

Pázmány Péter Katolikus Egyetem
Információs Technológiai és Bionikai Kar
Roska Tamás Műszaki és Természettudományi Doktori Iskola



Pálfi Dénes

*Nagy hatékonyságú két-fotonos fotoaktív anyag használata
neurobiológiai kísérletekben*

PhD disszertáció tézisei

Témavezető:

Dr. Rózsa J. Balázs

Budapest, 2020

I. BEVEZETÉS

Az utóbbi évtizedben hatalmas változáson ment keresztül az idegtudomány mérés technikai szempontból. A két-foton lézeres pásztázó mikroszkópia forradalmasította az élő szöveten végzett képalkotást. Korábban funkcionális képalkotáshoz is konfokális lézermikroszkópiát használtak, de manapság a technika „kézzel fogható” limitációi miatt főleg anatómiához használják, míg a két fotont funkcionális élő szövetes vizsgálatokhoz. A kutatóknak lehetőségük van kérdéseiket más megközelítésben feltenni, kombinálni a modern képalkotási eljárásokat klasszikus módszerekkel, mint például az elektrofiziológiai elvezetés. Persze az elektrofiziológia csak egy kiragadott példa a rengeteg elérhető technika közül. Ugyanilyen érdekes kombináció a kémiai és vírusos jelölések, fokális és optogenetikai célzott stimulációk vagy éppen a viselkedési feladatok házasítása a két foton képalkotással. A következő néhány évtized fő kísérleti eszköze a kétfoton képalkotás lett.

Ezen állítások ugyanígy helytállóak ha a két-fotonos fotoaktivációról vagy köznapibb nevén „uncaging”-ről beszélünk. Az ezredforduló után néhány kutatócsoportnak sikerült olyan fényérzékeny ketrec („caged”) molekulát szintetizálni, ami bár alacsony két-fotonos hatáskeresztmetszettel rendelkezik, de sikeresen használták releváns biológiai kérdésekben. Felismerték, hogy a molekula

két-fotonos hatásfokát csak úgy lehet növelni, ha a molekulastabilitás csökken. Disszertációmban bemutatom, hogy ez az állítás csak kis részben igaz és van rá módszer, hogy az érzékeny instabil anyagokat biológiai kísérletben lehessen alkalmazni. Az első részben részletesen bemutatok egy sor új molekulát, amely a jelenleg a világon elterjedt anyagnál majdnem egy nagyságrenddel érzékenyebb. Részletes validációs protokollt dolgoztam ki, amely alátámasztja az anyagok hatékonyságát. A második részben pedig egy olyan kísérletsorozatban alkalmazom, amelyben hagyományos anyagokkal nem lett volna lehetséges feltárni ilyen részletességgel a dendritikus folyamatokat. A dendritikus fotoaktívációs modellezéssel lehetőségünk nyílik a végbemenő folyamatokat olyan részletességgel vizsgálni, ahogy korábban arra nem volt még lehetőség.

II. KITŰZÖTT FELADATOK

A kísérletekben széles körben alkalmazott MNI-Glu számos jól ismert mellékhatással rendelkezik. Ezek közé tartozik az alacsony határfok és a koncentrációfüggő antagonistista hatása. Célunk az volt, hogy egy olyan anyagot hozzunk létre, amely mentes a blokkoló hatásoktól vagy legalábbis szignifikánsan csökkenjen illetve magas két-fotonos határfokkal rendelkezzen. A határfokot növelve, lehetővé válhat a folyamatok részletesebb mélyebb vizsgálata. Az alacsonyabb laserintenzitás csökkenti a fototoxicitást, így a sejt nyúlványok hosszabb ideig maradnak vizsgálhatóak.

K1: Kvantumkémiai modellezést használva, lehetőség van-e olyan anyag előállítására, amely magas két-fotonos határfokkal rendelkezik, de mentes a mellékhatásoktól?

K2: Lehetséges-e olyan biológiai kísérletekben felhasználni, amelyben egyedi sejtet vagy akár sejthálózatot kell nagy hatékonysággal modulálni időben is térben egyaránt?

III. ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

III.1. Agyszelet preparáció és elektrofiziológia

Akut túlélő agyszeleteken végzett hippokampális kísérletek. A felhasznált állatok 15-20 napos egerek illetve patkányok voltak. Forános altatás után 300 μm -es horizontális agyszeletek lettek vágva vibratómmal és szobahőmérsékleten mesterséges agyfolyadékban tárolva egy egyedi készítésű inkubátorban. Teljes sejt elvezetés mérések 32°C-on készültek 6-9 M Ω -os patch pitettával. A pipetta intercelluláris folyadékkal, Fluo-4 kalcium kötő festékkel, ALEXA 594 vörös anatómiai festékkel és biocitinnel volt feltöltve. A mérések során csak azokat a sejteket tartottam meg amelyeknek a nyugalmi membrán potenciálja alacsonyabb volt -50 mV-nál. Az elektrofiziológiai tulajdonságaik szerint a sejtek piramis és interneuronok voltak. A GABA áramok kiváltása fokális stimulációval AP5 és CNQX (AMPA és MND A receptor antagonisták) jelenlétében történt. A stimulációhoz az üvegpipettát mesterséges agyfolyadékkal töltöttem meg és a szomától 10-15 μm távolságra a következő stimulációt alkalmaztam: 0,1 ms, 10-50 V, 10 ms pulzus hossz, 1 stimulus. Csak azokat a kiváltott jeleket fogadtam el, ahol jól látható volt a szinaptikus késés.

III.2. Két-foton képalkotás

Két-fotonos képalkotáshoz két dimenziós lézer pásztázó mikroszkópot (Femto 2D galvo, Femtonics Kft.) és femtoszekundumos lézert (Mai Tai HP, SpectraPhysics) használtam. A teljes sejt elvezetés megkezdése után 15-20 perccel az egyenletes festékeloszlás miatt. A hosszú nyúlványok mérése "Multiple Line Scanning" technikával történt. A mérések után minden sejtről részletes nyúlvány térkép készült. A mérés és kiértékelés a

mikroszkóp saját egyedi szoftverével a MATLAB alapú MES programmal készült.

III.4. Két-foton fotoaktiváció

A teljes sejt elvezetés alatt az idegsejt (piramis vagy interneuron) calcium érzékeny festékkel (Fluo-4, 100 μM) let feltöltve és a kamrában lévő folyadékhoz méréstől függően 2.5 mM MNI-Glu•TFA (1), DNI-Glu•TFA (2), MNI-Ulg•TFA (3), or DNI-Ulg•TFA (4) let hozzáadva. A molekula fotoaktivációja 690-830 nm között történt egy femtoszekundumos pulzuslézerrel (Cameleon Ultra II, Coherent). A fotoaktiváció lézerintenzitását egy electro-optikai modulátorral végeztem (Model 350-80 LA, Conoptics). A fotoaktivációs lézernyaláb becsatolása a fényútba dikroikus tükörrel történt (z750bcm; Chroma Technology Corp). A mérés (képalkotás és fotoaktiváció) egy galvo szkenerrel valósult meg, a képalkotás közben a kijelölt 15-25 aktivációs pontba ugrott a szkener majd tért vissza a képalkotáshoz. Az aktiváció pontok pozíciói minden mérés előtt korrigálva lettek manuálisan. A nyúlvány melletti aktivációs pontok 0,8-1 μm köztes távolsággal lettek kijelölve. A fotoaktivációs anyagok összehasonlítása ugyanazon sejt, ugyanazon nyúlványán azonos mintázattal és lézer intenzitással történt. A perfúziós sebesség 6 ml/perc sebességgel történt, hogy növeljem az anyag a sejt körüli cseréjét. A dehidrogenázt (Sigma-Aldrich) és NADP⁺-t (β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrate, Sigma-Aldrich) szintén a kamrába let hozzáadva vagy egyes esetekben pipettában a sejt közvetlen közelébe (50-100 μM kezdeti koncentrációval) hogy kompenzáljam a koncentráció csökkenését a reakció közben a sejt közvetlen közelében. Az eredményeknél a standard hiba került feltüntetésre, ha a szöveg nem jelez mást. Az összehasonlításhoz páros t-tesztet használtam.

IV. EREDMÉNYEK

A kutatásom célja az volt, hogy jobban megérthessük a kapcsolatot a spontán hidrolízis, a két-fotonos hatáskeresztmetszet, a két-fotonos spektrum és a molekula szerkezete között. A vizsgálathoz szintetizáltuk a korábban publikált MNI-Glutamátot és másik 3 új ketrec molekulát, majd megmértem a két-fotonos tulajdonságaikat biológiai kísérletekben és összehasonlítottam a kvantumkémiai modellezés eredményeivel. A kísérleti eredmények jó egyezést mutattak a modellezésből kapott adatokkal, amely megmutatta, hogy bár a DNI-Glu magasabb két-fotonos hatáskeresztmetszettel rendelkezik, mint az MNI-Glu, de a spontán hidrolízis sebessége is nagyobb. Ezt a nem kívánatos hátrányt egy eddig nem alkalmazott biokompatibilis glutamát eliminációval kompenzáltam.

IV.1. TÉZISEK

1.1 **A DNI-Glu•TFA (2) magasabb két-fotonos hatáskeresztmetszettel rendelkezik mint az MNI-Glu (1).** A kvantumkémiai modellezés adatai szerint a DNI-Glu•TFA magasabb gerjesztési hatáskeresztmetszettel rendelkezik. A

modell szerint nagyjából egy nagyságrenddel érzékenyebb molekula mint a MNI-Glu. A biológiai kísérletek jó közelítéssel ugyanezt az eredményt adták (a kalcium mérések során). Kijelenthető, hogy az anyag jobb két-fotonos tulajdonságokkal rendelkezik, mint az eddig publikált két-fotonos ketrec molekulák.

Kapcsolódó publikációk: Pálfi és mtsai., 2018.; Chiovini és mtsai., 2014.

1.2 Az enzim korrekcióval csökkenthető a szabad glutamát mennyisége a DNI-Glu•TFA-val végzett mérések alatt. Korábbi tanulmányokból ismert, hogy az anyag biológiai használhatóságát leginkább korlátozó tulajdonság a spontán hidrolízis. Kísérletben megmutattam, hogy az új enzim korrekcióval a szabad glutamát szint szignifikánsan csökkenthető.

Kapcsolódó publikációk: Pálfi és mtsai., 2018.; Vasanits-Zsigrai és mtsai., 2015.

1.3 GABA-A receptor antagonist hatása szignifikánsan alacsonyabb mint az irodalomban közölt MNI-Glu-é. További fontos szempont, hogy a fotoaktív anyag spontán bekötése különböző ion csatornáknál alacsony legyen. Ennek mértékére már a molekula szerkezetéből következtetni

tudunk. Az elméleti számítások összhangban álltak a kísérleti eredményekkel miszerint a DNI-Glu•TFA GABA-A gátló hatása szignifikánsabb alacsonyabb, mint a MNI-Glu molekuláé.

Kapcsolódó publikációk: Pálfi és mtsai., 2018.

1.4 A DNI-Glu•TFA nem okoz szignifikáns változást K⁺-áram amplitudójában. PA kálium csatornáknak fontos szerepe van az idegi szabályozásban, a nyugalmi membrán potenciál fenntartásában illetve az akciós potenciál repolarizációs fázisában. Fontos kérdés volt, hogy okoz-e változást az elektrofiziológiai tulajdonságaiban a neuronnak a DNI-Glu•TFA jelenléte. Kimutattam, hogy nem okoz szignifikáns változást a DNI-Glu•TFA, nincs gátló hatása a K⁺ csatornákra.

Kapcsolódó publikációk: Bywalez és mtsai., 2015.; Pálfi és mtsai., 2018.

2.1 Dendritikus Ca²⁺ tüskék vizsgálata és modellezése két-foton glutamát fotoaktivációval hippocampális PV+ interneuronokban. A parvalbimun interneuronok nyúlványainak aktív hálózati állapotban betöltött szerepe az irodalomban kevésbé ismert. Az éles hullám alatt megfigyelt

spontán dendritikus kalcium tüskék a dendritfa disztális részein korábban nem vizsgálták. Ennek egyik oka, hogy nem volt olyan kedvező tulajdonságokkal rendelkező fotoaktív molekula amivel ez lehetővé válhatott volna. Kísérletekben megmutattam, hogy glutamát fotoaktivációval kiváltható Ca^{2+} tüske és a távoli vékony nyúlványokon is, ezáltal vizsgálhatóvá, modellezhetővé váltak.

Kapcsolódó publikációk: Chiovini és mtsai. 2014., Pálfi és mtsai., 2018.

2.2 – Ion csatorna eloszlás meghatározása nyúlványokban hosszú időskálájú farmakológiai kísérletekben. A DNI-Glu kedvező tulajdonságai mellett a legnagyobb hátránya a magas spontán hirtelenség. A mérések során enzimes korrigálás nélkül hosszú farmakológiai kísérletek nem lehetségesek. Kísérletileg megmutattam, hogy enzimes korrigálással időben stabil dendritikus kalcium tüske váltható ki és modellezhető válik az annak kialakításában részt vevő ion csatornák eloszlása.

Kapcsolódó publikációk: Pálfi és mtsai. 2018.; Chiovini és mtsai. 2014.

V. POTENCIÁLIS FELHASZNÁLÁSI TERÜLETE A MUNKÁNAK

A modern idegtudományban, a két-fotonos fotoaktívációs technika jelentős szerepet játszik. Az új molekula struktúrák szintetizálása rendkívül drága és megtalálni a megfelelő jelöltek a legalább 15 millió molekula közül nagy kihívás is egyben. A nagy teljesítményű számítógépek és a kvantumkémiai modellezés segítségével lehetőségünk nyílik arra, hogy a folyamatot felgyorsítsuk és célzottan a legalkalmasabb molekulákat alkossuk meg. A megfelelő anyagok és technika alkalmazásával pedig ilyen részletességgel vizsgálhatjuk az idegsejtek dendritikus integrációját, amelyre korábban nem volt lehetőség. A dolgozatban 3 új anyagot mutattam be, amelyek közül egy kedvezőbb tulajdonságokkal rendelkezik, mint a jelenleg kapható és széles körben használt molekula. A megmutatott DNI-Glu reményeim szerint le fogja váltani elődjét és új fejezetek nyílhatnak az idegsejtek működésének megértésében.

VI. KÖSZÖNETNYÍLVÁNYÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni elsősorban a témavezetőmnek dr. Rózsa Balázsnak, akinek az útmutatása és tanácsai nélkül nem jöhetett volna létre jelen dolgozat. Köszönöm, hogy csatlakozhattam a laborjához, egy rendkívül színes és dinamikus csapathoz. A kollégáimtól bármikor kérhettem segítséget, remélem az évek alatt sikerült valamelyest viszonznom is!

Köszönetemet szeretném még kifejezni közelebbi kollégáimnak: Katona Gergelynek, Szalay Gergelynek, Sulcz-Judák Lindának, Kaszás Attilának, Juhász Gábornak, Szadai Zoltánnak, Majoros Myrtilnek és Madarász Miklósnak.

Köszönet a Pázmány Péter Katolikus Egyetem Információs technológia és Bionika Kar munkatársainak és közösségének a fantasztikus atmoszférájáért, amit létrehoztak. Köszönök minden apró segítséget és tanácsot, amik néha a legtöbbet segítik.

Nem maradhat köszönet nélkül legközelebbi kollégám és barátom, Chiovini Balázs sem, akivel évekig együtt dolgoztunk a projekten, akár éjszakákon át. Az Ő kitartása nekem is erőt adott, egy-egy nehezebb időszakban.

További szívből jövő köszönet illeti a vegyész csapatot különösen professzor Csizmadia Imrét, Mucsi Zoltánt, Lukácsné Haveland Csillát és Frigyesi Orsolyát. Nélkülük jelen dolgozat nem jöhetett volna létre. Végül szeretném megköszönni családomnak a támogatást, amellyel segítették jelen dolgozat létrejöttét.

VII. Kapcsolódó publikációk és konferencia kiadványok

High efficiency two-photon uncaging coupled by the correction of spontaneous hydrolysis.

Pálfi D, Chiovini B, Szalay G, Kaszás A, Turi GF, Katona G, Ábrányi-Balogh P, Szőri M, Potor A, Frigyesi O, Lukácsné Haveland C, Szadai Z, Madarász M, Vasánits-Zsigrai A, Molnár-Perl I, Viskolcz B, Csizmadia IG, Mucsi Z, Rózsa B.

Org Biomol Chem. 2018 Mar 2. doi: 10.1039/c8ob00025e.

Impact factor: 3.564

Dendritic spikes induce ripples in parvalbumin interneurons during hippocampal sharp waves.

Chiovini B, Turi GF, Katona G, Kaszás A, Pálfi D, Maák P, Szalay G, Szabó MF, Szabó G, Szadai Z, Káli S, Rózsa B.

Neuron. 2014 May 21;82(4):908-24.

doi: 10.1016/j.neuron.2014.04.004.

Impact Factor: 15.054

Local postsynaptic voltage-gated sodium channel activation in dendritic spines of olfactory bulb granule cells.

Bywalez WG, Patirniche D, Rupprecht V, Stemmler M, Herz AV, Pálfi D, Rózsa B, Egger V.

Neuron. 2015 Feb 4;85(3):590-601. doi:

10.1016/j.neuron.2014.12.051. Epub 2015 Jan 22.

Impact Factor: 15.054

Quantitation of various indolyl caged glutamates as their o-phthalaldehyde derivatives by high performance liquid chromatography coupled with tandem spectroscopic detections: derivatization, stoichiometry and stability studies.

Vasánits-Zsigrai A, Majercsik O, Tóth G, Csámpai A, Haveland-Lukács C, Pálfi D, Szadai Z, Rózsa B, Molnár-Perl I.

J Chromatogr A. 2015 May 15;1394:81-8. doi:

10.1016/j.chroma.2015.03.039. Epub 2015 Mar 25.

Impact Factor: 4.169

Fast three-dimensional two-photon scanning methods for studying neuronal physiology on cellular and network level

Szalay G, Judák L, Szadai Z, Chiovini B, Mezey D, Pálfi D, Madarász M, Ócsai K, Csikor F, Veress M, Maák P, Katona G.

Orv Hetil. 2015 Dec 27;156(52):2120-6. doi: 10.1556/650.2015.30329. Hungarian.

Impact Factor: 0.291

Tézishez nem kapcsolódó publikációk

Combined two-photon imaging, electrophysiological, and anatomical investigation of the human neocortex in vitro

Bálint Péter Kerekes, Kinga Tóth, Attila Kaszás, Balázs Chiovini, Zoltán Szadai, Gergely Szalay, Dénes Pálfi, Attila Bagó, Klaudia Spitzer, Balázs Rózsa, István Ulbert, and Lucia Wittner
Neurophoton. 2014; 1(1):011013. doi: 10.1117/1.NPh.1.1.011013

Silicon carbide quantum dots for bioimaging

D. Beke, Zs. Szekrenyes, D. Palfi, G. Rona, I. Balogh, P. Maak, G. Katona, Zs. Czigany, K. Kamaras, B. Rozsa, L. Buday, B. Vertessy, and A. Gali

Journal of Materials Research Vol. 28, Issue 02, 2012, pp 205-209

Konferencia előadások

New caged compounds

Dénes Pálfi, Balázs Chiovini, Gergely Szalay, Gergely Katona, Balázs Rózsa

KOKI Days 2013, Poroszló, Hungary

Three-dimensional two-photon functional imaging with millimeter z-scanning range and sub-millisecond temporal resolution in vivo and in vitro.

Pálfi D., Katona G., Szalay G., Maák P., Kaszás A., Veress M., Hillier D., Chiovini B., Vizi ES., Roska B., Rózsa B.

MMT 2012, Siófok, Hungary

Local calcium events investigating in hippocampal CA1 interneurons and pyramidal cells with real-time multi-photon scanning technic.
Dénes Pálfi, Balázs Chiovini, Gergely F. Turi, Gergely Katona, Gábor Tamás, Attila Kaszás, Gergely Szalay, B. Rózsa
MMT 2011, Siófok, Hungary

Konferencia poszterek

Denes Palfi, Balázs Chiovini, Linda Judak, Gergely Szalay, Gábor Juhász, Gergely Katona, Balázs Rózsa

Three-dimensional calcium imaging of mouse hippocampal neuronal ensembles during sharp wave-ripple complexes. SFN 2016, San Diego, USA

Dénes Pálfi, Gergely F. Turi, Balázs Chiovini, Attila Kaszás, Pál Maák, Gergely Katona, Gábor Szabó, Gergely Szalay, Zoltán Szadai, Miklós Madarász, Szabolcs Káli, Balázs Rózsa

Dendritic integration in fast-spiking, parvalbumin-expressing interneurons during sharp wave-ripple activity. FENS 2014, Milano, Italy

Dénes Pálfi, Balázs Chiovini, Gergely Katona, Zoltán Szadai, Attila Kaszás, Gergely Turi, Balázs Rózsa

Hippocampal sharp waves associated dendritic calcium transients revealed by three dimension acousto-optic imaging in parvalbumin positive interneurons. SFN 2013, San Diego, USA

Dénes Pálfi, Gergely Szalay, Klaudia Spitzer, Gergely Katona, Attila Kaszás, Balázs Chiovini, Miklós Madarász, Imre Csizmadia, Balázs Rózsa

More effective caged compounds for two photon uncaging, MITT 2013, Budapest, Hungary

Dénes Pálfi, Gergely Katona, Balázs Chiovini, Gergely Szalay, Klaudia Spitzer, Attila Kaszás, Balázs Rózsa

Roller Coaster Scanning Method for high-resolution 3D two photon laser scanning, FENS 2012, Barcelona, Spain

Dénes Pálfi, Balázs Chiovini, Klaudia Spitzer, Gergely Katona, Attila Kaszás, Gergely Szalay, Zoltán Szadai, Csilla Haveland Lukácsné, Orsolya Majercsik, Zoltán Mucsi, Imre Csizmadia, Balázs Rózsa

Development of new GABA and more effective glutamate uncaging materials for two-photon microscopy. IBRO Workshop 2012, Szeged, Hungary.

Dénes Pálfi, Balázs Chiovini, Klaudia Spitzer, Gergely Katona, Attila Kaszás, Gergely Szalay, Zoltán Szadai, Csilla Haveland Lukácsné, Orsolya Majercsik, Zoltán Mucsi, Imre Csizmadia, Balázs Rózsa

Development of new GABA and more effective glutamate uncaging materials for two-photon microscopy. 3rd European Synapse Meeting, 13th – 15th October 2011, Balatonfüred, Hungary

Szabadalom

Dr. Csizmadia Imre Gyula, Mucsi Zoltán, Lukácsné Haveland Csilla, Katona Gergely, Dr. Rózsa József Balázs, Majercsik Orsolya, Potor Attila, Kaszás Attila, Gündisch Dorina, Chiovini Balázs, Szalay Gergely, **Pálfi Dénes**, *Fotoaktív vegyületek alkalmazása*, **P1100550**