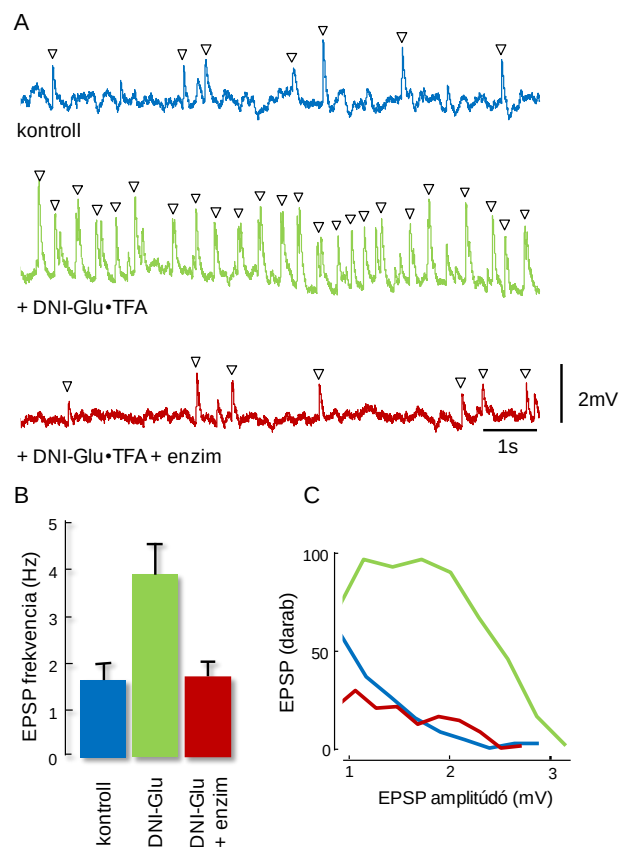
ból. Az MNI-Ulg•TFA és a DNI-Ulg•TFA fotokémiai reakcióútjai és a reakció lépéseikhez tartozó energiaszintek a modell alapján közel azonosak, mint izomerjeik, az amino terminális felől kapcsolt MNI-Glu•TFA és DNI-Glu•TFA reakcióútjai és energiaszintjei. A kvantum kémiai modell szerint a DNI-Glu•TFA egyetlen hátránya a megnövekedett spontán alapállapotú hidrolízis (9. Ábra:  $A \rightarrow I$ ), amely a szabad glutamát koncentráció megemelkedését okozhatja a sejtközi térben.



**9. Ábra: A cage vegyületek kvantum kémiai modell által becsült fotokémiai és alapállapotú reakcióútjai, sematikusan.**

A vonalvastagság az adott irány nagyságrendi valószínűségét szemlélteti az előző állapotból.  $\Delta$ : gerjesztés, \*: spontán hidrolízis. A színek a folyamat különböző szakaszait jelölik. Piros: gerjesztett állapot, kék: legerjesztődés, zöld: alapállapotú átrendeződés. A betűk (A-I) a folyamat egyes stádiumainak felelnek meg. 'A': a cage vegyület kiindulási szerkezetben, alapállapotban. 'C': az 'A' állapotból fotokémiai gerjesztés hatására létrejövő gerjesztett állapot (a 'B' lépés nincs ábrázolva). 'D': a 'C' állapotból energialeadással létrejövő, alacsonyabb energiájú, ám még mindig gerjesztett stádium. 'E': 'D'-ből belső átrendeződéssel kialakuló állapot. 'F': a kulcsállapot, melyben a glutamát már nem kötődik a hordozóhoz. 'G': a hasznos termék (inaktív hordozó és szabad glutamát). 'H': 'F'-ből energialeadással létrejövő reaktív intermedier. 'I': Másodlagos, nemkívánatos termék, amely az 'A' vagy a 'H' állapotból jön létre, a glutamát spontán, alapállapotú hidrolízisével. A modellezés alapján a DNI-Glu•TFA és a többi cage molekula közötti fő különbség az 'E'  $\rightarrow$  'F' lépésében van.

A nagyarányú konstans spontán hidrolízis számos negatív hatással bír, mint például a spontán EPSP-k frekvenciájának növelése. Ezek a hatások akadályozzák, a fotokémiailag hatékonyabb cage vegyületek, így a DNI-Glu•TFA használatát is. A negatív hatások közömbösítéséhez L-glutamát dehidrogenázt és  $\text{NADP}^+$ -t adtam a perfúzióhoz, amely szelektíven csökkentette a szabad glutamát koncentrációját a kísérletek során. Azért esett a választás az L-glutamát dehidrogenázra, mert kofaktorát, a  $\text{NADP}^+$ -t nem termeli az agyszövet (Dávid, Deli et al. 2008). A szükséges enzim és kofaktor mennyiségének meghatározásához meg kellett becsülni a spontán hidrolízisből felszabaduló szabad glutamát mennyiségét. A szükséges eliminációs sebességet  $0.2 \mu\text{M}/\text{percre}$  becsülték (lásd Módszerek: A szabad glutamát koncentráció becslése). A Michaelis-Menten modell alapján az alap glutamát koncentráció  $1 \mu\text{M}$  alatt tartásához  $200\text{-}520 \mu\text{M}/\text{L}$  glutamát dehidrogenáz szükséges (Frieden 1959). A glutamát dehidrogenázzal együtt telítési koncentrációban adtam a perfúzióhoz  $\text{NADP}^+$ -t ( $200 \mu\text{M}/\text{L}$ ). Ahogy az köztudott, az enzimek rendkívül szelektívek szubsztrátjaikra és nagyon alacsony koncentrációban is hatékonyan működnek. Ennek megfelelően nem tapasztaltam, hogy a hozzáadott glutamát dehidrogenáznak bármilyen mellékhatása lenne az agyszeletek élettani tulajdonságaira. A szabad glutamát koncentrációját így a nélkül sikerült csökkenteni, hogy a DNI-Glu•TFA koncentrációját csökkenteni kellett volna (DNI-Glu•TFA koncentráció 136 perc után enzim nélkül:  $2.4 \pm 0.019 \text{ mM}$ , enzimmel:  $2.39 \pm 0.019 \text{ mM}$ ,  $p = 0.66$ ). A DNI-Glu•TFA stabilitását enzim jelenlétében megerősítette az is, hogy a mért sejtekben uncaging-el kiváltott EPSP-k amplitúdója nem változott a mérések során ( $8.2 \cdot 10^{-4} \pm 4.1 \cdot 10^{-5} \% / \text{s}$ ,  $p = 0.84$ ). A glutamát enzimatis bontása az elektrofiziológiai kísérletek megbízhatóságán is javított, mivel az alap glutamát koncentráció növekedése aktiválja az NMDA receptorokat, fokozva az idegsejtek serkenthetőségét (Sah, Hestrin et al. 1989). Az általánosan nagyobb serkenthetőség megnövekedett szinaptikus tevékenységben nyilvánul meg (10. Ábra). Az EPSP-k gyakorisága nagyobb volt a legtöbb CA1-es piramissejtben, ha a perfúzióhoz DNI-Glu•TFA-t is adtunk ( $2.5 \text{ mM}$ )(kontroll:  $1.64 \pm 0.34 \text{ Hz}$ ; DNI-Glu•TFA:  $3.87 \pm 0.67 \text{ Hz}$ ,  $p < 0.01$ ,  $n = 8$ , 10. Ábra). Glutamát dehidrogenáz és  $\text{NADP}^+$  hozzáadása az EPSP-k gyakoriságát a DNI-Glu•TFA hozzáadása előtti kontroll szintjére csökkentette (DNI-Glu•TFA + glutamát dehidrogenáz +  $\text{NADP}^+$ :  $1.71 \pm 0.29 \text{ Hz}$ ;  $p=0.01$ ,  $n=8$ ; 10. Ábra). Az EPSP-k frekvenciájának növekedését nem okozhatta a sejtre érkező bemenetek dendritikus szűrése vagy egyéb változás a kísérleti körülményekben, mivel az EPSP-k amplitúdója nem változott a kísérletek során (kontroll:  $1.07 \pm 0.16 \text{ mV}$ ; DNI-Glu•TFA:  $1.11 \pm 0.28 \text{ mV}$ ,  $p = 0.9$ ,  $n=4$ . DNI-Glu•TFA + enzim +  $\text{NADP}^+$ :  $1.05 \pm 0.21 \text{ mV}$ ,  $p = 0.93$ ,  $n = 3$ ).



### 10. Ábra: A cage vegyületek spontán hidrolízisének enzimatis kompenzációja.

A: Spontán szomatikus EPSP-k egy piramissejtben a hippocampusz CA1-es régiójában kontroll körülmények között (kék), DNI-Glu•TFA jelenlétében (zöld) és glutamát dehidrogenáz +  $\text{NADP}^+$  hozzáadása után (piros). B: A spontán EPSP-k frekvenciája  $n=7$  CA1 piramissejtben kontroll körülmények között (kék), DNI-Glu•TFA jelenlétében és glutamát dehidrogenáz +  $\text{NADP}^+$  hozzáadása után (piros). C: A rögzített EPSP-k száma amplitúdójuk függvényében.

Bár a mérések során DNI-Glu•TFA hozzáadása a perfúzióhoz megnövelte a spontán EPSP-k frekvenciáját, amelyet glutamát dehidrogenáz és  $\text{NADP}^+$  hozzáadása a kontroll, DNI-Glu•TFA hozzáadása előtti szintre csökkentett (10. Ábra). Hosszabb mérési időtartamok (~150-200 perc) esetében azonban a módszer hatékonysága (a szabad glutamát koncentráció mérése alapján) csökkent. Mivel sok laboratóriumban, ahol cage vegyületeket használnak, a beoldott cage vegyületeket lefagyasztják és újra felhasználják, fontos, hogy hosszabb időtartam esetében is jól működjön a glutamát lebontása. Ezért a méréseket 10× mennyiségű glutamát dehidrogenázzal (2000-5200  $\mu\text{M/L}$ ) is megismételtem. A magasabb enzim

koncentráció gyorsította a glutamát lebontását, bár teljesen nem volt képes megszüntetni a felhalmozódást. Fontos megjegyezni, hogy az enzimatis módszerrel egységnyi idő alatt eltávolított glutamát mennyisége körülbelül hat nagyságrenddel kisebb, mint a túlélő agyszeletekben tapasztalt glutamát felvétel sebessége (Dzubay and Jahr 1999), így azokban nem zavarhatja meg a neuronok saját glutamát felvevő rendszereit, csak a káros felhalmozódást küszöböli ki. A glutamát enzimatis eliminációjával a négy cage vegyület (MNI-Glu•TFA, DNI-Glu•TFA, MNI-Ulg•TFA és DNI-Ulg•TFA) fotokémiai hatékonyságát az alap glutamát szint emelkedésének módosító hatásai nélkül hasonlíthattam össze.

## KONKLÚZIÓK

Az eredmények alapján a DNI-Glu•TFA hatékonyabb fotokémiai reakcióval rendelkezik, mint az MNI-Glu•TFA (6. és 7. Ábra). Ez feltehetően abból fakad, hogy a fotokémiai reakció során (9. Ábra) a hasznos reakcióút aktiválási energiája kisebb, mint az MNI-Glu•TFA-nak. Ennek köszönhetően kevesebb lézereenergia szükséges a fotokémiai gerjesztéséhez, amely így már elég alacsony ahhoz, hogy koncentrált, sok pontban történő uncaging esetében se legyen káros hatású a szövetre (Chiovini, Turi et al. 2014). A fordítva kapcsolt glutamát cage anyagok (MNI-Ulg•TFA és DNI-Ulg•TFA) hatékonysága nem közelítette meg a DNI-Glu•TFA hatékonyságát (6. és 7. Ábra). A hatékonyabb fotokémiai reakcióval együtt azonban a DNI-Glu•TFA-ból spontán hidrolízisen keresztül felszabaduló jelentős mennyiségű glutamát megnövelte a spontán EPSP-k frekvenciáját (10. Ábra), az NMDA receptorok aktivációján keresztül (Sah, Hestrin et al. 1989). Ezt a glutamát enzimatis bontásával kompenzáltam, glutamát dehidrogenáz és NADP<sup>+</sup> hozzáadásával (10. Ábra). Az itt bemutatott enzimatis glutamát elimináció egy jelentős adalék a kutatók uncaging eszköztárához, mivel lehetővé teszi a korábban használhatatlannak tartott jobb fotokémiai hatékonyságú, ám nagyarányú spontán hidrolízissel rendelkező cage vegyületek használatát. A módszer alkalmas nem csak a DNI-Glu•TFA, hanem általánosságban a glutamát cage vegyületek spontán hidrolízise során létrejövő, nemkívánatos mennyiségű glutamát jelentette probléma kezelésére. Az MNI-Glu•TFA ismert GABA<sub>A</sub> blokkoló hatásával (Fino, Araya et al. 2009) ellentétben a DNI-Glu•TFA nem csökkentette az IPSC-k amplitúdóját azonos koncentrációban (8. Ábra).

Összefoglalva, dolgozatomban bemutattam, hogy a DNI-Glu-TFA a hidrolízis enzimatis korrekciójával együtt hatékonyabb glutamát cage vegyület, mint az MNI-Glu-TFA. Nincs hatással a GABA<sub>A</sub> receptorokra, ugyanakkora hatás kiváltásához pedig kevesebb lézereenergiát igényel, ezáltal mind az elektrofiziológia, mind a két-foton uncaging szempontjából jobb választás az MNI-Glu-TFA-nál.

## **Tételes szerzői hozzájárulás**

Alulírott Madarász Miklós kijelentem, hogy a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül a(z)

- Túlélő agyszeletek készítését
- Elektrofiziológiai méréseket
- Két-foton képalkotást
- Két-foton uncaginget

végeztem.

.....

Madarász Miklós

Budapest, 2015.01.06.