Gamma-hidroxi vajsav (GHB) és borostyánkősav kötődésének és hatásának összehasonlító vizsgálata *nucleus accumbens*-ben

Ph.D. tézisek

Molnár Tünde

SEMMELWEIS EGYETEM

IDEGTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

Témavezető: Dr. Palkovits Miklós D.Sc.

Bírálók: Dr. Juhász Gábor DSc, Dr. Rónai András Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Fürst Zsuzsanna D.Sc.

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Matkó János D.Sc.,

Dr. Gerber Gábor C.Sc.

MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA, KÉMIAI KUTATÓKÖZPONT,

BIOMOLEKULÁRIS KÉMIAI INTÉZET, NEUROKÉMIAI OSZTÁLY

Budapest, 2009

BEVEZETÉS

A gamma-hidroxi vajsav (GHB) egy rövid szénláncú zsírsav, mely gamma-amino vajsavból (GABA), a központi idegrendszer fő gátló neurotranszmitteréből keletkezik és borostyánkősavon (szukcinát, SUC) keresztül bomlik le a szervezetben. A GHB alkalmazása dózis-függő módon eufóriát, szorongásoldást, altató hatást, mozgásbeli zavarokat, epilepsziát és végül kómát vált ki. A GHB kábítószerként is igen elterjedt, ismétlődő alkalmazása függőség kialakulásához vezet. Magyarországon 2006-ban került a tiltott szerek listájára.

A GHB gyenge $GABA_B$ receptor agonista, ugyanakkor saját nagy-affinitású kötőhelye és transzport-rendszere is ismert. A GHB az agyban mikromoláris koncentrációban, míg perifériás szervekben nagyobb koncentrációban fordul elő. Egymásnak ellentmondó publikációk számolnak be a GHB $GABA_B$ receptor-függő és független hatásairól, melyek indokolttá teszik a GHB specifikus kötőhelyeinek további vizsgálatát, ezen belül a GHB kötődés és a GHB-val metabolikus kapcsolatban álló SUC lehetséges kölcsönhatását.

Kutatásaim középpontjában a *nucleus accumbens* (NAc) állt, mely a függőség kialakulásáért felelős agyterület. A NAc sejtjei funkcionális hálózatokat alkotnak, melyeket a közöttük nagy számban előforduló réskapcsolatokon ('gap-junction') keresztül valósítanak meg. Ismeretes, hogy droghasználat során a réskapcsolatok száma megnő, mely jelenség szerepet játszhat a különböző drogok hatására fellépő örömérzet, valamint a függőség kialakulásában.

Munkám során arra kerestem a választ, hogy a veszélyes kábítószerként nyilvántartott GHB és a sejtek energiaháztartásában nélkülözhetetlen szerepet játszó SUC, mely agyi membránfehérjéhez köthető molekuláris

kapcsolatban állnak egymással és a réskapcsolatokkal a NAc-ben. Ennek érdekében patkány előagyból illetve humán NAc-ből előállított szinaptikus membránfrakcióban radioaktív nyomjelzéses technikákat alkalmaztunk. A SUC és GHB sejtszintű hatásainak vizsgálatára fluoreszcens Ca^{2+} ion festékkel jelölt NAc sejtek intracelluláris Ca^{2+} ion koncentráció-változásait követtük nyomon pásztázó konfokális lézermikroszkóp alkalmazásával.

CÉLKITŰZÉSEK

1. Feladatom volt az önálló, $GABA_B$ receptor független, specifikus GHB receptor létezését tisztázni és jellemzőit felderíteni különböző fajokban (patkány és ember) és agyterületeken (teljes előagy, NAc és GP), továbbá

2. meghatározni a specifikus SUC kötődés jellemzőit és felderíteni a kötőhely ligandum-specificitását különböző fajokban (patkány és ember) és agyterületeken (teljes előagy, NAc), valamint

3. azonosítani a GHB és SUC feltételezett közös kötőhelyét.

4. Feladatom volt a potenciálisan létező $GABA_B$ független GHB receptor funkció kimutatása és jellemzése izolált NAc agyszeletben.

5. Célom volt a SUC, a GHB és a réskapcsolatok esetleges funkcionális kapcsolatának vizsgálatára alkalmas protokoll kidolgozása és alkalmazása a funkcionális kapcsolat jellemzésére.

MÓDSZEREK

Agyszövet preparátumok előállítása

A radioaktív nyomjelzéses mérésekhez szubcelluláris membránfrakciókat állítottunk elő patkány előagyból vagy humán NAc-ből illetve GP-ből. A *szinaptoszóma* frakció elkülönítésére a homogenizált agyszövetet cukor-grádiensen centrifugáltuk. A frakciót lefűződött preszinaptikus idegvégződések – szinaptoszómák – alkotják, melyekhez a posztszinaptikus felszín is hozzátapadhat. A *szinaptoszóma* frakció ozmotikus sokkot követő centrifugálásával nyertük az extraszinaptikus plazmamembrán vezikulákat valamint a 'junctional' komplexet és posztszinaptikus denzitást dúsítva tartalmazó *szinaptoszómális membránfrakciót*.

Radioaktív ligandum kötődési mérések

A membránba ágyazott, specifikus kötőhelyek kvantitatív meghatározása érdekében [^{3}H]GHB vagy [^{3}H]SUC kötődési méréseket végeztünk patkány előagyból, humán NAc-ből vagy GP-ból előállított szinaptoszómális membránfrakcióban. A szinaptoszómális membránfrakciót tartalmazó mintákat - különböző koncentrációjú ligandumok jelenlétében vagy távollétében, - [^{3}H]GHB-vel vagy [^{3}H]SUC-tal inkubáltuk egy órán keresztül 4°C-on. A nem-specifikus radioaktív kötődést 1 mM GHB vagy 30 mM SUC hozzáadásával határoztuk meg. A membránhoz kötött radioaktivitást centrifugálással szeparáltuk. A minták radioaktivitását folyadékszintillációs spektrométerrel határoztuk meg.

Radioaktív felvétel meghatározása

A specifikus SUC transzport kvantitatív meghatározásához [^{3}H]SUC felvételi méréseket végeztünk patkány előagyból előállított szinaptoszóma frakcióban. Az agyszövet mintákat [^{3}H]SUC-tal inkubáltuk egy percig, miután különböző teszt-ligandumokkal kezeltük elő. A nem specifikus radioaktív felvétel meghatározásához 1 mM SUC-t alkalmaztunk. Az inkubálást követően a mintákat azonnal üvegszűrőn szűrtük, majd az üvegszűrők radioaktivitását folyadékszintillációs spektrométerrel határoztuk meg.

Radioaktív kibocsátás meghatározása

A különböző teszt-vegyületek hatására bekövetkező SUC kibocsátás meghatározásához patkány akut agyszeletekből kimetszett NAc-t használtunk. Az NAc metszeteket [^{14}C]SUC (200 μM) oldattal inkubáltuk, majd egy zárt mikrotérfogatú kamrába helyeztük, ahol oxigénnel dúsított mesterséges agyfolyadékkal ('artificial cerebrospinal fluid', ACSF) áramoltattunk. A kamrából távozó folyadékot egy automatizált cseppszámlálóval ellátott frakciószedővel gyűjtöttük, melyből mind az alap, mind a kiváltott radioaktív kibocsátást meghatároztuk. A minták radioaktivitását folyadékszintillációs spektrométerrel határoztuk meg.

Intracelluláris Ca^{2+} ion változások követése konfokális lézer mikroszkópiával

Frissen izolált koronális agyszeleteket Ca^{2+} ion-szenzitív fluoreszcens festéket, Fluo-4-et (5 μM) tartalmazó, oxigénnel dúsított ACSF-ben festettük. A sejtek fluoreszcencia-változásait a NAc területén konfokális lézermikroszkóppal követtük. Egyes ligandumok hatását az intracelluláris Ca^{2+} ion

tranziensekre a felvillanó sejtek számával vizsgáltuk. Ezen túlmenően, réskapcsolatokon keresztül terjedő Ca^{2+} ion hullámokat váltottunk ki ATP-vel, majd figyeltük az egyes ligandumok Ca^{2+} ion hullámra gyakorolt hatásait.

Immunfluoreszcens sejtazonosítás

A Ca^{2+} ion tranzienseket mutató sejtek azonosítására gliális marker, S100B, illetve az ATP-vel kiváltott Ca^{2+} ion hullámban részt vevő sejtek azonosítása érdekében fluoreszcens GFAP (specifikus asztroglia fibrilláris fehérje) immunreakciókat végeztünk. Az immunpozitív sejtek detektálásához fluoreszcens jelzőanyaggal ellátott, Alexa 594-konjugált másodlagos antitestet alkalmaztunk. A sejtek azonosítását konfokális lézermikroszkóppal végeztük.

Eredmények kiértékelése

A mérések statisztikai kiértékeléshez az OriginPro 7.5 program beépített 'one-way ANOVA'-próbáját és 'Student's' *t*-próbáit (párosított és független) használtuk. Az adatokat átlag ± S.D-ben fejeztük ki a radioaktív nyomkövetéses méréseknél és átlag ± S.E.M–ben, a konfokális képalkotó kísérleteknél. Adatainkat minden esetben $p<0,05$ határérték szintnél tekintettük szignifikánsnak.

1. Bebizonyítottuk, hogy létezik egy $GABA_B$ receptor-független GHB célfehérje, mely kölcsönhatásba lép a citromsav-ciklus köztitermék SUC-tal és a réskapcsolat gátlószer karbenoxolonnal (CBX). A specifikus SUC-, és CBX-szenzitív GHB receptort kimutattuk humán NAc és GP mintákban is.

2. Megállapítottuk, hogy létezik egy specifikus SUC kötőhely, mely GHB-szenzitív, kölcsönhatásba lép a réskapcsolat gátlószer CBX vegyülettel, valamint független a SUC transzportfolyamataitól. A GHB-, és CBX-szenzitív specifikus SUC kötőhelyet kimutattuk humán NAc mintákban is.

3. Az egyetlen elfogadott specifikus GHB receptor ligandum, az NCS-382 vegyület királis tulajdonságait kihasználva jellemeztük a specifikus GHB és a nagy-affinitású SUC kötőhelyek (*R*)-, és (*S*)-NCS-382 leszorítási profilját. Az NCS-382 sztereoizomerekkel végzett leszorítási eredmények értelmében kijelenthetjük, hogy a nagy-affinitású specifikus SUC kötőhely megegyezik a GHB receptorral.

4. Felismertük, hogy a GHB intracelluláris Ca^{2+} ion koncentrációnövekedést vált ki egyes NAc asztrocitákban, mely hatása a $GABA_B$ receptoroktól független. Ezt a GHB hatást nemcsak patkány NAc asztrocitákban, hanem $GABA_B$ receptorokat nem tartalmazó, génkiütött egerekben is kimutattuk. A GHB NAc asztrociták Ca^{2+} ion koncentráció növelő hatása független a neuronális aktivitástól és a vezikuláris neurotranszmitter felszabadulástól.

5. A funkcionális réskapcsolatok vizsgálatára alkalmas protokoll alkalmazásával kimutattuk, hogy a SUC koncentráció-függő módon befolyásolja az ATP-vel kiváltott CBX-szenzitív, és ezért valószínűleg réskapcsolatokon keresztül terjedő Ca^{2+} ion hullámokban részt vevő asztrociták számát és fluoreszcenciáját. A GHB kis koncentrációban hasonló hatást gyakorol a Ca^{2+} ion hullámokban részt vevő asztrociták számára és fluoreszcenciájára.

KONKLÚZIÓ

A tézipontokban ismertetett eredmények alapján kijelenthetjük, hogy a veszélyes kábítószerként ismert GHB és a citromsav-ciklus köztitermék SUC közös, membránba ágyazott kötőhellyel rendelkezik. Ez a kötőhely a $GABA_B$ receptoroktól független, ugyanakkor kölcsönhatásba lép réskapcsolat fehérjékre specifikusnak tartott vegyületekkel. Eredményeink a SUC sejtek közötti, réskapcsolatokon keresztül megvalósuló jelátvitelben játszott nem várt szerepére utalnak.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

1. **Molnár T**, Kútiné FE, Kardos J, Simon-Trompler E, Palkovits M, Emri Zs. (2006) Metabolic GHB precursor succinate binds to γ-hydroxybutyrate receptors: characterization of human basal ganglia areas *nucleus accumbens* and *globus pallidus*. J Neurosci Res, 84: 27–36.

2. **Molnár T**, Kútiné FE, Kardos J, Palkovits M. (2007) Characterization of specific succinate binding site in brain synaptic membranes. Ideggyogy Sz, 60: 201-204.

3. **Molnár T**, Barabás P, Héja L, Kútiné FE, Lasztóczi B, Szabó P, Nyitrai G, Simon-Trompler E, Hajós F, Palkovits M, Kardos J. (2008) Gamma-hydroxybutyrate binds to the synaptic site recognizing succinate monocarboxylate: a new hypothesis on astrocyte–neuron interaction via the protonation of succinate. J Neurosci Res, 86: 1566-7156.

4. **Molnár T**, Visy J, Simon A, Moldvai I, Temesvári-Major E, Dörnyei G, Kútiné FE, Kardos J. (2008) Validation of high-affinity binding sites for succinic acid through distinguishable binding of gamma-hydroxybutyric acid receptor-specific NCS 382 antipodes. Bioorg Med Chem Lett, 18: 6290-6292.

5. **Molnár T**, Antal K, Emri Zs. (2009) Gamma-hydroxybutyrate induces $GABA_B$ receptor independent intracellular Ca^{2+} transients in astrocytes, but has no effect on the GHB or $GABA_B$ receptors of medium spiny neurons in the *nucleus accumbens*. Neuroscience, *közlésre elfogadva* (kézirat száma: NSC-09-266).

6. **Molnár T**, Barabás P, Emri Zs, Palkovits M, Kardos J. ATP-induced astrocytic Ca^{2+} waves in the nucleus accumbens: Multiple effects of succinic acid. Neuroscience, *beküldés alatt*.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁBAN MEGJELENT REFERÁLT ELŐADÁSKIVONATOK

1. **Molnár T**, Emri Zs, Simon-Trompler E, Palkovits M, Kardos J. (2005) Characterisation of gamma-hydroxybutirate binding sites in the nucleus accumbens. 20th Biennial Meeting of the Society for Neurochemistry, Innsbruck, Austria. Journal of Neurochemistry, Suppl.2. 94: 94.

2. **Molnár T**, Kútiné FE, Kardos J, Simon-Trompler E, Palkovits M, Emri Zs. (2006) Succinate-sensitive and $GABA_BR$-insensitive binding sites in brain synaptic membranes. 36th Annual Meeting of the Society of Neuroscience, Atlanta, USA.

3. **Molnár T**, Barabás P, Héja L, Kútiné FE, Simon-Trompler E, Lasztóczi B, Palkovits M, Kardos J. (2007) Proton activates synaptic membrane site for the intermediary metabolite succinate. 21st Biennial Meeting of the Society for Neurochemistry, Cancún, Mexico. Journal of Neurochemistry, Suppl.1. 102: 265.

4. Emri Zs, **Molnár T**, Antal K, Gould TM, Leresche N, Parri HR, Cervo L, Crunelli V. (2007) Gamma-hydroxybutyrate elicits intracellular Ca^{2+} increases in astrocytes of the nucleus accumbens and ventral tegmental area. 37th Annual Meeting of the Society of Neuroscience, San Diego, USA.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁBAN TARTOTT FONTOSABB BEMUTATÓK

1. Emri Zs, **Molnár T**, Antal K, Parri HR, Kardos J, Crunelli V. (2005) Kábítószerfüggőség kialakulásához vezető sejtszintű folyamatok a *nucleus accumbens*-ben Erdélyi Múzeum Egyesület Orvos- és Gyógyszerészeti Szakosztály XV. Tudományos Ülésszak, Marosvásárhely, Romania.

2. **Molnár T**, Emri Zs, Antal K, Crunelli V, Simon-Trompler E, Palkovits M, Kardos J. (2005) A baclofen insensitive gamma-hydroxybutyrate binding site in the *nucleus accumbens*. 8th Meeting of the Hungarian Neuroscience Society (MITT), Pécs.

3. **Molnár** T, Emri Zs, Palkovits M, Kardos J. (2006) Characterisation of gamma-hydroxybutirate binding site in human basal ganglia areas *nucleus accumbens* and *globus pallidus*. International IBRO Workshop, Budapest. Ideggyó Sz, 59(S1):47.

4. **Molnár T**, Barabás P, Héja L, Kútiné Fekete E, Simon-Trompler E, Palkovits M, Kardos J. (2007) Characterisation of succinate binding site in brain synaptic membranes. 10th Meeting of the Hungarian Neuroscience Society (MITT), Szeged.

5. **Molnár T**, Kardos J, Simon-Trompler E, Parri RH, Crunelli V, Palkovits M, Emri Zs. (2008) Gamma-hydroxybutyrate elicits Ca^{2+} ion transients in the *nucleus accumbens* by activating baclofen-insensitive gamma-hydroxybutyrate receptors. International IBRO Workshop, Debrecen.

6. **Molnár T**, Barabás P, Kardos J, Palkovits M. (2009) Effects of succinate on ATP-induced Ca^{2+} waves in the *nucleus accumbens*. 12th Meeting of the Hungarian Neuroscience Society (MITT), Budapest.

EGYÉB PUBLIKÁCIÓ

Lengyel G, Veres Z, Tugyi R, Vereczkey L, **Molnár T**, Glavinas H, Krajcsi P, Jemnitz K. (2008) Modulation of sinusoidal and canalicular elimination of bilirubin-glucuronides by rifampicin and other cholestatic drugs in a sandwich culture of rat hepatocytes. Hepatol Res, 38: 300-309.

EGYÉB POSZTER BEMUTATÓK

1. Héja L, Szárics É, **Molnár T**, Kardos J. (2005) How glutamate is able to inhibit GABA transport? 20th Biennial Meeting of the Society for Neurochemistry, Innsbruck, Austria. Journal of Neurochemistry, Suppl.2. 94: 195.

2. Jemnitz K, Veres Zs, Lengyel Gy, **Molnár T**, Glavinas H, Krajcsi P, Vereczkey L. (2006) Modulation of Mrp2 and Mrp3 activities by drugs using sandwich culture of primary rat hepatocytes. International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations (MDO), Budapest, Hungary

3. Jemnitz K, Veres Zs, Lengyel Gy, **Molnár T**, Glavinas H, Krajcsi P, Vereczkey L. (2006) Modulation of Mrp2 and Mrp3 activities by drugs using sandwich culture of primary rat hepatocytes. European Federation for Pharmaceutical sciences (EUFEPS), Copenhagen, Denmark