Универзитет у Београду

Факултет за физичку хемију

Јелена Ч. Платиша-Поповић

Синтеза и карактеризација генетички кодираних флуоресцентних волтажних индикатора

Докторска дисертација

Београд, 2013

University of Belgrade

Faculty of Physical Chemistry

Jelena Č Platiša-Popović

Synthesis and characterization of genetically encoded fluorescent voltage indicators

Doctoral dissertation

Belgrade, 2013

Ментори

др Горан Г. Бачић, редовни професор, Факултет за физичку хемију, Универзитет у Београду

др Винсент А. Пирбон (Vincent A. Pieribone), редовни професор, The John B Pierce Laboratory-Yale University

Чланови комисије

др Павле Р. Анђус, редовни професор, Биолошки факултет, Универзитет у Београду

др Милош Мојовић, доцент, Факултет за физичку хемију, Универзитет у Београду

Датум одбране

Захвалница

Рад који сам уложила у израду ове дисертације је био свесрдно помогнут залагањем од стране немалог броја људи из неколико лабораторија са којима сам имала задовољство и срећу да сарађујем.

Изузетно сам сретна да могу да се захвалим мом ментору др Винсенту Пирбону (Vincent Pieribone). Сарадња са њим је изузетан изазов, и кроз све успоне и падове за ово кратко време колико траје је представљала константан мотив за напредак не само у професионалном смислу. Хвала на пруженој шанси, поштовању, толеранцији, ентузијазму и имагинацији који чине нашу свакодневницу у лабораторији све сем досадном.

Искрену захвалност дугујем др Горану Бачићу. Хвала на уложеном времену и енергији. Хвала за толеранцију и разумевање које су омогућиле израду овог рада упркос свим техничким изазовима (укључујући и саму кандидаткињу).

Посебну захвалност дугујем др Марку Поповићу који ми је помогао да уђем у свет у коме електрична активност нервних ћелија "светли у хиљаду боја". Пружена подршка и разумевање су ретке драгоцености. Хвала што држиш "лествицу" високо, хвала за све дискусије и расправе које су ми помогле да изађем из "кутије". Хвала за све минуте који трају сатима а које си провео "фризирајући" мој "риг".

Хвала др Милошу Мојовићу на подршци и разумевању. Хвала за време утрошено на бављење разноразном "папирологијом" које је у мом одсуству углавном завршавала у твом "дворишту".

Врло сам захвална члновима Пирбон лабораторије др Џоу Хану (Zhou Han), Ахмеду Осману (Ahmad Osman) и др Евану Парку (Evan Park).

Хвала др Лоренсу Коену (Lawrence Cohen) и члановима његове лабораторије др Леи Ђин (Lei Jin) и др Бредли Бејкеру (Bradley Baker), др Томасу Хјузу (Thomas Hughes) и Лорен Барнет (Lauren Barnett), др Мајкл Нитебаху (Michael Nitabach) и члановима његове лабораторије др Гуан Цау (Guan Cao), др Мајклу Кунсту (Michael Kunst) и др Дејвиду Ракуљи (David Racugglia). Захваљујем се др Павлу Анђусу, др Нади Зечевић и др Дејану Зечевићу.

Почетни стадијум мојих докторских студија је био помогнут пројектима Министарсва науке и технолошког развоја Србије 173015 и 143026 под вођством др Бранке Винтерхалтер.

Ја јако волим овај рад и период живота који сам провела радећи на њему и због тога га посвећујем мојим родитељима Марији и Чедомиру, и сећању на једну Марину.

Сажетак

Синтеза и карактеризација генетички кодираних флуоресцентних волтажних индикатора

Електричне промене представљају начин комуникације између неурона и чине основу комплексних феномена у понашању као што су перцепција, сензорно-моторна интеграција, учење и памћење. Активност неурона представља колекцију различитих електричних догађаја који варирају како у трајању, тако и у простирању. Праћење електричне активности неурона у свој просторној и временској комплексности подразумева развијање метода које поседују високу темпоралну резолуцију и висок однос сигнала према шуму. Идеални метод би био у стању да прати подпражне и надпражне промене мембранског потенцијала на нивоу појединачне ћелије и са резолуцијом мањом од секунде. Примена оптичких метода за снимање електричне активности мозга представља мање деструктивну алтернативу традиционалним електрофизиолошким методама базираним на примени електрода. Оптичка снимања нуде високу просторну резолуцију омогућујући симултана снимања са различитих локација у оквиру видног поља, од нивоа појединачних ћелија и делова ћелије до нивоа нервних кола која се састоје од стотина, ако не и хиљада неурона. Током вишедеценијског развоја, почевши од раних експеримената базираних на снимању урођених сигнала који се јављају при нервној активност па све до развоја бројних волтажних боја мале молекулске масе, оптичка снимања су омогућила стицање значајнх сазнања о функционисању мозга и неуралној обради података. Ипак, и у најразвијенијој верзији овим методама недостаје просторна/временска резолуција и ћелијска специфичност која би омогућила опширне студије у будним и активним животињама.

У овом раду је описан развој синтетичког протеинског конструкта који експримиран у сисарским неуронима показује промену интензитета флуоресценције у одговору на промене у мембранском потенцијалу. Развој

оваквих индикатора је део великих напора који се већ дуже време улажу у области оптичког снимања а који су окренути развоју генетички кодираних волтажних индикатора. Главна предност развоја оваквих проба у односу на доступне волтажне боје малих молекулских маса је могућност циљане експресије у специфичним ћелијама која би даље омогућила снимање електричне активности из жељених ћелија. Током последње две деценије напори да се издизајнира оваква проба су се базирали на примени два концепта. Оригинални концепт у дизајну проба се базира на прављењу фузија између природних волтажно-сензитивних домена (ВСД) изолованих из волтажно-сензитивних протеина и једног или пара флуоресццентних протеина. Недавно представљен алтернативни концепт у дизајну проба се базира на слабој флуоресценцији бактеријских родопсина за коју је показано да може бити модификована променама у мембранском потенцијалу. И док су до сада у литератури описани многобројни генетички кодирани индикатори, ниједан од њих се још увек није нашао у рутинској употреби за оптичку детекцију спонтаних промена у мембранском потенцијалу у интактном нервном ткиву.

Циљ овог рада је био дизајн волтажно-осетљивих, флуоресцентних протеинских проба које показују највећу промену у флоресценцији за дату промену напона и које могу бити употребљене за оптичка снимања у неуронима *in vivo*. За развој и тестирање пробе која се базира на фузији ВСД-а изолованог из *Ciona intestinalis* волтажно-осетљиве фосфатазе и различитих варијанти зеленог флуоресцентног протеина кориштене су методе из области молекуларне биологије, ћелијске културе, електрофизиологије и оптичког осликавања. Напредак техника које се користе у молекуларној биологији нам је омогућио креирање проба које су фузија између природних протеина и њихову експресију у различитим типовима ћелија помоћу трансфера комплементарне ДНК. Једном развијене нове потенцијалне пробе су даље тестиране електрофизиолошким и оптичким методама. Иницијално тестирање уз употребу конфокалне микроскопије је омогућило процену и поређење различитих конструката на основу мембранске

експресије у бесмртној сисарској ћелијској линији *HEK293* и у примарној култури хипокампалних неурона миша. Примена комбинације техника наметнуте волтаже на целу ћелију и широкопољне епи-флуоресцентне микроскопије је омогућила детаљну анализу карактеристика потенцијалних волтажних индикатора. Коначна процена проба је урађена на основу добијених резултата из *HEK293* ћелија и неурона, и то како за однос сигнала према шуму, тако и за фракциону промену у интензитету флуоресценције.

У овом раду истражена је могућност употребе циркуларно-пермутоване варијанте побољшаног зеленог фуоресцентног протеина (*cpEGFP*) у дизајну волтажних проба. Ова варијанта ФП се претходно показала врло успешном приликом дизајна протеинских Ca^{++} проба (такозвана *GCaMP*-серија индикатора). Пробе у којима је кориштен *cpEGFP* су показале изузетно високу сензитивност као Ca^{++} индикатори што нас је навело да истражимо могућу примену овако измењеног ФП у дизајну волтажних индикатора. Од 24 потенцијалне пробе чија је сензитивност тестирана методом наметнуте волтаже на целу ћелију, девет није показало волтажну сензитивност или је она била занемарљиво ниска (~0.1% ΔF/F) у одговору на тест пулсеве (деполаризациона промена од 100 mV док је ћелија држана на потенцијалу од −70 mV). Остали конструкти су у одговору на исти тест пулс показали промену у интензитету флоресценције која се кретала од +0.33% до −1.2% ΔF/F. Проба која је показала највећу осетљивст из ове серије конструката је *pLB2.7* (−1.2 ± 0.18% ΔF/F), названа *ElectricPk.* Ову пробу одликује брза кинетика активације (~ 2ms) и деактивације (~ 2ms). *ElectricPk* је прва проба базирана на *CiVS* која успешно прати брза померања у волтажном сензору, што указује на чињеницу да примена циркуларно пермутованих протеина у дизајну ових проба може имати предности. Експресија индикатора *ElectricPk* у неуронима миша је показала мембранску локализацију пробе у ћелијској соми и наставцима, али и присуство извесне количине интраћелијскиог депозита. *ElectricPk* индикатор се показао способним за детекцију појединачних акционих потенцијала са високом временском резолуцијом. Узлазна и силазна фаза акционих потенцијала су јасно

уочљиве. Упркос скромној величини сигнала (~0.7% ΔF/F), која варира у зависности од нивоа експресије, низове акционих потенцијала је било могуће уочити без упросечавања сигнала.

Иницијална проба која је довела до развоја *ArcLight*-фамилије волтажних индикатора се базирала на употреби pH-сензитивне варијанте зеленог флуоресцентног протеина, *ecliptic pHluorin*. И док је волтажни индикатор који садржи *ecliptic pHluorin* показао ниску волтажну осетљивост (-1.3% ± 0.3% ΔF/F за +100mV тест пулсеве), у једној од *HEK293* ћелијских линија која стабилно експримира ову пробу смо открили ненамерну мутацију *A227D* у оквиру флуоресцентног протеина. Мутирана проба је показала 14 пута већу волтажну осетљивост (-18.1% ± 1.4 %, n = 6) у ΔF/F за деполаризационе пулсеве од 100mV у односу на оригиналну пробу. Даља модификација ове пробе која је подразумевала употребу светлије верзије ФП-а, *super ecliptic pHluorin и* скраћивање аминокиселинске секвенце која повезује волтажни сензор и ФП је довела до развоја низа проба које показују и до ~40% у ΔF/F за 100mV у *HEK293* ћелијама. Експресија *ArcLight* у сисарским хипокампалним неуронима у култури и интактном мозгу винске мушице (*Drosophila melanogaster*) је довела до јасне појаве флуоресценције а сигнал који производи омогућава поуздану детекцију појединачних акционих потенцијала без потребе за упросечавањем сигнала. Пробом је могуће детектовати подпражне промене у мембранском потенцијалу, као и промене које се дешавају на нивоу финих наставака нервне ћелије. *ArcLight* је прва гентички кодирана проба која производи поуздане и велике сигнале *in vivo,* и као таква представља очигледан напредак у развоју групе метода које ће омогућити неурофизиолошка истраживања базирана искључиво на оптичким методама.

Кључне речи: зелени флуоресцентни протеин, генетички кодирани волтажни индикатори, биосензори, оптичо снимање.

Abstract

Synthesis and characterization of genetically encoded fluorescent voltage indicators

Electrical events are the mode of communication among neurons that underly all complex behaviors including perception, sensory-motor integration, learning and memory. Neurons exhibit a collection of different transient electrical events that vary in both spatial and temporal domains. To be able to analyze these events we need methods with both high temporal resolution and large signal to noise ratio. The ideal method would be able to detect both subthreshold and suprathreshold level changes in membrane potential, in single cells (or subcellular domains) at submillisecond resolution. Use of light to record brain electrical activity represents a less invasive alternative to classical electrode-based methods and can provide high spatial resolution. Optical methods allow simultaneous recordings from different locations within a field of view, from the level of single cell and cell compartments to the level of neuronal circuits comprising of hundreds, if not thousands neurons simultaneously. Over the last couple of decades, with early experiments using intrinsic signals that arise with neuronal activity all the way to development of numerous small molecule synthetic dyes optical methods provided unique information on brain function and neuronal information processing. However, even in its most advanced form these methods lack the spatial/temporal sensitivity and cell specificity that would allow comprehensive studies of neuronal function.

The present studies describe the development of synthetic protein constructs which when expressed in mammalian neurons produce change in fluorescence intensity in response to changes in membrane potential. Development of the indicators presented here is part of a greater efforts in the field of optical imaging to produce genetically-encoded voltage indicator (GEVI). These probes would allow cell targeted expression and consequently cell type specific recordings of neuronal activity. In the last two decades efforts to produce such probes have employed two major design concepts. In

the first approach, indicators are made as a fusions between naturally occurring voltage sensing domains (VSD) derived from voltage-sensitive proteins and fluorescent protein(s). The more recent approach is based on the use of the weak fluorescence of a bacterial rhodopsins that has been shown to be modulated by transmembrane potential. While multiple genetically encoded voltage indicators have been previously reported, none have proven routinely usable in intact neural tissue for optical detection of spontaneous changes in membrane potential.

The aim of the current work was to design voltage sensitive, protein-based optical probes that produce the largest fluorescence response for a given voltage change and have practical utility in in vivo experiments in neurons. In our work we used techniques in molecular biology, cell culture, electrophysiology, and imaging to develop voltage probes that are fusions between the voltage sensor domain derived from Ciona intestinalis voltage-sensor-containing phosphatase (Ci-VSP) and several variants of green fluorescent protein (GFP). We used advances in molecular biology techniques that allowed us to create artificial fusions between naturally occurring proteins and expressed them via cDNA transfer into cultured cells. Once novel probes were developed, they were tested with a variety of electrophysiology/imaging paradigms. An initial step included examination under a confocal microscope in order to estimate and compare different probes for membrane expression in mammalian HEK293 cells and in rodent hippocampal neurons. Patch clamp technique combined with wide-field fluorescence imaging allowed us to screen potential probes for their performance as voltage change detectors. The final evaluation of probes was based on both signal-to-noise ratio (SNR) and fractional change in fluorescence detected in both HEK293 cell line, hippocampal rodent neurons and in vivo in Drosophila neurons.

One approach in this study was to investigate the use of circularly permuted, enhanced green fluorescent protein (cpEGFP). Probes using cpEGFP have generated Ca ++ sensors (GCamPs) of remarkable sensitivity and led us to explore whether this design could be extended to voltage sensors. Out of 90 constructs that we made, 24 constructs that were tested in patch clamp experiments for voltage sensitivity, nine

showed negligible (~0.1% ΔF/F) or no change in fluorescence in response to test voltage steps (+100 mV from a −70 mV holding potential). The remaining constructs exhibited from +0.33% to −1.2% ΔF/F response to such voltage steps. The probe with the greatest response magnitude in this series was pLB2.7 (−1.2 ± 0.18% ΔF/F), named ElectricPk, also exhibited a fast kinetics of activation (~ 2ms) and deactivation (~2 ms). This makes ElectricPk the first probe based on CiVSP that captures the rapid movements of the voltage sensor, suggesting that voltage probes designed with circularly permuted fluorescent proteins may have some advantages. When expressed in cultured mouse hippocampal neurons ElectricPk shows good membrane localization evident in the cell soma and processes, with some intracellular deposits. Testing of a voltage sensitivity showed that ElectricPk is capable of resolving action potentials with extraordinary temporal fidelity. The rising and falling phases of the action potential were evident. The signal size was modest (~0.7% ΔF/F), and varied with expression intensity, yet action potential trains were detectable without trial averaging.

The starting point for the development of the ArcLight-family of probes was a pH-sensitive version of GFP, ecliptic pHluorin. While the original probes containing ecliptic pHluorin exhibited small voltage-dependent changes in fluorescence intensity (~-1.3%) to a +100mV voltage step, we discovered one stable HEK293 cell line in which contained an unintended point mutation (A227D) within the inserted ecliptic pHluorin. The mutant sensor produced a 14-fold increase (~-18.1%) in ΔF/F per +100mV. Further modifications that included use of brighter FP (super ecliptic pHluorin) and shortening the length of the amino acid sequence (linker) that connects VSD to FPs led us to a series of probes that exhibited up to ~40% in ΔF/F per 100mV when tested in HEK293 cultured cells. Expression of ArcLight in cultured mouse hippocampal neurons and in the intact brain of transgenic fruit flies (Drosophila melanogaster) produced fluorescence that is both bright enough and produces a large enough response to reliable detect action potentials in single trials. In addition the probe can report subthreshold changes in membrane potential as well as voltage changes in

fine processes and dendrites. All this makes the ArcLight probe the first genetically encoded probe that produces reliable and robust signals *in vivo*.

These probes have widespread potential as genetically targetable, minimally invasive probes of cellular membrane potential.

Keywords: green fluorescent protein, genetically encoded voltage indicators (GEVI), biosensors, optical imaging.

Садржај

Увод

Снимање електричне активности мозга уз употребу електрода

Од пионирских експеримената Кахала (Santiago Ramón y Cajal) и Голџија (Camillo Golgi) са почетка века до данас опште је прихваћена чињеница да је понашање животиња резултат активности настале у нервном ткиву. У својој основи проучавање електричне активности мозга подразумева одговор на питање: како електрична активност неурона генерише функционисање организма? И најбазичнији одговор на ово питање подразумева да знамо који неурони су умешани у дати процес, где су те ћелије лоциране (Levitan and Kaczmarek, 1997), као и детаљан опис просторне и временске динамике веза које постоје међу тим ћелијама. Постоји велики број различитих приступа у решавању проблема обраде информација у нервном ткиву и они се крећу од веома поједностављених до целовитих. Тако постоје студије која се баве физиологијом на нивоу појединачних неурона које за циљ имају дефинисање комплексних веза које постоје између великог броја неурвних ћелија и њихово мапирање у функционалне мреже. На другом крају овог широког спектра су студије понашања у којима се истраживањем понашања покушава растумачити функционисање мозга. У том смислу, приступ који појединац има у свом раду је питање личних преференци и/ или уверења и представља предмет жустрих расправа међу научницима. Упркос или можда управо захваљујући овим размирицама, резултати рада великог броја истраживача у области неуронаука је довео до импресивне количине сазнања о томе како мозак функционише.

Захваљујући пионирском раду Галванија електрична природа нервне активности је позната већ више од 200 година. Већ у то време постало је извесно да се функционисање нервног система базира на некој врсти електричне активности. Модерна истраживања су показала да електрична активност неурона проистиче из разлике у концентрацији јона која постоји унутар и ван ћелије

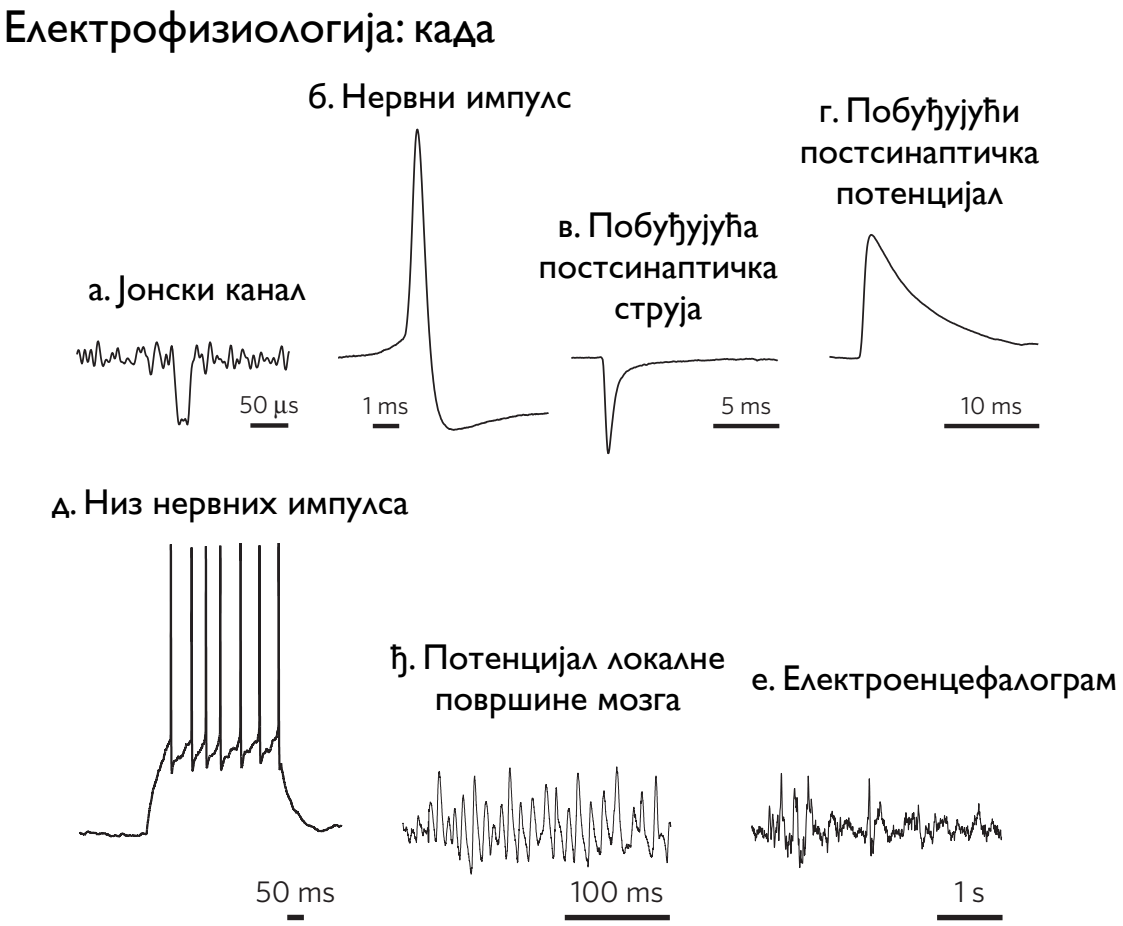
(Hodgkin *et al*., 1952). Ова неједнака дистрибуција јона је резултат рада енергетски зависних транспортера. Електрична активност у ћелији се јавља као последица рада читавог низа трансмембранских јонских канала који омогућавају проток јона са једне на другу страну ћелијске мембране. Разлика у концентрацији јона са две стране ћелијске мембране и разлика у проводљивости мембране за различите јоне продукују трансмембрански мембрански потенцијал (Johnston and Wu, 1995; Hille, 2001). Поред читавог низа улога које трансмембрански потенцијал игра у физиологији ћелије као што су мембрански транспорт и продукција АТП-а у митохондријама, у овом раду ће бити речи о нервним импулсма који чине основу функционисања нервног систем а чија пропагација је директна последица постојања трансмембранског потенцијала.

Електричне промене представљају начин комуникације између неурона и чине основу комплексних феномена у понашању као што су перцепција, сензорно-моторна интеграција, учење и памћење. Активност неурона представља колекцију различитих електричних догађаја који варирају како у трајању, тако и у простирању (Слика 1 и 2). Нервни импулси, постсинаптички потенцијали (ПСП), потпражне осцилације (тј. мождани ритмови) и полустабилне промене потенцијала (тј. горња и доња стања) имају темпоралне и просторне карактеристике које се протежу преко три реда величина, од микросекунда до минута односно од микрометара до милиметара. Очито је дакле, да је праћење нервне активности један од најважнијих циљева у неуронауци. Праћење електричне активности неурона у свој просторној и временској комплексности подразумева развијање метода које поседују високу темпоралну резолуцију и висок однос сигнала према шуму. Идеални метод би био у стању да прати подпражне и надпражне промене мембранског потенцијала на нивоу појединачне ћелије и са резолуцијом мањом од секунде (Scanziani and Hausser, 2009; Peterka *et al*., 2011).

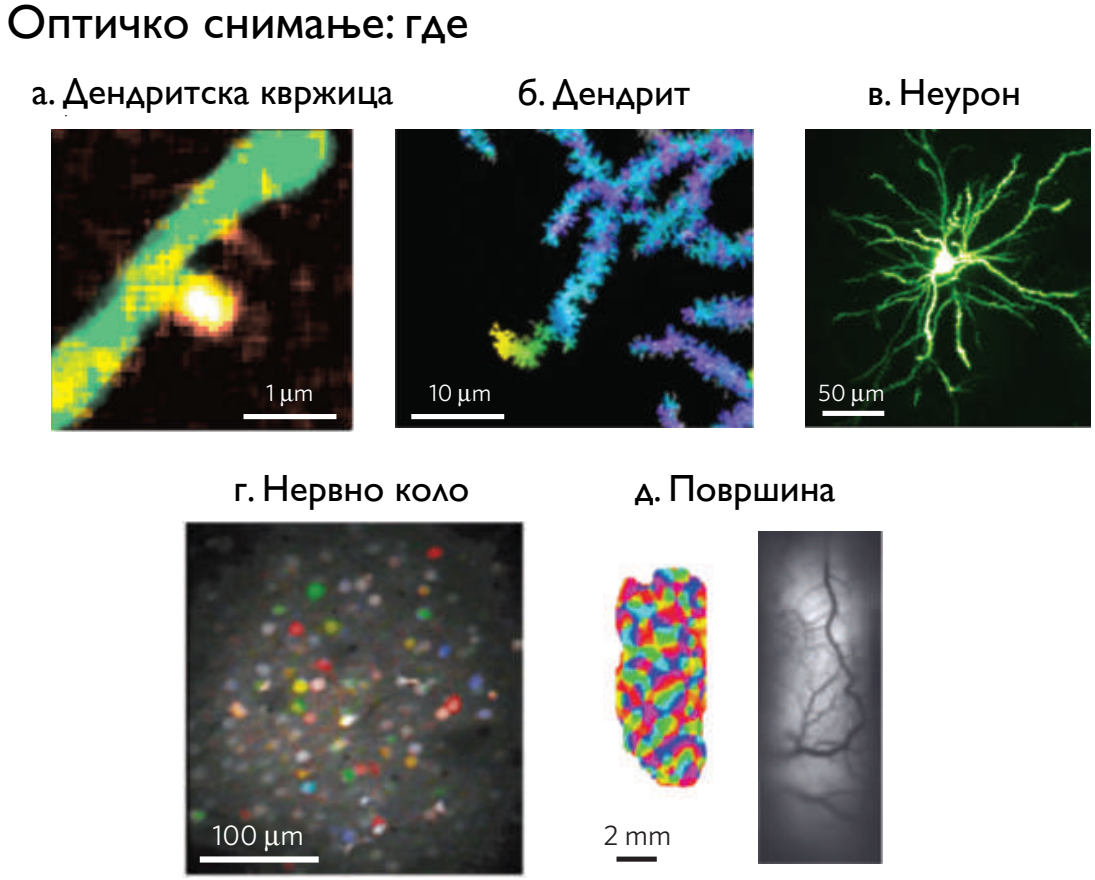
Класичне методе праћења мембранског потенцијала подразумевају примену металних, стаклених или силиконских микроелектрода које се пласирају унутар (интрацелуларно) или у непосредној околини ћелије (екстрацелуларно). Данас методе које подразумевају употребу електрода омогућавају праћење електричне активности на различитим нивоима, од делова нервне ћелије (нпр. дендрита) до синхронизоване активности милиона неурона (Слика 1 и 3).

Са једне стране, метод наметнуте волтаже/струје омогућава директно праћење разлике у потенцијалу са две стране мембране путем електроде која се налази у унутрашњости неурона (Hamill *et al*., 1981). Спој високе импендансе који се формира између електроде и ћелијске мембране обезбеђује очување високе отпорности мембране и омогућава релативно неинвазивно мерење дискретних промена мембранског потенцијала/струја. Модеран дизајн опреме која се користи приликом ових снимања (појачивачи и мерне главе појачивача са ниским шумом) омогућава тако високу временску и просторну резолуцију да је могуће регистровати активност на нивоу појединачних јонских канала (Scanziani and Hausser, 2009). И док су методом наметнуте волтаже примењеном на ћелије гајене у *in vitro* условима, ћелије у можданим исечцима или анестезираним животињама добијена непроцењива сазнања о физиологији нервног система, овај приступ није могућ за *in vivo* физиолошке студије у будном животињама. Примена ове методе је најчешће ограничена на експерименте у којима се користе крупне ћелије или ћелијски делови гајени у *in vitro* условима. Употреба електрода у овим студијама је довољно инвазивна да за последицу има физичка оштећења ћелије и наставака чиме се искључује могућност хроничних мерења. Такође, употреба електрода најчешће ограничава снимања на појединачне ћелије док симултана снимања која укључују више ћелија иако могућа ипак представљају херојске подухвате (Scanziani and Hausser, 2009; Peterka *et al*., 2011).

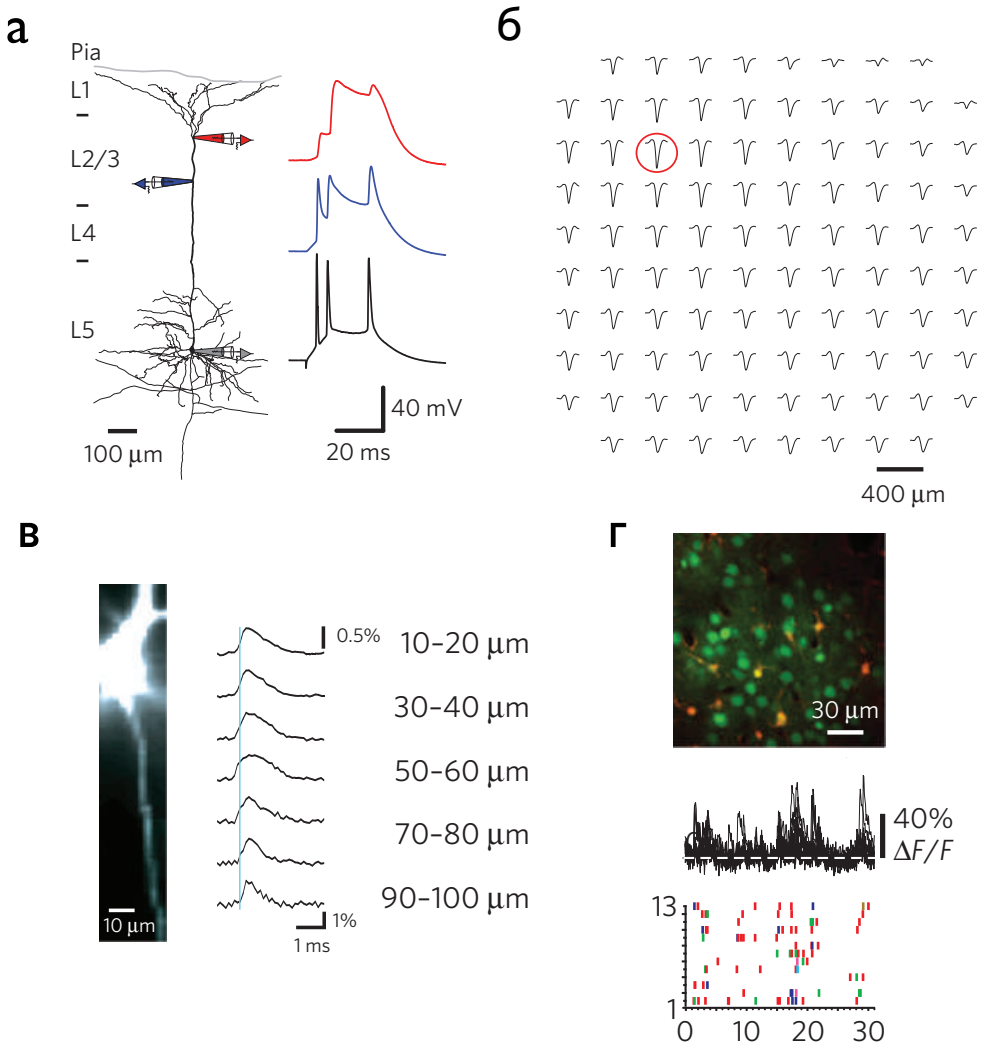
Низ метода које подразумевају пласирање електрода изван ћелијског тела спадају у екстрацелуларне методе снимања. Овим методама се могу снимати колекције неурона (и до неколико стотина неурона) како у можданим исечцим,



Слика 1. Употреба електрофизиолошких метода за мерење "када" електричне активности неурона. Репрезентативни примери записа низа електричних догађаја добијених електрофизиолошким методама уз употребу електрода: а) отварање појединачног никотин ацетилхолинског канала; б) нервни импулс у неурону церебелума снимљен *in vivo*; в) побуђујућа постсинаптичка струја (*EPSC*); г) и д) побуђујући постсинаптички потенцијал (*EPSP*) и низ нервних импулса из грануларних ћелија церебелума снимљених *in vivo;* ђ) гама осцилације (потенцијал локалне површине мозга-*LFP*) снимљених у хипокампусу анестезираног пацова; е) електроенцефалограм добијен снимањем мозга анестезираног миша током визуелне стимулације. Преузето из *Scanziani and Hausser, 2009.*



Слика 2. Употреба оптичких метода за мерење "где" електричне активности неурона. Репрезентативни примери података добијених оптичким методама: а) компартментализације калцијума у појединачној нервној реси снимљена уз помоћ генетички кодираног сензора за калцијум и 2-фотонске микроскопије; б) локалне промене нивоа калцијума изазване синаптичким дејством паралелних влакана у односу на синаптичким квржицама богате танке гране дендритског стабла Пуркињеове ћелије у церебелуму; в) пирамидални неурон из 2/3 слоја визуелног кортекса миша снимљен 2-фотонском микроскопијом уз помоћ интрацелуларно апликоване калцијумске боје мале молекулске масе; г) орјентациона мапа у визуелном кортексу пацова измерена 2-фотонском микроскопијом; д) оптичко снимање уз употребу флуоресцентне волтажно-осетљиве боје у визуелном кортексу мачке. Преузето из *Scanziani and Hausser, 2009.*



Слика 3. Употреба електрофизиолошких и оптичких метода за мерење "где" и "када" електричне активности неурона. Приказани су следећи примери: а) мерење интеракције између уназад простирућих нервних импулса и калцијумске активности у дендриту пирамидалног неурона из слоја 5 (L5) добијени методом наметнуте струје на целу ћелију уз употребу три електроде; б) праћење настанка потенцијала локалне површине мозга у визуелном кортексу мачке уз употребу вишеелектродног система који садржи 96 електроде при чему је просторна резолуција 400 µm (запис референтне активности је обележен црвеним); в) оптичко мапирање места иницијације нервног импулса у неурону из слоја 5 уз употребу волтажне боје; г) оптичко праћење активности у визуелном кортексу пацова уз употребу калцијумске боје (зелено) и специфичног маркера за астроците (сулфородамин 101, наранџаста) уз употребу 2-фотонске микроскопије где су уочљиве промене у нивоу калцијума и нервни импулси (растерска мапа, за ≥2 уочена импулса; 2 импулса црвена, 3 зелена, 4 тамно плава, 5 светло плава, 6 роза и 7 браон) у 13 симултано снимaних неурона у будној животињи. Преузето из *Scanziani and Hausser, 2009.*

тако и у анестезираним или будним животињама чиме је омогућено праћење електричне активности у субкортикалним и кортикалним деловима великих нервних кола (Nicoleis, 2008; Wiest *et al.*, 2008; Hai *et al.*, 2010). Развој ових метода је омогућио дуже трајање експеримената који у зависности од препарата који се користи трају од по неколико месеци (глодари) до чак неколико година (примати). Обзиром да омогућавају симултана снимања великог броја надражљивих ћелија са темпоралном резолуцијом мањом од секунде и без механичких оштећења ћелијске мембране (али не и околног ткива) употреба метода са мултиелектродама стално расте. Ипак, врло низак однос сигнала према шуму који спречава детектовање других догађаја сем акционих потенцијала (нпр. подпражних синаптичких потенцијала, мембранских осцилација) као и недостатак информације са ког типа ћелије сигнал потиче доприносе немогућности да се подаци адекватно анализирају (Hai *et al.*, 2010).

Са друге стране групе ћелија се рутински снимају са високом временском резолуцијом (милисекунде) уз помоћ електричног (ЕЕГ) и магнетног (МЕГ) енцефалограма. Ове методе омогућавају неинвазивна снимања популација неурона повезаних у мреже неурона. Методе се базирају на чињеници да је синхронизовану активност неурона могуће детектовати применом електрода које се смештају на површину лобање. И мада ове методе омогућавају детекцију активности са високом темпоралном резолуцијом недостатак просторне резолуције (Akemann *et al.*, 2012) и могућности да се прецизно установи извор електричних транзијената су главни недостаци ових метода.

Оптичка снимања електричне активности мозга

Примена оптичких метода за снимање електричне активности мозга представља мање деструктивну алтернативу традиционалним електрофизиолошким методама базираним на примени електрода. Оптичка снимања такође нуде високу просторну резолуцију омогућујући симултана

снимања са различитих локација уоквиру видног поља а без физичког утицаја на осетљиво нервно ткиво које се испитује (Слика 2 и 3). Поред тога, оптичко снимање нуди могућност праћења активности различитих делова ћелије укључујући и најмањих структура недоступних електродама, као што су дендритске квржице. На нивоу нервних кола било би могуће спроводити функционалне студије које укључују активацију комплексних шема понашања уз параћење активности више стотина, ако не и хиљада неурона у различитим можданим регионима. И док сами неурони непоседују урођене оптичке сигнале који би се могли користити за праћење промена у трансмембранском потенцијалу, примена егзогених проба омогућава трансформацију електричне активности у промене које се могу регистровати оптички. Уобичајени приступ подразумева примену синтетичких, флуоресцентних боја мале молекулске масе (<1kD) које се везују за плазма мембрану, при чему варијације у потенцијалу мембране доводе до промене у интензитету флуоресценције боје. Новији метод се базира на примени протеинских проба које су развијене фузијом природних волтажно сензитивних домена са флуоресцирајућим протеинима чиме су креиране генетички кодиране волтажне пробе. Оптичко снимање мождане активности која се базира на примени генетички кодираних проба представља потенцијалну могућност за праћење електричне активности у генетички индентификованим ћелијама током дугих временских периода а уз минимално мешање у физиолошке процесе. Ипак, тренутно не постоје функционалне генетички кодиране пробе које би се могле користити за студије *in vivo*. Развој и карактеризација оваквих проба је у фокусу истраживања описаних у овој тези.

Оптичка снимање базирана на урођеним сигналима и синтетичким бојама малих молекулских маса

Први покушаји примене светлости за снимање активности неурона су изведени током 50-тих година и подразумевали су праћење инхерентних промена

у расипању светлости које се јављају при примени низа стимулуса на нерве (Hill and Keynes, 1949; Cohen, 2010). Електричне промене у ћелији могу изазвати мерљиве промене у локалној концентрацији јона и воде, промене у ћелијском волумену и лучењу неуротрансмитера које се одражавају на расипање светлости (Frostig and Chen-Bee, 2009). Напредак у методама обраде сигнала (упросечавање сигнала) током 60-их година је омогућио снимање много мањих сигнала и открића попут промена у расипању светлости и бирефригенцији која се јављају при акционим потенцијалима у нервним ћелијама и појединачним аксонима (Cohen *et al.*, 1968). Урођени сигнали се могу јавити и као резултат промена у оптичким карактеристикама молекула који природно имају значајан ниво апсорпције или флуоресценције (цитохроми, хемоглобин). Ове промене су зависне од промена у метаболичким процесима који прате повишену активност неурона. У ове метаболичке процесе спадају промене у потрошњи кисеоника и протоку крви које мењају укупан ниво сатурације хемоглобина кисеоником, локалне промене у волумену крви које мењају апсорпцију светла и које могу бити детектоване употребом светлости различитих таласних дужина (Frostig and Chen-Bee, 2009). Ипак, поред чињенице да су ове промене само нуспојаве које се јављају при електричној активности неурона, недостци ове методе су и низак однос сигнала према шуму и просторна резолуција од приближно ~100μm (Scanziani and Hausser, 2009; Peterka *et al*., 2011).

Развој волтажно осетљивих синтетичких боја мале масе (<1000 далтона) који је почео крајем 70-тих година је означио почетак развоја волтажно-зависног оптичког снимања (Cohen *et al*., 1974; Homma *et al.*, 2009; Cohen, 2010; Loew, 2010). Примена боја мале молекулске масе које детектују промене у мембранском потенцијалу, или читавом низу других физиолошки релевантних параметара (pH, концднтрација калцијума, итд.), као промене у оптичким сигналима (углавном флуоресценцији) је омогућила физиолошке студије како на нивоу појединачних неурона, тако и на нивоу великих колекција неурона (Grynkiewicz *et al.*; 1985, Antic and Zecevic, 1995; Grinvald and Hildesheim, 2004). За детекцију сигнала се

користе различити светлосни феномени као што су флуоресценција, рефлексија, апсорбанција или промена у односу флуоресценције две различите флуорофоре (флуоресцентно резонантни трансфер енергије- ФРЕТ) (Cohen, 2010; Loew, 2010). Волтажно-сензитивне боје су осетљиве на читав низ електричних догађаја. Тренутно примена ових боја омогућава снимање акционих потенцијала у дисталним дендритима без потребе за упросечавањем сигнала, уз упросечавање сигнала могуће је регистровати постсинаптичке потенцијале у дендритским кржицама. Ове боје се, такође доста користе за праћење макроскопских промена на нивоу великих површина у можданој кори сисара. Ове студије су омогућиле детекцију брзих (милисекундских) електричних промена приликом сензорне и моторне активности (Feldmeyer *et al*., 2012). Како се волтажне боје неселективно везују за све ћелијске мембране, нежељено бојење електрично неактивних мембрана (нпр. мембране глијалних ћелија,, ендоплазматичног ретикулума, митохондрија, мијелин) за последицу има значајно позадинско зрачење које лимитира однос сигнала према шуму. Додатно ове боје карактерише лоша пермеабилност за велики број различитих типова ћелија и генерална токсичност (Scanziani and Hausser, 2009; Peterka *et al*., 2011; Looger and Grisbeck, 2012). Коначно, примена ових боја у *in vivo* експериментима када се боја наноси на веће површине искључује могућност циљаног обележавања ћелија одређеног типа.

Генетички кодирани волтажни индикатори

Напредак у области молекуларне биологије и развој у области генетичких манипулација на нивоу ћелије довео је до развоја протеинских оптичких индикатора. Ове пробе је могуће експримирати путем трансфера комплементарне ДНК (*cDNA*) у ћелију. Идентификација и клонирање гена који кодира зелени флуоресцентни протеин изолован из *Aequorea victoria* и откриће да његова флуорофора сазрева независно од других фактора (домаћина) је означио прекретницу у оптичком снимању ћелије (Chalfie *et al.*, 1994; Inouye and Tsuji, 1994). У многим областима биолошких наука ово откриће је дословно изазвало

ефекат “паљења светла”. Нова сазнања о флуоресцентним протеинима су допринела формирању идеје о генетички кодираним индикаторима за волтажу (Siegel and Isacoff, 1997), Ca^{2+} (Miyawaki *et al.*, 1997) и pH (Miesenboch *et al.,* 1998). Данас смо сведоци убрзаног развоја како генетички кодираних волтажних инддикатора, тако и Ca^{2+} сензора. Недавно су развијене и протеинске пробе које омогућавају манипулацију електричне активности ћелије (Boyden et al., 2005). Ове методе у односу на синтетичке боје нуде неколико значајних предности као што су могућност циљаног обележавања специфичних типова ћелија и мање инвазивну хроничну експресију. ДНА кодиране пробе, такође омогућавају циљано обележавање у односу на развојни ступањ, регион мозга, тип ћелија и делове ћелије.

Упркос чињеници да су резултати са првом генетички кодираном пробом (Siegel and Isacoff, 1997) добијени исте године када и резултати са њеном пандан пробом за Ca++ (Miyawaki *et al.*, 1997), развој функционалне Ca++ пробе је засенио развој волтажних проба (Looger and Grisbeck, 2011). Напори да се добије бољи Ca++ индикатор су довели до развоја високо осетљивих проба чији сигнали омогућавају детекцију промена у нивоу калцијума из ћелија које се налазе дубоко у живом ткиву (Dombeck *et al.*, 2007; Tian *et al.,* 2009; Akerboom *et al*., 2012). Ови сензори омогућавају примену 2-фотонске микроскопије за регистровање сигнала из ткива које има висок коефицијент расипања светлости и могућност снимања електричне активности у стотинама, чак и хиљадама неурона. Могуће је оптичко снимање појединачних нервних импулса без потребе за упросечавањем а просторна резолуција омогућава детекцију инфлукса Ca^{2+} који се јавља при синаптичкој активности на нивоу појединачних дендритских кржица (Peterka *et al.,* 2011).

Постоји неколико разлога зашто развој волтажних прба касни за развојем Ca++ индикатора, од којих је већина везана за природу сигнала које покушавамо да меримо (тј. разлике између природе мембранског потенцијала и нивоа слободног цитоплазматског Ca++). Мерење у цитоплазми растворено Ca++

захтева да се и сензор налази растворен у цитоплазми, што и јесте најчешћи случај за солубилне протеине који улазе у састав ћелије. Насупрот томе, мерење трансмембранског потенцијала захтева да се сензор простире кроз плазма мембрану, предуслов који отежава циљану и локализовану експресију и представља додатну потешкоћу у дизајну у односу на калцијумске пробе. Такође, приликом дизајна волтажних проба морају се узети у обзир и њихов потенцијално деструктиван утицај на капацитанцу мембране, захтеви везани за кинетику пробе која мора бити брза као и потреба за максималном експресијом у плазма мембрани (Peterka *et al.*, 2011). Сви ови аспекти дизајна волтажних проба резултују потребом за софистицираним методама тестирања које није лако прилагодити за примену на великом броју узорака, као што је то био случај у раду са Ca2+ пробама.

Принципи дизајна генетички кодораних волтажних проба

Обзиром да у природи не постоје флуоресцентни протеини (ФП) чија се флуоресценција мења у зависности од волтажних промена да би се добио овакав индикатор потребно га је изконструисати. Највећи број протеинских волтажних проба је развијен прављењем синтетичких фузија између ФП-а и природних волтажно-осетљивих домена са намером да се волтажно-зависне промене у протеинској структури преведу у промене у флуоресценцији. Напори који су до сада уложени у процес добијања функционалане волтажне пробе су се углавном концентрисали на истраживање и развој волтажних сензора и флуоресцентних протеина.

Развој генетички кодираних волтажних проба

Прва генерација волтажних проба- Прве функционалне пробе су развијене у распону од неколико година и базирале су се на фузији волтажно-сензитивних домена из волтажно-зависних јонских канала са ФП-а (Siegel & Isacoff, 1997; Sakai *et al.,* 2001; Ataka & Pieribone, 2002; Слика 4). У то време једини познати

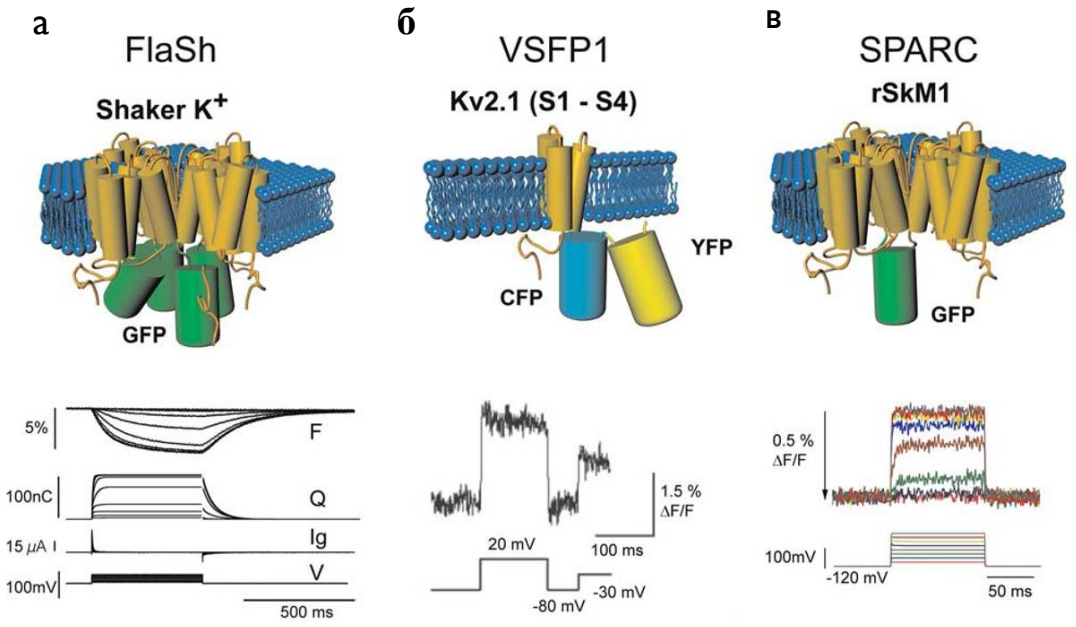
протеини са деловима који су осетљиви на брзе промене у мембранском потенцијалу су били волтажно-зависни јонски канали. Улога волтажно-зависних јонских канала је да врше транспорт јона преко ћелијске мембране и овај транспорт се одиграва под утицајем промена у трансмембранском потенцијалу (Bezanilla, 2008). Промене у трансмембранском електричном пољу овај тип јонских канала детектују помоћу волтажно-осетљивог домена (ВСД) који се састоји од четри трансмембранска сегмента (С1-С4). Аминокиселине које имају наелектрисане остатке су стратешки распоређене дуж волтажно-осетљивог домена јонсих канала а промене у трансмембранском електричном пољу доводе до померања ових наелектрисаних честица. Последњи од четри трансмембранска сегмента (С4) ВСД-а поседује аминокиселине са базним остатком (аргинин и лизин) на свакој трећој позицији (Bezanilla, 2008). Ова померања базних остатака аминокиселина доводе до конформационих промена у структури канала које резултују отварањем поре канала (С5-С6) и пропуштањем јона. Дизајн волтажних проба се базира на идеји да померања наелектрисања могу довести до промене у интензитету флуоресценције прикаченог ФП-а.

Флуоресцентни Shaker (FlaSH; Siegel and Isacoff, 1997)- Прва проба која је показала волтажну осетљивост је била базирана на *Shaker* калијумовом каналу из винске мушице (*Drosophila melanogaster*). Зелени флуоресцентни протеин из *Aequorea victoria* (*wtGFP*) коме су одстрањене неке од неесецијалних аминокиселина (233-238) је уграђен одмах иза С6 сегмента јонског канала. Методом наметнуте волтаже у ооцитама жабе (*Xenopus laevis)* је показано да проба реагује са смањењем у интезитету флуоресценције од 5.1% при промени потенцијала од +100mV, при чему је ћелија држана на мембранском потенцијалу од -80mV (Слика 4а). И мада су делови канала који формирају пору (С5-С6) остали интактни при конструисању пробе, проводљивост канала је укинута мутацијом фенилаланина на позицији 434 у триптофан (*W434F*). Ова мутација не утиче на волтажну осетљивост канала. Промена флуоресценције ФП-а у односу на волтажу је показала зависност која се може описати кривом сигмоидалног облика. Овакав

однос је сличан односу који постоји између померања наелектрисаних аминокиселинских остатака у ВСД-у и волтаже. Проба је стабилно експримирана у ћелијама током две недељеи и током тог перида није показала значајно смањење у флуоресценцији или температурну осетљивост. Тестирање на повишеној температури је показало благи утицај температуре на убрзавање, иначе споре кинетике индикатора. Иста група је након пар година објавила студију са побољшаним варијантама *FlaSH*-а (Guerrero *et al*., 2002). Развијене су варијанте индикатора са побољшаном кинетиком, веће сензитивности и бољим спектралним карактеристикама. Такође, добијена је и проба која је показивала већу стабилност при постизању коначне конформације на 37°C. До ових побољшања се дошло мутацијама у волтажном сензору и ФП-у.

Волтажно сензитивни флуоресцентни протеин (*VSFP)1.0* (Sakai *et al.,* 2001)- Ова проба је добијена фузијом C1-4 домена сисарског *Kv2.1* калијумовог канала и ФРЕТ пара који чине плаво- (*cyan -CFP*) и жуто- (*yellow-YFP*) емитујући протеини. Делови канала који граде пору C5-C6 су одстрањени приликом конструкције ове пробе. Промене мембранског потенцијала су детектоване као промене у ефикасности ФРЕТ процеса између два ФП-а. Приликом тестирања ове пробе вршена је ексцитација плавог ФП-а (λ=432 nm) а мерен је однос емисија плавог (λ>460) и жутог (λ>515) ФП-а. У случају овог индикатора однос промене у флуоресценцији и волтажи је био изненађујуће близу линеарног (r=0.99). Индикатор је показивао брзу кинетику активације и деактивације (Слика 4б).

Потенцијалом активиран протеински канал базиран на натријумовом каналу (SPARC; Ataka and Pieribone, 2002)- Последња проба из такозване "прве генерације" је индикатор базиран на натријумовом каналу из скелетних мишића пацова. Две варијанте зелено флуоресентног протеина (wtGFP или EGFP) су уграђиване на различитим локацијама дуж секвенце јонског канала чиме је добијена серија од десет проба. Најуспешнијим се показао конструкт у коме је ФП уграђен између другог (C2) и трећег (C3) домена јонског канала. Пробу је карактерисала слаба осетљивост (0.5% ΔF/F за +100mV промену) али и изузетно



Слика 4. Прва генерација генетички кодираних волтажних индикатора базираних на волтажно сензитивном домену (ВСД) изолованом из волтажно сензитивних јонских канала. У свим случајевима горњи панел је шематски приказ дизајна пробе, доњи панел је пример записа добијеног при тестирању пробе методом наметнуте волтаже на целу ћелију. а) *FlaSH*-волтажни индикатор је базиран на фузији између ВСД из *Drosophila melanogaster Shaker-type* калијумовог канала и *wild-type* зеленог ФП-а. Симултано симање помоћу две електроде и фотометрије у ооцитама *X. laevis* показују промену у струји и интезитету флуоресценције као одговор на низ волтажних тест пулсева (V) између -60 mV и 10 mV, са повећањима од 10 mV. Потенцијал мировања је -80 mV. *FlaSh* показује присуство струја отварања вратница (Ig) и одсуство јонских струја. Интензитет флуоресценције пробе (F) опада у одговору на деполаризацију мембране. Приказани запис је добијен упросечавањем 20 покушаја. Скала флуоресценције, 5% ΔF/F. *Преузето из Siegel and Isacoff, 1997*. б) *VSFP1*- је базирана на ВСД-у из сисарског *Kv2.1* калијумовог канала и ФРЕТ пара који чине плаво зелена-(*CFP*) и жуто-емитујући (*YFP*) ФП. Проба је тестирана у стабилно експримирајућој линији *HEK293* ћелија. Приказан је пример записа који се добија при одговору на 100mV деполаризациони пулс при чему интензитет жуте флуоресценције (горњи запис) прати мембрански напон. *Преузето из Sakai et al., 2001*. в) *SPARC*-проба базирана на фузији између ВСД-а из натријумовог канала скелетних мишића пацова и зеленог ФП-а. Сигнал флуоресценције (горе) из ооците *X. laevis* при примени прогресивно већих волтажних корака (доле). Сваки запис интензитета флуоресценције је добијен упросечавањем 48 –56 покушаја. *Преузето из Ataka and Pieribone, 2002.*

брза кинетика (Слика 4в).

Компаративна студија у којој су све три описане пробе тестиране у сисарским ћелијама гајеним у *in vitro* условима (*HEK293* имортализована ћелијска линија или примарна линија хипокампалних неурона миша) је показала одсуство било какве значајније волтажне сензитивности (Baker *et al.*, 2007). Конфокалном микроскопијом, при којој је као маркер површинске експресије кориштена хидрофобна волтажно-осетљива боја (*di8-ANEPPS*), је показана лоша мембранска локализација све три пробе. Недовољна присуност проба у плазма мембрани је највероватнији разлог недовољне сензитивности.

Друга генерација волтажних проба- Током 2005. године, Мурата и сарадници (Murata et al., 2005; Murata & Okamura, 2007) су анализирајући геном туникате *Ciona intestinalis* идентификовали протеин који поседује волтажно сензитивне делове (C1-C4), по аминокиселинском саставу сличне онима који налазе у волтажно-осетљивим јонским каналима, али не и делове који формирају пору (C5-C6). Показало се да овај нови протеин има липид-фосфатазну активност која је волтажно-сензитивна, те је стога назван *Ciona intestinalis* волтажни-сензор-садржећа фосфатаза (*C. intestinalis voltage-sensor-containing phosphatase; Ci-VSP*). Анализа ВСД секвенце је показала значајну хомологију са волтажно-зависним каналима поготово у четвртом трансмембранском сегменту (C4). Анализа која је укључивала и ВСД из хомолог протеина изолованог из рибе *Danio rerio* је показала да промене у волтажи изазивају асиметричне струје какве се виђају у јонским каналима (струје отварања јонских вратница- *gating currents)* потврђујући улогу ВСД-а као волтажног сензора (Murata *et al.,* 2005; Murata & Okamura, 2007; Hossain *et al.,* 2008). Такође, показало се да је сензор функционално самосталан обзиром да задржава волтажну-сензитивност и након одстрањивања ензимског дела протеина (Murata *et al.,* 2005). Ово откриће је довело до развоја друге генерације волтажно-сензитивнх проба у којима је ВСД јонскоих канала замењена са ВСД-ом из волтажно-сензитивне фосфатазе из *Ciona*-е (Dimitrov *et al.,* 2007;

Lundby *et al.*, 2008; Mutoh *et al.,* 2009; Perron *et al.*, 2009; Burnett *et al*., 2012; Jin *et al*., 2012; Слика 5, 6 и 7).

Први индикатор који се базирао на новом протеину, назван *VSFP2.1,* је показао значајно бољу мембранску локализацију и пораст у осетљивости у сисарским ћелијама (Dimitrov *et al.,* 2007; Слика 5). Проба је развијена након неколико покушаја током којих је тестирана ФРЕТ комбинација плавог и жутог ФП-а који су уграђивани на различитим местима близу С4 домена. Поред тога што је из конструкта уклоњен ензимски део, волтажна-зависност пробе је модификована тако да показује највећу сензитивност за волтажне промене које се налазе у физиолошки релеввантном опсегу (тј. вредност за полу-максимум одговора $V_{1/2}$ је померена са ~+80mV на ~-40mV). Ово померање волтажне осетљивости је постигнуто мутацијом у С4 домену ВСД-а, где је аминокиселина глутамин 217 мутирана у аргинин (*R217Q*). *VSFP2.1* индикатор транзиентно експримиран у *PC12* имортализованој ћелијској линији је показао промену у флуоресценцији од 5% ΔR/R (однос флуоресценције два ФП-а) на 22ºC, и 8.6% промену на 35ºC за 100mV деполаризационе пулсеве. Брзина сензора изражена кроз *tau (τ)* вредност је 71ms на 22ºC или 15ms на 35ºC при активацији, и 96ms на 22ºC или 75ms на 35ºC током деактивације (Dimitrov *et al.,* 2007). Активност коју је овај индикатор показао у сисарским неуронима гајеним у *in vitro* условима је отворила врата за даљи развој проба базираних на новооткривеном волтажном сензору (Gautam et al., 2009; Lundby *et al.*, 2008; Mutoh *et al.,* 2009; Perron *et al.*, 2009; Слика 6 и 7).

Након иницијалног успеха који је постигнут употребом новог, мање комплексног волтажног сензора даљи рад на побољшању проба се базирао на модификовању обе компоненте, како волтажног сензора тако и ФП-а. Развијене су пробе побољшаних карактеристика: повећане флуоресценције, повишене сензитивности (повишен ΔF/ΔV и однос сгнала према шуму) и кинетике (при активацији и деактивацији индикатора), пробе са спектрима побуђивања и зрачења већих таласних дужина (помереним ка црвеном делу спектра). Једна од

првих проба, названа *Mermaid,* која је показала повишену сензитивност (виши ΔF/ΔV) се базирала на новооткривеном ФП ФРЕТ пару (из корала изоловани зелени *mUKG* и црвени *mKoK*). Повишена сензитивност пробе је делимично постигнута изменом аминокиселинског састава секвенце која повезује ВСД и ФП (Tsutsui *et al.,* 2008). Овај сензор је показао високу осетљивост која је у ооцитама жабе износила 40 % ΔR/R за 100 mV деполаризационе промене, али која је значајно редукована у сисарским ћелијама (2-7 %). Такође, карактеристике ове пробе тестиране у *in vivo* условима су се показале лошим што је највероватнија последица интрацелуларног нагомилавања ФП-а, познате мане флуоресцентних протеина изолованих из корала (*Anthozoa).* Недавно је публикована на ФРЕТ-у базирана проба (Lam et al., 2012) у којој је кориштен нови пар ФП-а (зелени *Clover* и црвени mRuby2) и која је показала већу сензитивност у поређењу са својом претходницом *VSFP2.3.* Сензитивност и кинетика ове пробе тестиране *in vitro* на хипокампалним неуронима је показала да проба успешно прати појединачне нервне импулсе.

Кинетика већине до сада поменутих проба, укључујући *VSFP2s* (Lundby *et al.*, 2008; Mutoh *et al.,* 2009) и *Mermaid* (Tsutsui *et al.,* 2008) је релативно спора што је највероватније последица комплексне активације ВСД-а чија инхерентно спора компонента има највећи утицај на промену флуоресценције проба (Villalba-Galea et al., 2008). Индикатори са нешто бржом кинетиком (*VSFP3s*) су развијени када су као репортери волтажних промена, уместо ФРЕТ парова употребљени појединачни флуоресцирајући протеини који су са ВСД-ом повезани преко краће аминокиселинске секвенце (Perron et al., 2009). Пробе побољшане кинетике су добијене и манипулацијом волтажног сензора. Брзе пробе су добијене конструисањем химера између волтажно-сензитивних домена *Ciona-e* и волтажно-зависног канала за калијум *Kv3.1*, као и применом *Ci-VSD* ортолога изолованог из рибе *Danio rerio* (Baker et al., 2012). Ипак, практична примена ових проба је лимитирана недовољном сензитивношћу.

За оптичка снимања *in vivo,* која су крајњи циљ развоја волтажних сензора, флуоресцентни протеини са емисионим спектром помереним ка црвеном делу спектра нуде неколико значајних предности. Употреба црвенијих ФП-а је пожељна због веће пропустљивости ткива за светлост већих таланих дужина (и при ексцитацији и при емисији), аутофлуоресценција ткива је много мања на овим таласним дужинама што повољно утиче на смањење артефакта. Такође, са померањем спектра ка црвеном смањује се нтерференција која потиче од апсорпције хемоглобина. Протеине који емитују у црвеном делу спектра је због боље могућности раздвајања спектара лакше користити у комбинацији са другим флуоресцирајућим протеинима а показују и мању токсичност. До сада су објављене две студије у којима се радило са протеинима оваквих спектралних карактеристика. Perron и сарадници (2009) су развили низ проба у којима је волтажно-сензитивни домен *Ciona-e* комбинован са црвенијим ФП-има (*mOrange2, TagRFP and mKate2*). Тестиране у сисарским неуронима *in vivo* добијене пробе су показале малу сензитивност. Потпуно нови принцип у дизајну волтажних сензора представља примена слабе флуоресценције бактеријског родопсина (*Archaerhodopsin 3 (Arch)* из *Halorubrum sodomenseза)* за коју се показало да је волтажно осетљива (Kralj et al., 2011). Овакав приступ дизајну протеинских сензора има неколико потенцијално добрих страна: велика и линеарна промена флуоресценције у зависности од волтаже, спектралне карактеристике великих таласних дужина и отпорност на фото-избељивање. Ипак, квантна ефикасност флуоресценције ових родопсина је тако ниска (квантни принос родопсина је 0.001 у поређењу са зелено флуоресцирајућем протеином 0.65) да је њихова примена за оптичка снимања *in vivo* мало вероватна. И док је у *in vitro* условима могуће оптимизовати услове за детекцију интензитета флуоресценције, ниска флуоресценција ових проба захтева употребу ласера високог интензитета (1800 mW/cm^2) и осетљиве камере (Electron Multiplying Charge Coupled Device- *EMCCD*) за детекцију сигнала. Обзиром на повећани степен расипања светла у *in vivo* условима и на потенцијалну фототоксичност

узроковану оптичким условима које ова проба намеће мало је вероватно да ће ове пробе наћи ширу примену у пракси. Такође, покушаји да се протеин измени (Kralj et al., 2011) како би изгубио своју урођену активност протонске пумпе су довели до значајног успоравања кинетике (τ<1ms за *Arch* у поређењу са 45ms за мутирану, непроводљиву варијанту ArchD95N).

На основу свега реченог можемо закључити да упркос великим напорима који су уложени у развој протеинских волтажних индикатора ниједна до сада публикована проба нема довољну сензитивност која би дозволила извођење чак и најрудиментарнијих студија *in vivo.* И док одређени број проба одликује низак ниво базалне флуоресценције који онемогућава поуздану детекцију промена *in vivo*, друге карактрише висок ниво базалне флуоресценције али физиолошке промене не доводе до промене у интензитету флуоресценције. Многе пробе које су се показале функционалним у *in vitro* гајеним имортализованим, сисарским ћлијским линијама из нама непознатих разлога не функционишу у неуронима *in vivo*. Постоји велики број потенцијалних разлога укључујући и недовољну мембранску локализацију, убрзану деградацију или инактивацију изазвану интеракцијама са нама непознатим протеинима које неурони експримирају. Нажалост, напредак у развоју бољих проба није довео до доношења рационалних закључака везаних за утицај појединих особина пробе на њене перформансе (тј. сензитивност, брзину одговора, однос сигнала према шуму). На овом ступњу наш приступ развоју проба је и даље крајње емпиријски, а чак и основне законитости у конструкцији проба тек треба открити.

Циљ овог рада је дизајн волтажно осетљивих протеинских оптичких проба које показују највећу промену у флоресценцији за дату промену напона и које могу бити употребљене за оптичка снимања у неуронима *in vivo.* Један од тестираних приступа се базира на примени циркуларно-пермутоване варијанте зелено флуоресцентног протеина (*cpEGFP*) (Baird et al., 1999; Topell et al., 1999) који је претходно врло успешно употребљен у дизајну протеинских Ca^{++} проба (тзв. *GCaMP* серија) (Nakai et al., 2001; Nagai et al., 2001). Чињеница да су пробе у

којима је кориштен *cpEGFP* показале изузетно високу сензитивност као Ca^{++} индикатори (Tien et al., 2009, Zhao et al., 2011; Akerboom et al., 2012), навела нас је да истражимо могућност примене овако модификованог протеина у дизајну волтажних индикатора. Желели смо да испитамо могућност конверзије волтажно-зависних промена у структури *CiVS* у велике, брзе промене у флуоресценцији циркуларно-пермутованог зелено флуоресцентног протеина. Студија у којој је испитивана кристализована структра *GCaMP2* индикатора је показала да калцијум-зависна интеракције између M13 и калмодулина доводи до структурне промене која се огледа у појави слободне површине која затварајући отвор на циркуларно-пермутованом ФП-у доводи до пораста флуоресценције са порастом концентрације Ca2+ (Akerboom et al., 2009). Обзиром да су наши конструкти фузија између *cpEGFP* и *CiVS* немогуће је предвидети која од околних структура је слободна за интеракцију са отвором на ФП-у. Ипак, развој Ca^{++} (Nagai et al., 2001) и волтажних индикатора (Lundby et al., 2008) до сада је показао велике ефекте које имају и врло мале промене у аминокиселинској секвенци која повезује волтажни сензор и ФП. Резултати нас наводе на закључак је да велики број варијанти мора бити тестиран да би се добила проба побољшаних карактеристика. Иако идеји да се у дизајну волтажних сензора употреби циркуларно пермутована верзија ФП-а недостаје снажна хипотеза о механизму, она није нова (Gautam et al., 2009). Ранија студија је ову хипотезу само делимично истражила конструисањем и тестирањем 8 конструката и није дала значајније резултате (Gautam et al., 2009; Слика 7). Са друге стране, још од најранијих студија у овом пољу уређеним на индикатору *Flash* (Guerrero et al., 2002) било је јасно да побољшање флуоресценције ФП-а утиче на укупне карактеристике индикатора. У овом раду ми ћемо показати колики је утицај флуоресцентног протеина на сензитивност и кинетику сензора, где и тако мала промена као што је мутација једног аминокиселинског остатка у протеину дугом ~230 амино киселина може произвести волтажни индикатор битно измењених карактеристика.

Материјал и методе

Молекуларна биологија

Синтеза конструката базираних на циркуларно пермутованом зелено флуросцентном протеину је постигнута умножавањем одговарајућих сегмената волтажног сензора и варијанте зеленог флуросцентног протеина (тзв. побољшани зелени флуросцентни протеин- *EGFP*). Умножавање волтажног сензора је урађено уз помоћ прајмера комплементарних секвенци протеина где почиње транслација и дела 3' секвенце која одговара предпостављеном четвртом трансмембранском домену чиме је постигнуто одстрањивање ензимског дела протеина и укидање фосфатазне активности *Ciona intestinalis* волтажно зависне фосфатазе. Варијација места споја волтажног сензора и флуросцентног протеина је постигнута применом прајмера обрнутог смера који одговарају кодирајућој секвенци волтажног сензора а завршавају се са различитим амино киселинама чиме се добијају варијанте протеина различите дужине. Ови прајмери такође садрже 15 базних парова (5 кодона) који кодирају линкер секвенцу која повезује волтажни сензор и флуросцентни протеин. Ми смо тестирали 9 варијанти циркуларне пермутције зеленог флуросцентног протеина из *GCaMP3* калцијумске пробе које резултују отворима у терцијарној структури протеина различитог састава и величине. Оваква структура флуросцентног протеина је постигнута комбиновањем 6 прајмера на 9 различитих начина. Добијене делове секвенце могуће је спајати са волтажним сензором захваљујући крајевима од којих 15 базних парова на почетку одговара линкер секвенци на *5′* крају а на *3′* крају секвенци експримирајућег плазмида. Комбиновање умножених делова волтажно-осетљивог домена *Ciona intestinalis* и флуросцентног протеина у *CMV* експримирајућем плазмиду прилагођеном за аутоматизовано (роботизовано) клонирање је урађено помоћу *In-Fusion* реакције клонирања (*Clontech,* САД).

Конструкти кориштени у другом делу студије су иницијално добијени изменом раније публиковане генетички кодиране волтажно осетљиве пробе зване *Mermaid* (Tsutsui *et al.,* 2008). Ова проба је базирана на ФРЕТ пару (*mUKG* и *mKOk*) који је за потребе наше студије замењен pH осетљивом варијантом зеленог флуросцентног протеина познатом као *ecliptic pHluorin* (Miesenbock et al*.,* 1998). Кодирајућа секвенца ФП је амплификована помоћу полимеразне ланчане реакције (*PCR*) за коју је кориштена *pfu DNA* полимераза (*Agilent Technologies*, САД). Након третмана рестрикционим ензимима *BamHI* и *XbaI*

секвенца је уграђена у одговарајући део *Mermaid* конструкта. Прајмери кориштени за полимеразне ланчане реакције су:

5'-CGCGGATCCCAT GAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAG-3'
5'-GCGTCTAGATCATTT GTATAGTTCATCCATGCCATGTGTAATCC-3'

Модификације на конструктима које укључују тачкасте мутације и промене места споја волтажног сензора и флуросцентног протеина су постигнуте применом протокола за усмерену мутагенезу (*QuickChange II XL site-directed mutagenesis kit*, *Agilent Technologies*, САД). Верификација свих синтетисаних конструката је потврђена провером секвенце.

Ћелијска култура *in vitro*- имортализована ћелијска линија *HEK293* и примарни сисарски неурони

Потенцијални волтажни сензори су иницијално тестирани *in vitro* у имортализованим сисарским ћелијама *HEK293* (*AATC*, САД). Ћелијска линија је одржавана у *Dulbecco's Modified Eagle Medium, High Glucose-DMEM* медијуму (*In-vitrogen*, САД) допуњеног са 8% серума из фетуса говеда (*FBS; Sigma-Aldrich*, САД).

Пробе које су показале задовољавајућу волтажну сензитивност су даље тестиране *in vitro* у сисарским хипокампалним неуронима. За процедуру изоловања хипокампалних неурона кориштене су трудне женке мишева соја *CD-1*. Све процедуре које укључују употребу животиња су изведене у складу са протоколом одобреним од стране Комитета за коришћење животиња Џон Б. Пирс Лабораторије (*The John B. Pierce Laboratory)*, САД.

Увод у процедуру изоловања хипокампалних неурона је дубока анестезија трудне женке миша постигнута одговарајућом (3-5%) дозом изофлуорина. Дисекција мозга 18 дана старих ембриона изолованих из утеруса је праћена дисекцијом хипокампуса. Комплетна процедура од тренутка изолације ембриона је обављана у охлађеном раствору *HBSS* pH 7.2 (*Invitrogen*, САД). Изолација

појединачних ћелија из хипокампуси је олакшана потапањем ткива у раствор папаина 2мг/мл (*Worlighton Labs*, САД). Ензимска реакција је додатно убрзана иинкубацијом у воденом купатилу на температури од 37° Целзијуса у трајању од 20 минута. Коначна дисоцијација ткива на појединачне ћелије је постигнута физичком третманом ткива током које се ткиво пропушта кроз стерилне Пастерове пипете различитог дијаметра. Појединачне ћелије су потом у одговаракућој густини засејаване на поли-д-лизином (*poly-D-lysine, Sigma-Aldrich*, САД) третирана покровна стакалца бр.1. Ћелије су одржаване у Neurobasal медијуму у који је додато 0.5мМ глутамата (*Glutamax-I*) и Б-27 суплемент (*Invitrogen*, САД).

Обе културе ћелија су гајене у инкубатору под константном температуром од 37°C у атмосфери 5% угљен-диоксида. У случајевима када је за тестирање кориштен инвертовани микроском ћелије су гајене у стерилним, полистиренским Петријевим кутијама дијаметра 35 мм чије је дно прерађено тако да је за њега причврчшћено покровно стакалце број 1. У раду са усправним микроскопом коришћене су ћелије причвршћене за покровна стакалца број 1 која су чувана у одговарајућим судовима. У оба случаја покровна стакалца су третирана са поли-д-лизином (*poly-D-lysine, Sigma-Aldrich,* САД) који омогућава причвршћивање ћелија за стакло.

Експресија конструката у ћелијској култури је постигнута методом транзиентне трансфекције базиране на примени катјонских липозома. Задовољавајући ниво експресије проба је постигнут применом половине од фабрички препоручене дозе ДНК и *Lipofectamine 2000* (*Invitrogen*, САД). Применом смањене количине *Lipofectamine 2000* умањује се негативан ефекат протокола на ћелију (ћелијску мембрану).

Генерисање трансгених *ArcLight* винских мушица

Кодон оптимизована клонирајућа ДНК (cDNA) за експресију у винској мушици (*Drosophila melanogaster)* је синтетисана на основу аминокиселинске

секвенце волтажне пробе *ArcLight A242* из које су избрисане две амино киселине које се налазе на неконзервативном, унутарћелијском домену на *N* крају (*Pro38* и *Ala109*). Овако добијена ДНК-а је потом клонирана у *pJFRC7-20xUAS* вектор (Pfeiffer et al., 2010) чиме се генеришу *UAS-ArcLight* трансгени, а убризгавањем оплођених ембриона уграђена је у *attP2* и *attP40 phiC* (Groth et al., 2004). У свим овде описаним експериментима кориштена је *attP2* уградња *UAS-ArcLight. ArcLight* је специфично експримиран у PDF-позитивним сат неуронима употребом *pdf-GAL4* драјвера (Renn et al., 1999), у олфакторним пројекционим неуронима употребом *GH146-GAL4* (Stocker et al., 1997), и у олфакторним рецепторним неуронима употребом *Or83b-GAL4* (Larsson et al., 2004). *Kir2.1* и *NaChBac* јонски канали су експримирани у *LNVs* употребом *pdf-GAL4* драјвера *UAS-Kir2.1* односно *UAS-NaChBac* (Baines et al., 2001; Nitabach et al., 2002).

Пречишћавање флуоресцентних протеина

У PCR реакцији умножени фрагменти који кодирају зелени флуоресцентни протеина *ecliptic pHluorin* или *ecliptic pHluorin A227D* су уграђени у одговарајући вектор (*pCR4BluntTOPOvector-Invitrogen*, САД) чиме су добијени експримирајући конструкти. Овом процедуром се у *N*-терминус фузионог протеина уграђује *6xHis* таг који омогућава пречишћавање протеина. Након трансформације *Top10* бактерија са експресионим конструктом протеин је пречишћен уз помоћ *His-Select Nickel Affinity Gel* (*Sigma-Aldrich*, САД) а према упутству произвођача. Концентровање пречишћених протеина је извршено центрифугирањем уз употребу *Amicon Ultra-15* филтера.

Спектрофлуориметрија

Апсорпциони спектар пречишћених протеина је измерен на спектрофотометру *Shimadzu* UV-1601PC UV-VIS (*Shimadzu*, Јапан). Флуоресцентни ексцитациони и емисиони спектри протеина су измерени на *Horiba Jobin Yvon Fluorolog 3* спектрофотометру. У намери да се измери зависност флуоресценције у односу на pH вредност пречишћени протеини су разблажени до концентрације од 0.35 mM у пуферу који садржи 100 mM NaCl, 1 mM $CaCl_2$, и 1 mM $MgCl_2$. pH пуфера је подешена са 25 mM MES (за pH 3.5, 4.5, и 5.5), 25 mM HEPES (за pH 6.5 и 7.5), или 25mM Bicine (за pH 8.5 и 9.5). Концентрација протеина је мерена спектрофотометријски на *Beckman Coulter DU 730 uv/vis* спектрофотометру (*Beckman Coulter*, САД). Апсорпција пречишћених протеина који су претходно денатурисани у 0.1H NaOH је мерена на 280 nm. У случају оба протеина, протеинска концентрација је израчуната на основу ексцитационог коефицијента од 20,010 M^{-1} cm^{-1}.

Комбиновање метода наметнуте волтаже/струје на целу ћелију и оптичког снимања

Тестирање волтажне осетљивости потенцијалних проба је рађена употребом комбинације оптичког снимања и метода наметнуте волтаже. Кроз комору у којој су смештене ћелије током тестирања константно протиче екстрацелуларни раствор чија температура је контролисана и износи 33-35° Целзијуса.

Екстрацелуларни раствор кориштен током тестирања проба у *HEK293* ћелијама и примарним неуронима миша је: 150 mM NaCl, 5 mM глукозе, 4 mM KCl, 2 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 5 mM HEPES, pH 7.4. Екстрацелуларни раствор кориштен за снимања у неуронима и интактном мозгу мушице се састојао од: 101

mM NaCl, 3 mM KCl, 1 mM CaCl2, 4 mM MgCl2, 1.25 mM NaH2PO4, 5 mM глукозе, и 20.7 mM NaHCO3, pH 7.2, при чему је осмоларитет 250 mmol/kg.

Током снимања кориштене су пипете добијене од стаклених капилара спољашњег дијаметра 1.5 мм и унутрашњег дијаметра 0.75 мм (*WPI*, САД). Пипете су добијане извлачењем на P-97 *Flaming/Brown* хоризонталном пулеру (*Sutter Instrument Company,* САД). Раствор у пипети је прављен тако да што приближније одражава састав интрацелуларне средине и да не утиче на биофизичке особине ћелије. Састав раствора у пипети у случају *HEK293* ћелија је: 120 mM K-аспартат, 4 mM NaCl, 4 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, 10 mM EGTA, 3 mM Na_2ATP, 5 mM HEPES, а pH 7.2 је подешен са KOH. Састав раствора у пипети у случају хипокампалних неурона је: 120 mM K-глуконат, 3 mM KCl, 7 NaCl, 4 mM Mg_2ATP, 0.3 mM Na-GTP, 20 mM HEPES, 14 mM Трис-фосфокреатин, а pH 7.3 је подешен са KOH (Popovic *et al.,* 2011). Састав раствора у пипети у случају *LNVs* неурона мушице је 102 mM калијум глуконат, 17 mM NaCl, 0.085 mM CaCl2, 4 mM Mg-ATP, 0.5 mM Na-GTP, 0.94 mM EGTA, и 8.5 HEPES, pH 7.2, при чему је осмоларитет of 235 mmol/kg.

Контрола мембранског потенцијала и примена одговарајућих тест пулсева је вршена уз помоћ *Patch Clamp PC-505B* амплифајера (*Warner Instruments*, САД). У случају метода наметнуте волтаже на целу ћелију који је примењиван при тестирању проба у *HEK293* ћелијама, ћелије су након постизања гигаомског споја одржаване на мембранском потенцијалу од -70 mV. Основни протокол је подразумевао примену деполаризационих корака од 100 mV и у трајању од 200-300 ms. За детаљније анализе протоколи су варирани тако да су примењивани хиперполаризациони и деполаризациони стимулуси различите јачине (20, 40, 60, 80 и 100 mV). Трајање стимулуса је такође варирано при чему је најкраћи примењивани протокол трајао 1 ms а најдужи 300 ms.

За оптичко снимање ћелија кориштена су два система. У случају инвертованог микроскопа *Nikon Eclipse TE300* за снимање је кориштен објектив за имерзију у уљу *60x/1.4NA* (*Nikon Inc.,* Јапан). На усправном микроскопу *Nikon*

Eclipse E6000FN смо користили објектив за имерзију у води *60x/1.0 NA* (*Nikon Inc,* Јапан). На микроскоп су монтирани додаци за епи-флуоресценицију и дигитална *CCD* камера за мерење интензитета флуоресценције.

У одређеном броју експеримената извор ексцитационе светлости је била 150 W ксенонска лучна лампа са специјалним уређајем за напајање малог шума *1700XT/A* (*Opti-Quip, Highland Mills,* САД). У раду са зелено-флуоресцирајућим протеином користили смо два сета филтера. Прва комбинација филтера се састојала од ексцитационог *HQ480/30X* и емисионог филтера *HQ510LP*, и дихроичног огледала *505DCXR* (*Chroma*, САД). Друга комбинација су филтери који се налазе у филтер коцки GFP-3035B фирме Семрок у којој је ексцитациони филтер 472/30, дихроично огледало 495 nm и емисиони филтер 520/35 (*Semrock*, САД).

При тестирању проба у сисарским неуронима ексцитација је вршена применом ласерске светлости за коју смо користили три врсте ласера: *MLL-III-473* nm 50mW ласер, *MLL-FN-473nm* 50mW (*Changchun New Industries Optoelectronics Tech. Co*., Кина) или 488 nm 50mW ласер (*DL488-050, CrystaLaser,* САД). У случају ласерске илуминације кориштени су раније описани филтери са изузетком ексцитационог филтера. У раду са винском мушицом за оптичко снимање је кориштен *Olympus BX61WI* усправан микроскоп опремљен са *LUMFL 60x N.A. 1.10, LUMPlan FL 40x N.A. 0.80,* или *XLUMPlan FI 20x N.A. 0.95* објектив за имерзију у води (*Olympus*, Japan). За ексцитацију *ArcLight* пробе u мозгу мушице кориштен је ласер 488nm 50mW (*DL488-050*, CrystaLaser, САД), у комбинацији са 495nm дихроичним огледалом и 520/35nm емисионим филтером (*Semrock, Inc.,* САД). У свим случајевима ласерска светлост је усмеравана у микроскоп уз помоћ мултимодалног каплера за влакно (*Siskiyou*, САД), кварцног оптичког кабла и ахроматичног кондензора за епифлуоресценцију (*Achromatic EPI-Fluorescence-Till Photonics*, САД).

Флуоресцентна светлост са ћелије је усмерена на *CCD* камеру *(NeuroCCD-RedShirtImaging LLC,* САД*)* за аквизицију која је била смештена у равни

формирања примарног лика. Флуоресцентна слика је коригована (смањена) употребом 0.1x Optem zoom A45699 (*Qioptiq LINOS Inc.*, САД). У експериментима рађеним са винском мушицом флуоресцентна слика је коригована употребом или *Optem® zoom system A45731 0.1x* или *Optem® C-to-C mount 25-70-54 0.38x* (*Qioptiq LINOS, Inc*, САД). Оптички сигнали су регистровани фреквенцијом од 1000 или 2000 слика у секунди (1000 или 2000 Hz) у случају сисарских ћелија, и фреквенцијом од 500 Hz (*PDF* неурони) или 125 Hz (олфакторни неурони) у мозгу винске мушице. Измерена флуоресценција је просек интензитета флуоресценције измерене на површини целе ћелије.

Контролне студије утицаја експресије *ArcLight GEVI* на физиологију винске мушице

Биофизичке особине мембране *ArcLight*-експримирајућим *lLNvs* су поређене са контролом у којој lLNVs експримирају цитоплазматични ФП. Мерења су вршена у 3-8 дана старим мушицама применом метода наметнуте струје на целу ћелију у препарату мозга у присуству AChR антагониста (+)-tubocurarine (200μM), како би се блокирала активност у нервној мрежи и утишала синаптичка активност.

Правилна фаза и величина јутарње и вечерње активности зависи од нормалног функционисања LNVs и њихове способности да комуницирају са другим сат неуронима који улазе у састав циркадијане контролне мреже. Локомоторна активност је мерена помоћу стандардног система (*Drosophila Activity Monitor system-TriKinetics*, САД), у коме се мушице чувају засебно у стакленим тубама где се на једном крају налази храна а на другом чеп који је пропусан за гасове. Праћење кретања мушице дуж тубе је омогућено инфрацрвеним зраком који пролази кроз центар тубе.

In vivo препарат винске мушице и апликација мириса

За тестирање волтажно сензитивне пробе *ArcLight* у олфакторном систему винске мушице кориштене су женке старости 3-14 дана. Кориштен је *in vivo* препарат који је издизајниран и направљен на основу раније објављеног рада (Fiala and Spall, 2003). Укратко, за *in vivo* оптичко снимање комплетна глава мушице је провучена кроз отвор направљен на парчету самолепљиве траке и уз додатно причвршћивање лепком. Покровно стакалце је смештено у посебно дизајнирану коморицу која омогућава апликацију мириса преко система танких цевчица. Апликација мириса је омогућена константним протоком ваздуха који је усмерен у два правца тако да прелази преко филтер папира натопљеног у једном случају чистим минералним уљем а у другом комбинацијом уља и мириса. Кориштени су скоро чисти (> 99%) концентровани мириси (бутанол и/или пропионска киселина; Sigma-Aldrich, САД) који су разблажени 1:10 у минералном уљу а укупна количина која је нанета на филтер папир је износила 50 µl. Мириси су апликовани аутоматизованом алтернацијом између два могућа пута за проток ваздуха када ваздух прелази или преко филтер папира са уљем или преко филтер папира са комбинацијом уља и мириса (*Warner Instruments*, САД).

Конфокална микроскопија

За пробе које су базиране на циркуларно пермутованом зеленом флуоресцентном протеину слике су добијене употребом *Olympus Fluoview FV1000* (*Olympu*s, Japan) конфокалног ласер скенирајућег микроскопа опремљеног са *Olympus LUMFL 60×/1.10 W* објективом. За ексцитацију хромофоре кориштен је 488 nm аргонски ласер у комбинацији са одговарајућим филтер сетом који укључује: ексцитациони филтер 488BP (480–495 nm), дихроично огледало 505 nm и емисиони филтер BP515 (505–525 nm). За аквизицију и обраду слика кориштен је компијутерски програм *FV10-ASV*. *ArcLight* пробе су осликаване на *Zeiss 780 LSM* (*Carl Zeiss AG*, Немачка) конфокалном микроскопу са скенирајућим ласером

уз употребу *Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC M27* објектива. Ексцитација је потигнута применом аргонског ласера таласне дужине 488 nm при чему је кориштено дихроично огледало MBS 488 и емисиони филтер 493–598 nm. *Zeiss Zen 2009* је софтвер којим је систем опремљен и који је кориштен за аквизицију и обраду слика.

Анализа података

За аквизицију оптичких сигнала и електрофизиолошких података кориштен је *NeuroPlex* компијутерски програм (*RedShirtImaging*, САД). Добијени подаци су анализирани применом рачунарских програма који су развијани у току овог рада и написани у *LabView* (*National Instruments Inc*., САД) или *Igor* (*WaveMetrics*, САД). Промене у интензитету флуоресценције волтажних индикатора су приказане као фракционе промене сигнала $-\Delta F/F = (F_0 - F)/F_0$, где је F интензитет флуоресценције, а F_0 флуоресценца у стању мировања. Подаци су представљени као процентуална промена у $\Delta F/F$. Вредност % $\Delta F/F$ је израчуната тако што се прво од сваког фрејма одузме слика добијена у одсуству светлости (корекција за изворе светла који не потичу од флуоресценције). Потом се просечна вредност добијена за интензитет флуоресценције у региону од интереса у сваком фрејму (F) одузме од просечне вредности добијене за регион од десет фрејмова пре догађаја од интереса (F_0). Добијена вредност се потом подели са вредношћу за F_0. Корекција ефекта изазваног избељивањем ФП-а је вршена тако што је идеализована крива (описана са два експоненцијална фактора и подешена у односу на делове сигнала који се налазе ван опсега волтажног пулса) подељена са мерним флуоресцентним сигналом (Perron et al., 2009).

$$y = a_1 e^{-x/\tau_1} + a_2 e^{-x/\tau_2} \qquad 1$$

y је флуоресценција у функцији времена **x.** $\mathbf{a_1+a_2}$ је иницијални ниво

флуоресценције при чему се $\mathbf{a_1}$ експоненцијално мења са брзом временском константом $\boldsymbol{\tau_1}$, а $\mathbf{a_1}$ се експоненцијално мења са споријом временском константом $\boldsymbol{\tau 2}$.

Добијени подаци су даље обрађивани употребом *Origin8.1* (*Origin-Lab*, САД), *LabView* (*National Instruments*, САД), *Igor Pro 6* (*WaveMetric*s, САД) и *Excel* (*Microsoft*, САД) компијутерских програма.

За мерење брзине одговора волтажно-зависних проба флуоресцентни одговори су подешавани помоћу једначине са једним експоненцијалним фактором,

$$y = y_0 + a_1 e^{-(x-x_0)/\tau_1} \qquad 2$$

и са два експоненцијалана фактора,

$$y = y_0 + a_1 e^{-(x-x_0)/\tau_1} + a_2 e^{-(x-x_0)/\tau_2} \qquad 3$$

при чему је **y** флуоресценција у функцији времена **x,** а $\mathbf{x_0}$ је почетак тест пулса волтаже. $\mathbf{y_0 + a_1 + a_2}$ је уравнотежени ниво флуоресценције пре задатог тест пулса волтаже, $\mathbf{a_1}$ је део флуросценције који се експоненцијално мења са брзом временском константом $\boldsymbol{\tau_1}$, док је $\mathbf{a_2}$ део флуросценције који се експоненцијално мења са спором временском константом $\boldsymbol{\tau_2}$, $\mathbf{y_0}$ је уравнотежени ниво флуоресценције при задатом тест пулсу.

Однос промене интезитета флуоресценције према промени волтаже је анализирана Болцмановом (Boltzmann) једначином:

$$y = a_2 + \frac{a_1 - a_2}{1 + e^{\left(x - x_{\frac{1}{2}}\right)/s}} \qquad 4$$

Однос нормализоване ΔF/F према V је израчунат помоћу једначине:

$$y = \frac{1}{1 + e^{(x - x_{\frac{1}{2}})/s}} \qquad 5$$

где су $\mathbf{a_1}$ и $\mathbf{a_2}$ асимптотске вредности за % промену флуоресценције при малим, односно великим вредностима за **x** (мембрански потенцијал, mV), $\mathbf{x_{1/2}}$ је вредност за мембрански потенцијал при коме ΔF/F има половину од своје максималне вредности. **S** је нагиб криве (mV).).

Резултати

Флуоресцентне волтажно-зависне протеинске пробе базиране на циркуларно пермутованом флуоресцентном протеину

Направили смо 9 верзија циркуларно пермутованог зеленог флуоресцентног протеина у којима је варирана величина отвора. Намера је била да се систематски испита могућност да ће отвор у неком од ФП-а бити такав да га је могуће затворити неком од околних површина. Приликом дизајнирања отвора у циркуларно пермутованом зелено флуоресцентном протеину водили смо се за принципом да је у *GCaMP3* индикатору формирање отвора постигнуто уклањањем аминокиселина ФП које се налазе на позицијама 145 до 148 (Tian *et al*., 2009). Ова варирања у аминокиселинском саставу резултују отворима који се разликуу по саставу и локализацији (Слика 8, Табела 1). Сваку од 9 варијанти циркуларно пермутованог зеленог флуоресцентног протеина смо уградили на десет различитих локација уоквиру *CiVS*. Избор места уградње ФП-а уоквиру волтажног сензора су биране тако да одговарју локацијама које су се показале успешне у ранијим пробама или да се налазе у њиховој непосредној близини. Места уградње ФП-а су варирана тако да се крећу од C4 домену најближег аминокиселинског остатка лизина 241 (*K241*) и низ секвенцу ВСД-а све до гуанина 259 (*G259*). Клонирање ФП-а на одређене позиције је урађено уз помоћ *mUKG* секвенце која садржи 5 амино киселина (Слика 8, Табела 1). Намера нам је била да овако формираним разликама у растојању између *cpEGFP* и C4 испитамо варијације у кинетици промена које се под утицјем волтажних промена дешавају у C4 региону. Комбинацијом варијанти ФП-а и места уградње је добијено 90 потенцијалних проба.

Табела 1. Дизајн проба, ниво експресије и ΔF/ΔV осетљивост CiVS::cpEGFP конструката. Систематски су испитиване две променљиве: 1) позиција амино киселине у оквиру *CiVS* где је уграђен *cpEGFP* (хоризонтална оса, односно 1.x), и 2) величина и позиција (вертикална оса, односно x.1) отвора у *cpEGFP*. Сивим бројевима су означени бројеви конструката. Зеленим осенчена поља се односе на пробе које показују базални ниво флуоресценције у трансфекованим *HEK293* ћелијама. Осенчени бројеви у пољима означавају упросечне вредности измерене за максималну % ΔF/F ± SEM за +100 mV/200 ms волтажне пулсеве, потенцијал мировања је -70 mV; *NS* = нема ΔF/F сигнала; Црвеним бројевима у пољима су обележени сигнали који су показали обрнуту поларизованост (пораст флуоресценције) при деполаризационим пулсевима.

Место уградње *cpEGFP* у *CiVS*

....L L R V V R L A R I F Y S H Q Q M K A S S R R T I S Q N K R R Y R K D G ...

CiVSP S4

Варијација у отвору у *cpEGFP*

		pLB1.x K241	pLB2.x S243	pLB3.x R245	pLB4.x I248	pLB5.x S249	pLB6.x N251	pLB7.x K252	pLB8.x Y255	pLB9.x K257	pLB10.x G259
GHKLEYN- - - - NVYIKADKQ	pLBx.1	1.1	2.1	3.1	4.1	5.1	6.1	7.1	8.1	9.1 NS	10.1 <+0.1
GHKLEYNY- - - NVYIKADKQ	pLBx.2	1.2	2.2	3.2	4.2	5.2	6.2	7.2	8.2	9.2	10.2
GHKLEYNYN- - NVYIKADKQ	pLBx.3	1.3	2.3	3.3	4.3	5.3	6.3	7.3	8.3	9.3	10.3
GHKLEYN- - - HNVYIKADKQ	pLBx.4	1.4	2.4	3.4	4.4	5.4	6.4	7.4	8.4	9.4	10.4
GHKLEYNY- - HNVYIKADKQ	pLBx.5	1.5	2.5	3.5	4.5	5.5 NS	6.5 < -0.1	7.5	8.5	9.5	10.5 +0.2 ±0.05
GHKLEYNYN- HNVYIKADKQ	pLBx.6	1.6 NS	2.6 < -0.1	3.6	4.6	5.6	6.6	7.6	8.6 NS	9.6	10.6
GHKLEYN- - SHNVYIKADKQ	pLBx.7	1.7 -0.29 ±0.03	2.7 -1.2 ±0.18	3.7	4.7 -0.71 ±0.01	5.7 -0.6 ±0.003	6.7	7.7 -0.83 ±0.23	8.7 -0.45 ±0.16	9.7	10.7
GHKLEYNY- SHNVYIKADKQ	pLBx.8	1.8 -0.45 ±0.09	2.8	3.8	4.8	5.8	6.8	7.8	8.8	9.8	10.8 +0.16 ±0.02
GHKLEYNYNSHNVYIKADKQ	pLBx.9	1.9	2.9 -0.52 ±0.06	3.9	4.9 -0.27 ±0.03	5.9 -0.22 ±0.04	6.9 NS	7.9 NS	8.9 -0.17 ±0.03	9.9 +0.33 ±0.03	10.9 +0.28 ±0.09

Ниво експресије свих конструкта је испитиван транзијентном експресијом у *HEK293* ћелијама. Након 48 сати експресије, 55 од 90 конструката је довело до појаве флуоресценције у ћелијама (Табела 1) која је генерално говорећи била слабијег интензитета и лошије мембранске локализације (Слика 9) у поређењу са другим *CiVSP* волтажним пробама (Dimitrov *et al.*, 2007; Tsutsui *et al.*, 2008; Gautam *et al.*, 2009; Perron *et al.*, 2009). Компаративна анализа интензитета флуоресценције у ћелијама урађена применом конфокалне микроскопије је

```
...larllrvvrlarifyshqqmkassrrtisqnkrryrkdgfdldltyvtdh.....CionaVSP

...larllrvvrlarifyshqqmkassrrtisqnkrrcgrCFP.....VSFP2.1
...larllrvvrlarifyshqqcgrRFP.....VSFP3.1
...larllrvvrlarifyshqqmkassrrtisgdpmUKG.....Mermaid


...larllrvvrlarifyshqqmkmsvikGFP.....1.X
...larllrvvrlarifyshqqmkasmsvikGFP.....2.X
...larllrvvrlarifyshqqmkassrmsvikGFP.....3.x
...larllrvvrlarifyshqqmkassrrtimsvikGFP.....4.x
...larllrvvrlarifyshqqmkassrrtismsvikGFP.....5.x
...larllrvvrlarifyshqqmkassrrtisqnmsvikGFP.....6.x
...larllrvvrlarifyshqqmkassrrtisqnkmsvikGFP.....7.X
...larllrvvrlarifyshqqmkassrrtisqnrrymsvikGFP.....8.X
...larllrvvrlarifyshqqmkassrrtisqnrryrkmsvikGFP.....9.X
...larllrvvrlarifyshqqmkassrrtisqnrryrkdgmsvikGFP.....10.X

...larllrvvrlarifyshqqmkasmsvikshnv.....ElectricPK
```

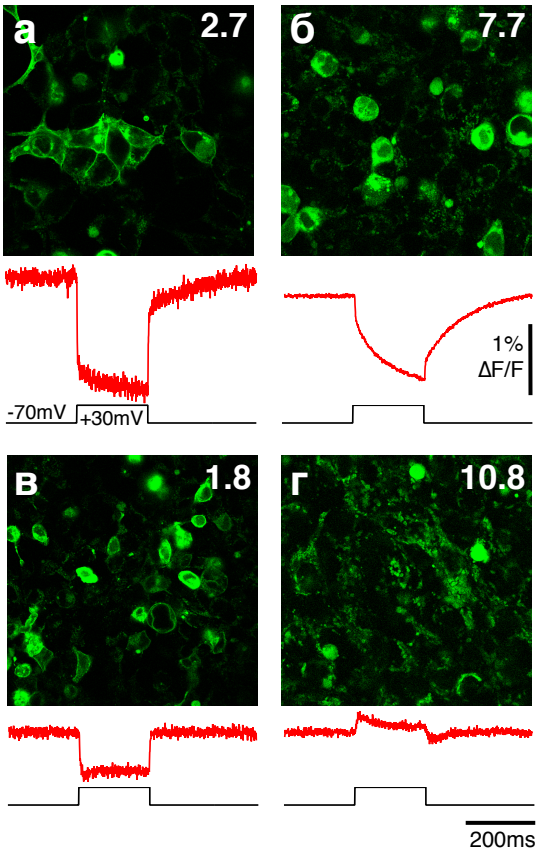
Слика 8. Протеинске секвенце различитих места спајања између *cpEGFP* и *CiVS*. Од врха: *CiVSP* секвенца укључује C4 домен (јарко плаво зелена), линкер домен (плаво зелено и црно) и део секвенце за фосфатазу (црвено). Места споја и линкер секвенце у пробама *VSFP 2.1, 3.1* (Dimitrov et al., 2007; Lundby et al., 2009) и *Mermaid* (Tsutsui et al., 2008. У раду смо истражили десет различитих места спајања и линкера (*pLB1.x-10.x*; види Табелу 1). Тачно место споја је идентификвано на основу последње амино киселине у *CiVS* присутне у проби (јарко црвена). У свим случајевима на овај аминокиселински остатак се наставља додатна секвенца од 5 амино кислина (љубичаста) и секвенца ФП-а (зелена). Врста амино киселине која се налази на почетку *cpEGFP* зависи од величине и позиције отвора у cpEGFP (Види Табелу 1).

показала варијације у интензитету и субцелуларној локализацији између различитих конструката (Слика 9). Конструкти у којима је место уградње ФП-а ближе C4 домену и који поседују највећу предвиђену величину отвора у највећем броју случајева не доводе до флуоресценције. Експресија свих конструката у којима је ФП удаљен од C4 домена и који имају мањи отвор на ФП-у је довела до флуоресценције у ћелијама (Табела 1).

Од 24 потенцијалне пробе чија је волтажна сензитивност тестирана методом наметнуте волтаже, девет није показало сензитивност или је она била занемарљиво ниска (~0.1% ΔF/F) у одговору на волтажне стимулусе (деполаризациона промена од 100 mV док је ћелија држана на потенцијалу од −70 mV). Остали конструкти су у одговору на исти стимулус показали промену у интензитету флоресценције која се кретала од +0.33% до −1.2% ΔF/F (Табела 1, Слика 9). Највећа сензитивност је уочена у конструктима са најмањим отвором на ФП-у. У већини конструката, деполаризциони стимулус изазива смањење интензитета флуоресценције (Табела 1, Слика 9а-в) док је у пет конструката (четри на локацији G259 и једна на K257) на исти тест стимулус одреаговало повећањем у флуоресценцији (Табела 1, Слика 9г).

И док су два (pLB 7.7 и pLB 7.8) конструкта показала предоминантно спору кинетику при активацији и деактивацији (τ~69ms; Слика 9б), 13 конструката (10.5, 1.7, 2.7, 4.7, 5.7, 1.8, 10.8, 2.9, 4.9, 5.9, 8.9, 9.9, 10.9) се одликује изузетно брзом кинетиком (τ~2 ms; Слика 9а и 9в). Наша процена је да је детекција брзине тестираних одговара највероватније ограничена брзином које су примењене експерименталне методе (метод наметнуте волтаже ~1ms и узорковање оптичког сигнала од 2,000 fps) имале у нашим рукама. Кинетику одговора у девет конструката (9.1, 10.1, 5.5, 6.5, 1.6, 2.6, 8.6, 6.9, 7.9) који не показују волтажну сензитивност или је иста врло ниска је практично било немогуће прецизно одредити.

Међу описаним конструктима највећу сензитивност је показала проба pLB2.7 (−1.2 ± 0.18% ΔF/F; Слика 9а), коју смо назвали *ElectricPk,* и која је даље детаљније испитивана. *ElectricPk* се одликује брзом стопом активације (τ_{on} = 2.24

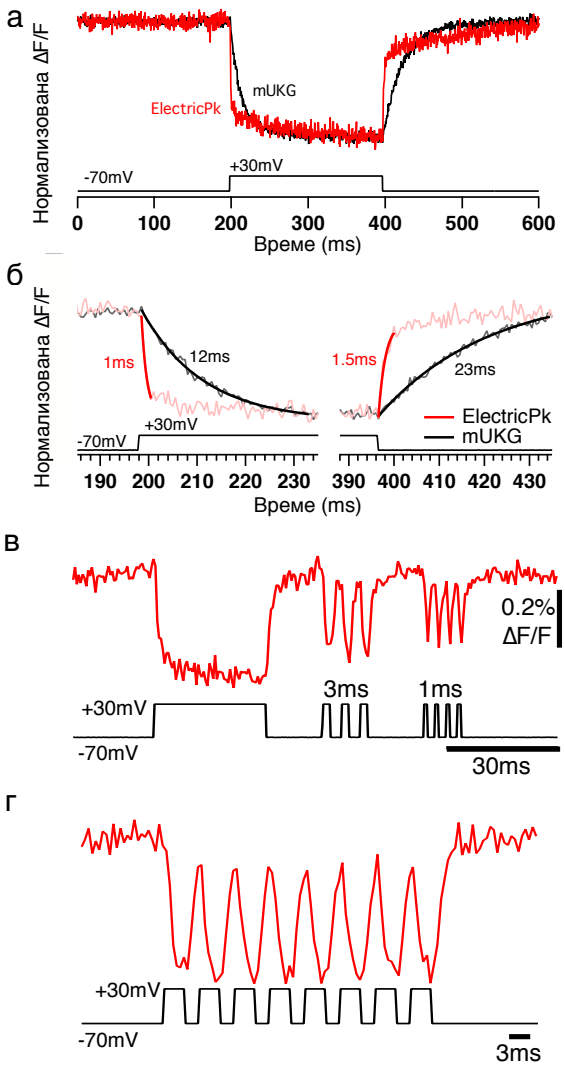


Слика 9. Примери експресије *CiVS::cpEGFP* конструката експримираних у *HEK293* ћелијама и њихова волтажна сензитивност. У свим случајевима горњи панел је слика *HEK293* ћелија које транзијентно експримирају конструкт добијена конфокалном микроскопијом. Доњи панел је флуоресцентни сигнал (црвени запис) добијен упросечавањем десет одговора на +100 mV/200 ms волтажни пулс применом метода наметнуте волтаже на целу ћелију. Корекција ефекта изазваног избељивањем ФП-а је вршена тако што је идеализована крива (описана са два експоненцијална фактора и подешена у односу на делове сигнала који се налазе ван опсега волтажног пулса) подељена са мерним флуоресцентним сигналом. а) *ElectricPk* (*pLB 2.7*) проба је локализована углавном у мембани и делимично унутар ћелије. Проба показује брзо смањење у интензитету флуоресценције са релативно ниским односом сигнала према шуму што је последица релативно ниског нивоа флуоресценције. б) Висока експресија конструкта *pLB7.7* показује релативно висок однос сигнала према шуму, међутим уочљиво је и присуство одређеног нивоа флуоресценције унутар ћелије. Кинетика смањења интензитета флуоресценције је спора. в) Конструкт *pLB1.8* је локализован подједнако у мембрани и унутарћелијски а на промену волтаже реагује брзо и са малим смањењем у интензитету флуоресценције. г) *pLB10.8* проба је углавном локализована интрацелуларно и за разлику од већине других конструката показује мало повећање у интезитету флуоресценције.

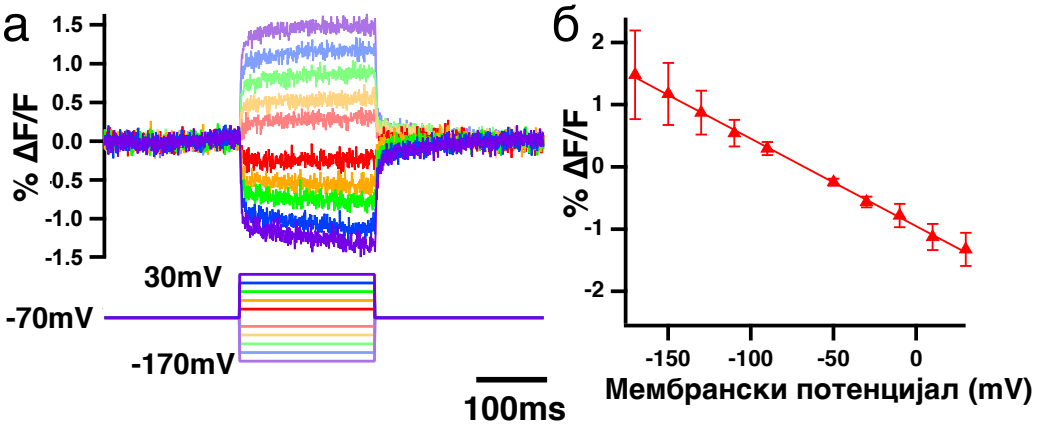
± 0.58 ms, n = 8) и деактивације ($\tau 1_{off}$ = 2.09 ± 0.74 ms, $\tau 2_{off}$ = 69.07 ± 20.29 ms; Слика 10а). Стопа активације *ElectricPk* је 5 пута бржа (Слика 10б) него иста код *CiVS*-базиране пробе *Mermaid* (τ_{on} = 2.24 ms код *ElectricPk* у поређењу са 12 ms код Mermaid; Tsutsui *et al*., 2008)). Стопа деактивације је 11 пута бржа (τ_{off} = 2.09 ms код *ElectricPk* у поређењу са 23 ms код *Mermaid*). Брзина реакције и осетљивост ове пробе омогућавају детектовање вишеструких, високо фреквентних кратких (1–3 ms) деполаризационих тест пулсева од којих сваки производи дискретан одговор у промени интензитета флуоресценције а да при томе не долази до значајнијег одступања од основне линије (Слика 10в, г).

Тестирана низом хиперполаризационих и деполаризационих тест пулсева (−100 - +200 mV) *ElectricPk* проба је показала да се промена у флуоресценцији мења линеарно са променом волтаже (Слика 11).

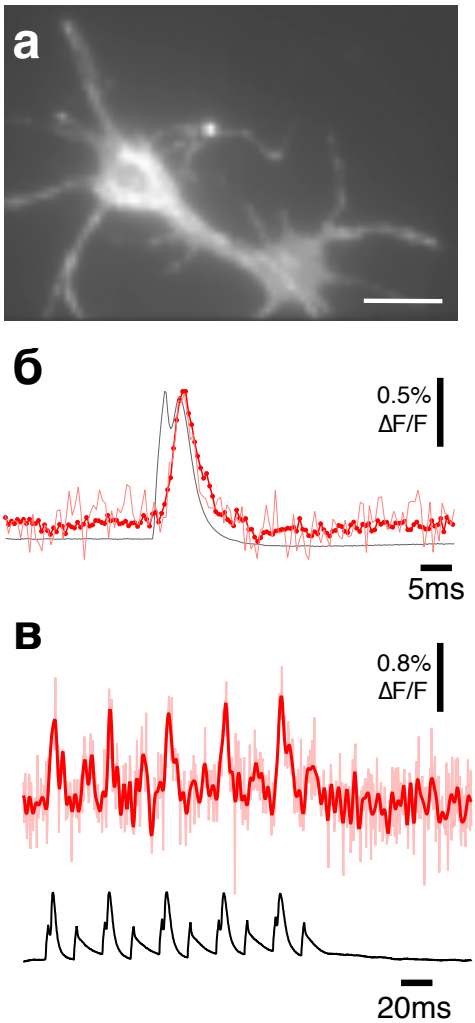
Даља карактеризација *ElectricPk* пробе је урађена у примарној култури неурона миша гајених у *in vitro* условима. Уз добру мембранску локализацију у ћелијској соми и наставцима, уочено је и присуство извесне количине унутарћелијскиог депозита (Слика 12а). Флуоресцирајуће ћелије су тестиране методом наметнуте струје на целу ћелију где је електрична активност неурона у виду акционих потенцијала изазивана убризгавањем кратких (2 ms) струјних пулсева. *ElectricPk* индикатор се показао способним за детекцију појединачних акционих потенцијала са високом временском резолуцијом (Слика 12б). Узлазна и силазна фаза акционих потенцијала су јасно уочљиве. Упркос скромној величини сигнала (~0.7% ΔF/F), која варира у зависности од нивоа експресије, низове акционих потенцијала је било могуће уочити без потребе за упросечавањем сигнала (Слика 12в).



Слика 10. Волтажна осетљивост и брзина реакције *ElectricPk*. а) Волтажно-зависна промена флуоресценције у *HEK293* ћелијама када транзијентно експримирају *ElectricPk* (запис црвеним) у односу на *mUKG* у проби *Mermaid* (горњи запис црним) је тестирана пулсевима од +100 mV/ 200 ms, при чему је ћелија држана на -70 mV основном потенцијалу (доњи запис црним). У свим случајевима интензитет флуоресценције је нормализован у односу на почетни и максимални ниво. б) Идеализоване криве описане једним експоненцијалним фактором су подешене на доминатне стопе активације (*on*) и деактивације (*off*) промене флуоресценције у *ElectricPk* и *mUKG* у *Mermaid* у ћелијама тестираним под (а). в) и г) Одговор *HEK293* ћелије која експримира *ElectricPk* (запис црвеним) на низ волтажниг тест пулсева јачине +100 mV а различитог трајања 100 ms, 3 ms и 1 ms (запис црним). Ћелија је држана на -70 mV основном потенцијалу.



Слика 11. Линеаран однос ΔF/ΔV *ElectricPk*. а) Промена флуоресценције (горњи запис) у ћелијама које транзијентно експримирају *ElectricPk* као одговор на низ деполаризационих и хиперполаризационих тест пулсева (-170 до +30 mV, при чему је ћелија држана на -70 mV основном потенцијалу, доњи запис). б) ΔF/ΔV крива за *ElectricPk* добијена на основу података приказаних под (а).

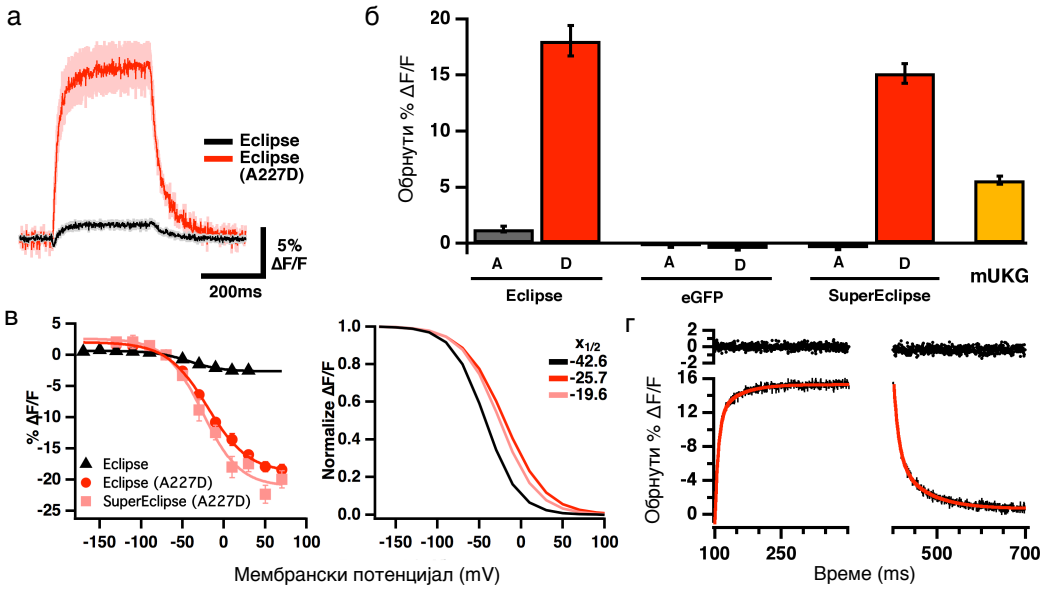


Слика 12. Детекција нервних импулса у хипокампалним неуронима уз помоћ *ElectricPk*. а) Слика хипокампалног неурона миша гајеног у култури *in vitro* који експримира *ElectricPk* добијена је применом широкопољне епифлуоресцентне микроскопије и *RedShirtImaging NeuroCCD* камера. Линија =15 μm. б) Појединачан (запис светло црвеним) и упросечен (запис црвеним) оптички одговор на изазване нервне импулсе у неурону приказаном у (а). Упросечени сигнал је добијен обрадом сигнала добијених за 32 нервна импулса. Сва снимања су урађена на 2000 fps. в) Промена флуоресценције (запис светло црвеним-нефилтриран, запис цвеним-филтриран) која се јавља при низу изазваних нервних импулса у *in vitro* гајеним хипокампалним неуронима миша који експримирају *ElectricPk*. Доњи запис црним је електрични запис снимљен применом методе наметнуте струје на целу ћелију. Сви записи су кориговани за артефакт избељивања ФП-а, у случајевима где је назначено филтрирање је урађено са *Bessel* филтером на 350 Hz.

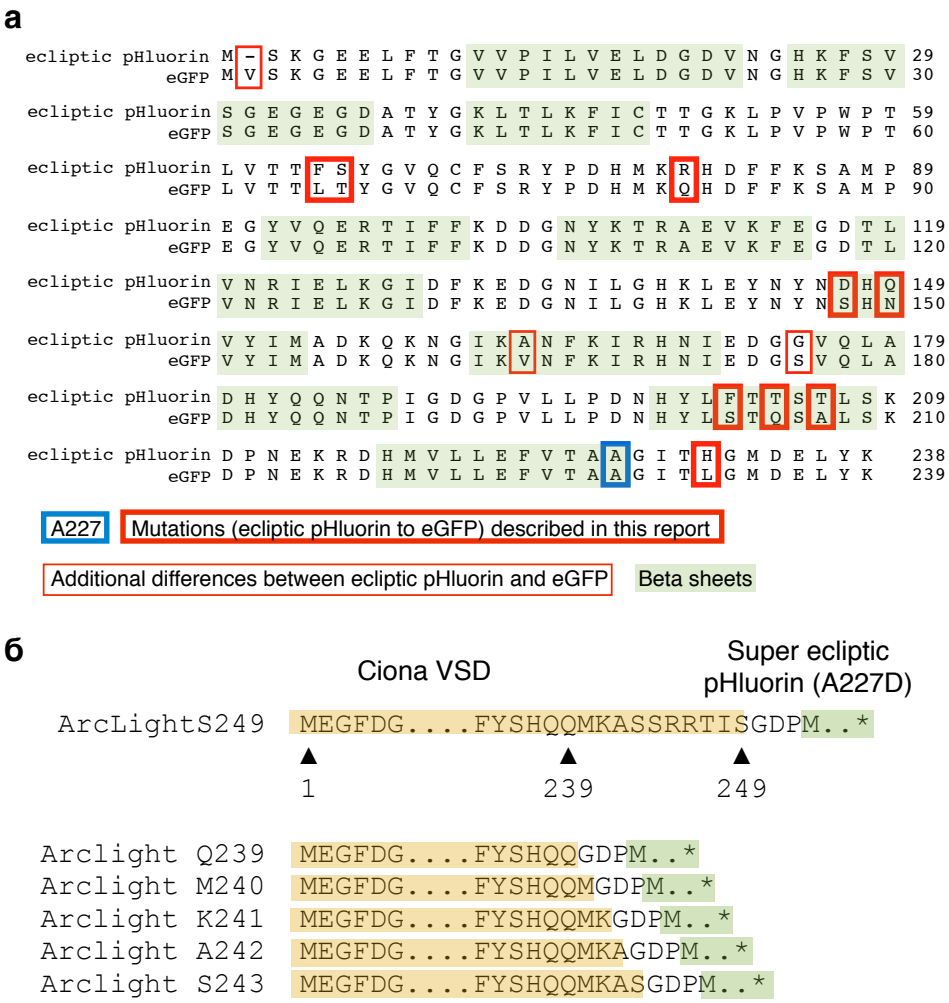
Флуоресцентне волтажно-зависне протеинске пробе базиране на pH-сензитивном зеленом флуоресцентном протеину

У намери да се испита ефекат употребе различитих ФП-а у дизајну *CiVS*-базираних волтажних индикатора, FRET пар (*mUKG* и *mKOk*) који се оригинално налази у индикатору *Mermaid* (Tsutsui *et al*., 2008) је замењен са варијантом зелено флуоресцентног протеина *ecliptic pHluorin* (GenBank: AAC40226.1; Miesenböck *et al*., 1998). *Ecliptic pHluorin* је развијен као pH-осетљива проба која је добијена мутирањем шест аминокиселинских остатака у зелено флуоресцентном протеину *wild-type aqGFP* (Miesenbock *et al*., 1998). У односу на *aqGFP* однос pH и интезитета флуоресценције у *ecliptic pHluorin* је померен према базним вредностима (Miesenböck *et al*., 1998). Волтажни индикатор који садржи *ecliptic pHluorin* је показао ниску волтажну осетљивост (-1.3% ± 0.3% ΔF/F) за +100mV тест пулсеве (Слика 13а и 13б). Ради даљег истраживања ове пробе развијене су варијанте *HEK293* ћелијске линије које стабилно експримирају ову пробу и у једној од њих смо открили ненамерну мутацију која је довела до промене амино киселине аланин на позицији 227 у оквиру флуоресцентног протеина (за одређивање позиције амино киселина као референцу смо користили сквенцу *wild-type aqGFP;* Слика 14а) у аспартичну киселину (*A227D*). Мутирана проба је показала 14 пута већу волтажну-осетљивост (-18.1% ± 1.4 %, n = 6) у ΔF/F (Слика 13а и 13б) за деполаризационе пулсеве од100mV у односу на оригиналну пробу.

У покушају да расветлимо механизам који је довео до овако рапидног повећања у волтажној осетљивости развили смо низ додатних проба. У намери да одредимо да ли је високу амплитуду сигнала до које је довела мутација *A227D* могуће репродуковати у другим пробама истражили смо ефекат ове мутације у ФП волтажним индикаторима који садрже или *super ecliptic pHluorin* (Sankar-



Слика 13. Мутација A227D повећава распон флуоресцентног одговора на *CiVS*-базираним пробама које садрже *ecliptic pHluorin* или *Super Ecliptic pHluorin*. а) Промена интезитета флуоресценције у *HEK293* ћелијама које експримирају или *CiVS-ecliptic pHluorin* (црна, n = 9 ћелија; 10 покушаја по ћелији) или *CiVS- ecliptic pHluorin A227D* (црвена, n = 6) у одговору на 100mV деполаризационе пулсеве (-70mV основни потенцијал). Записи обележени светлијим тоновима (сива или розе) представљају израчунате стандардне грешке. б) Фракционална промена у интезитету флуоресценције % ΔF/F (средња вредност ± *SEM*) настала при 100mV деполаризационим пулсевима у седам волтажних индикатора у којима су различити ФП-и уграђени у *CiVS* на позицији *S249*: *ecliptic pHluorin* (црна; n = 9), *ecliptic pHluorin A227D* (црвена; n = 6), *eGFP* (црна; n = 10), *eGFP A227D* (црна; n = 5), *super ecliptic pHluorin* (црна; n = 9), *super ecliptic pHluorin A227D* (*ArcLight*, црвена; n = 8), и *mUKG* из *Mermaid* (зелена; n = 25). в) Лево: максимум % ΔF/F (средња вредност ± *SEM*) у односу на мембрански потенцијал и подешене Болцманове (Boltzmann-једначина 4) криве за три *CiVS*-базиране волтажне пробе које садрже различите ФП-е: *ecliptic pHluorin* (црна), *ecliptic pHluorin A227D* (црвена) и *super ecliptic pHluorin A227D* (*ArcLight,* роза). Десно: Болцманова подешавања на криве нормализованих флуоресценција за три пробе (једначина 5). г) Доле: промена флуоресценције *super ecliptic pHluorin A227D (ArcLight*) током деполаризације (лево) и реполаризације (десно) при 100mV деполаризационом пулсу, ћелија је држана на -70mV (црна, један покушај) и подешавање на идеализовану криву која се описује са два експоненцијална фактора (црвена, једначина 3).



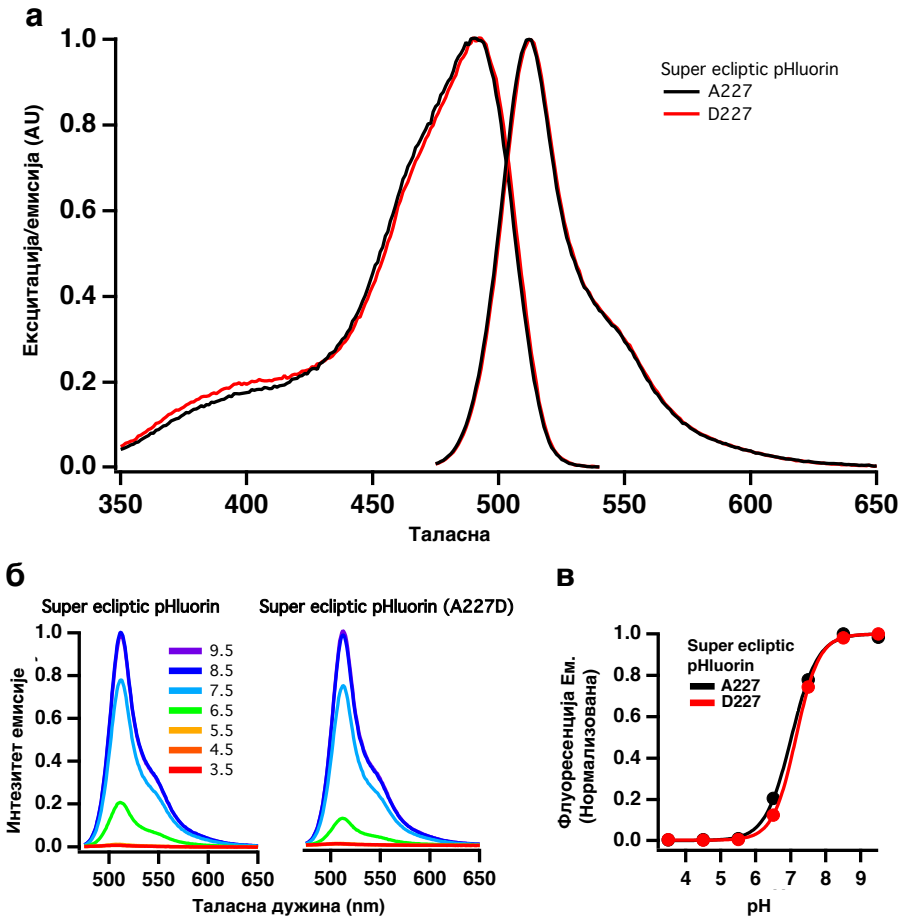
Слика 14. Секвенце протеина кориштених у овом раду и структура *ArcLight* пробе. а) Поређење протеинских секвенци флуоресцентних протеина *ecliptic pHluorin* и *EGFP*. Остатак амино киселине A227 је уоквирен плавим. Остаци амино киселина који се разликују између *ecliptic pHluorin* и *EGFP* су уоквирени црвеним. Интензивнијом црвеном бојом су уоквирени остаци амино киселина *ecliptic pHluorin* који су мутирани тако да одговарају онима који се налазе у *EGFP*. Светло зеленом бојом су осенчени остаци амино киселина које формирају бета равни у структури ФП-а. б) Померањем ФП-а ближе C4 домену *CiVS* добијене је низ проба из *ArcLight S249*. У свим пробама фосфатазни део је избрисан из *CiVSP*. Преостали део волтажног сензора (осенчен жутим) је спојен са флуоресцентним протеином *super ecliptic pHluorin A227D* (осенчен зеленом) на различитим локацијамas. Три амино киселине, GDP које се налазе између *CiVS* и *ФП* су унесене у процесу клонирања из рестрикционог места *BamHI* рестрикционог ензима који је оригинално кориштен у конструкцији пробе *Mermaid*, која је родитељска проба за *ArcLight*.

anarayanan *et al*., 2000) или *EGFP* (тзв. побољшани зелено флуоресцентни протеин). Ова две варијанте зелено флуоресцентног протеина су врло сличне и обе су добијене мутагенезом *wild type aqGFP*. *Super ecliptic pHluorin* је добијен комбинацијом мутација које се налазе у *ecliptic pHluorin* и двема мутацијама, *F64L* и *S65T* које се налазе у *EGFP* (Sankaranarayanan *et al*., 2000; Слика 14а). *F64L* и *S65T* мутације које се налазе у *EGFP* доводе до промене ексцитационог спектара *super ecliptic pHluorin* редукујући га на само један максимум (~490 nm), и продукују светлији и фото-сатбилнији ФП не утичући при том на његову pH-сензитивност (Sankaranarayanan *et al*., 2000). Волтажни индикатори базирани на *super ecliptic pHluorin* (+0.5 ± 0.1% ΔF/F) или *EGFP* (+0.3 ± 0.1% ΔF/F) ФП-у нису показали значајнију промену у интезитету флуоресценције при примени деполаризационих пулсева (Слика 13б). Уношење мутације *A227D* је, међутим довело до драматичног пораста у величини одговора пробе базиране на *super ecliptic pHluorin* (-15.2 ± 0.9% ΔF/F; Слика 13б). Уношење ове мутације у пробу која се базира на *EGFP,* насупрот није довела до пораста у величини одговора (+0.5 ± 0.1 % ΔF/F; Слика 13б). Ови резултати упућују на закључак да су мутације присутне у *ecliptic pHluorin* неопходне да би *A227D* мутација имала ефекат. Такође, јасно је да ексцитациони спектар са два максимума који се налази у *ecliptic pHluorin* није неопходан за побољшање сензитивности пробе.

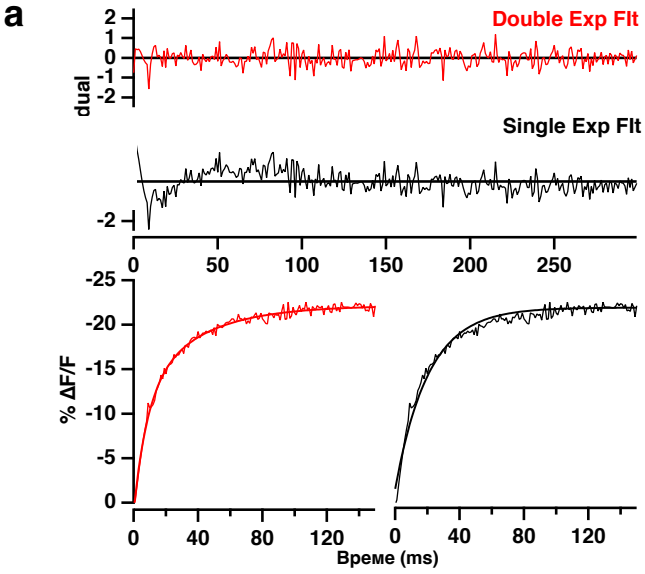
Анализа нивоа експресије двеју побољшаних проба је показала да су ћелије које експримирају пробу базирану на *super ecliptic pHluorin A227D* светлије од оних које експримирају пробу са *ecliptic pHluorin A227D* (3460 ± 609 AU, n = 12 ћелија са *super ecliptic pHluorin A227D* у односу на 373 ± 40 AU, n = 11 ћелија са *ecliptic pHluorin A227D*). Насупрот овом резултату су стопе избељивања ФП-а које нису показале значајну разлику у вредностима измереним у ове две тестиране пробе (~4.8% ± 0.8% ΔF/F, насупрот ~6.4% ± 0.7% ΔF/F током периода осветљавања ласерском светлошћу у трајању од 2s). Обзиром да смо закључили да су ћелије које експримирају пробу базирану на *super ecliptic pHluorin A227D* светлије од оних које експримирају пробу са *ecliptic pHluorin A227D,* за даљи

наставак студије смо одабрали ову пробу. ФП волтажни индикатор који садржи *super ecliptic pHluorin A227D* је назван *ArcLight*.

Мутација *A227D* није утицала на ниво експресије индикатора у ћелијској плазма мембрани нити на базални ниво интензитета флуоресценције у *HEK293* ћелијама. У покушају да се објасни овај феномен први корак је подразумевао тестирање општих фотофизичких карактеристика ФП и процену евентуалног утицаја промене у аминокиселинскм саставу ФП на њих. Експерименти који су изведени на пречишћеном мутираном и немутираном протеину нису показали разлику у ексцитационом или емисионом спектру или у pH сензитивности између ова два протеина (Слика 15). Однос између промене интензитета флуоресценције и промене волтаже (ΔF/ΔV) је остао непромењен у проби која саджи *A227D* мутацију. Као и већина до сада описаних *Ci-VS* проба (Lundby *et al*., 2008; Perron *et al*., 2009b), *ArcLight* индикатор показује однос флуоресценције према волтажи који се може описати сигмоидалном кривом (Слика 9в). Кинетика овог индикатора је такође слична динамици која се може наћи у већини других публикованих проба са брзином активације за +100mV тест пулсеве која се најбоље описује дуплом експоненцијалном кривом (Слика 9г и 16а). Измерене вредности за временске константе (tau, τ), износе ~10 ms за брзу компоненту и ~50 ms за спору компоненту (Слика 16б) што су вредности објављене за већину до сада описаних проба (Akemann *et al*., 2012).



Слика 15. Спектри побуђивања и емисије и pH сензитивност *super ecliptic pHluorin* и *super ecliptic pHluorin A227D*. а) Спектри побуђивања и емисије *super ecliptic pHluorin* (црна) и *super ecliptic pHluorin A227D* (црвена). Таласна дужина емисије кориштена за мерење побуђивања је 550 nm. Таласна дужина побуђивања кориштена за мерење емисије је 465 nm. б) Емисиони спектри *super ecliptic pHluorin* (лево) и *super ecliptic pHluorin A227D* (десно) у растворима различите pH вредности: 9.5 (љубичаста), 8.5 (плава), 7.5 (плаветна), 6.5 (зелена), 5.5 (наранџасто жута), 4.5 (наранџасто црвена) и 3.5 (црвена). в) Нормализован интезитет флуоресценције у односу према pH *super ecliptic pHluorin* (црна) и *super ecliptic pHluorin A227D* (црвена).

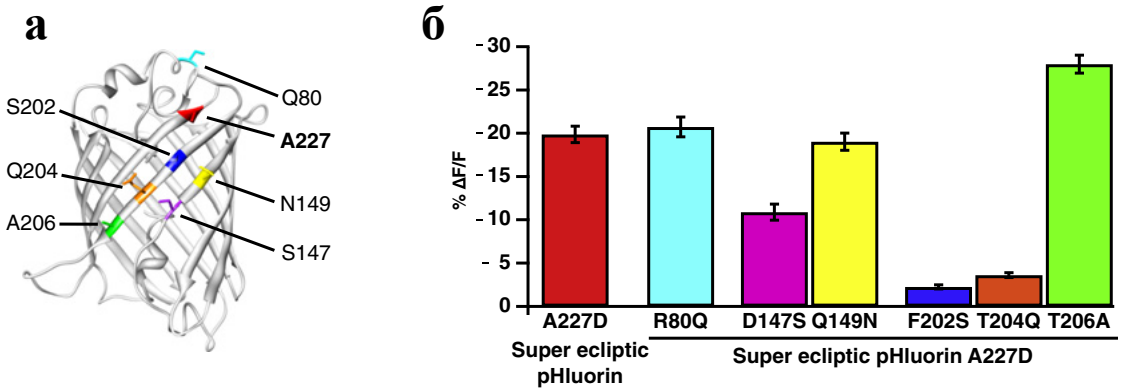


б

	On 1		On 2	Off 1		Off 2
	τ	Amplitude	τ	τ	Amplitude	τ
Ecliptic (A227D) S249	14 ± 2	0.68 ± 0.06	78 ± 28	27 ± 3	0.55 ± 0.04	72 ± 19
ArcLight S249	10 ± 1	0.63 ± 0.05	47 ± 4	19 ± 2	0.53 ± 0.09	62 ± 9
ArcLight Q239	9 ± 1	0.50 ± 0.03	48 ± 4	17 ± 1	0.79 ± 0.03	60 ± 7
ArcLight M240	10 ± 1	0.55 ± 0.03	52 ± 4	20 ± 1	0.68 ± 0.05	77 ± 11
ArcLight K241	12 ± 1	0.51 ± 0.04	51 ± 6	20 ± 1	0.83 ± 0.03	68 ± 10
ArcLight A242	10 ± 1	0.65 ± 0.03	53 ± 4	22 ± 1	0.70 ± 0.04	74 ± 4
ArcLight S243	9 ± 1	0.62 ± 0.03	44 ± 5	18 ± 1	0.68 ± 0.04	53 ± 9

Слика 16. Динамика ArcLight и других проба кориштених у овом раду је подешена употребом идеализованих криви описаних са једним или два експоненцијална фактора. а) Доле: Приказана су два примера оптичких записа који су резултат 100 mV деполаризационих пулсева (од -70 mV до 30 mV). Временски ток активације се може успешно подесити на криве описане са једним (црним, једначина 3) или са два (црвеним, једначина 3) експоненцијална фактора. Горе: Анализа показује да је подешавање на криву која се описује са два експоненцијална фактора прецизније у првих 100ms деполаризације. б) τ брзе и споре компоненте и релативне амплитуде за сваку компоненту (средња вредност ± *SEM)* израчунате на основу идеализоване криве описане са два експоненцијална фактора за следеће *CiVS* ФП волтажне индикаторе: *ecliptic pHluorin A227D* уграђен на позицији S249 (n=8), *ArcLight* (n=9), *ArcLight Q239* (n=6), *ArcLight M240* (n=8), *ArcLight K241* (n=7), *ArcLight A242* (n=6), *ArcLight S243* (n=7).

У намери да установимо који остаци амино киселина, поред мутације *A227D* доприносе повећаној осетљивости пробе направљене су додатни конструкти у којима су најважније амино киселине у *super ecliptic pHluorin* ФП-у промењене у аналогне амино киселине из *EGFP* (Слика 17а). Од ~238 амино киселина колико улази у састав зелено флуоресцентног протеина, *super ecliptic pHluorin* се разликује од *EGFP* у девет које заузимају следеће позиције: 80, 147, 149, 163, 175, 202, 204, 206, и 231 (Слика 14). Од ових девет амино киселина све сем једне (163), имају бочне ланце који су окренути ка споља на површини ФП-а, а многи од њих се налазе на истој страни бета буре (Слика 17а), као и *A227*. Појединачним мутацијама направљено је шест варијанти *ArcLight* конструката у којима су амино киселине из *super ecliptic pHluorin* замењене са онима из *EGFP: R80Q, D147S, Q149N, F202S, T204Q,* и *T206A* (Слика 17). Промена амино киселине аргинин у глутамин (*R80Q*) или глутамин у аспаргин (*Q149N*) је није показала утицај на сензитивност *ArcLight*-а. Промена *D147S* (аспартичне киселине у серин) је довела до великог пада у осетљивости пробе (-10.9 ± 0.9% ΔF/F) а још израженије смањење у величини сигнала је добијено при замени фенилаланина са серином (*F202S*; -2.3 ± 0.2 % ΔF/F) и треонина у глутамат (*T204Q*; -3.6 ± 0.3% ΔF/F) од којих је свака практично довела до елиминације одговора *ArcLight*-а (Figure 17б и 17 в). Једина мутација која је допринела порасту сигнала је промена треонина у аланин на позицији 206 (*T206A*) која доводи до просечне промене од ΔF/F -27.9 ± 1%.

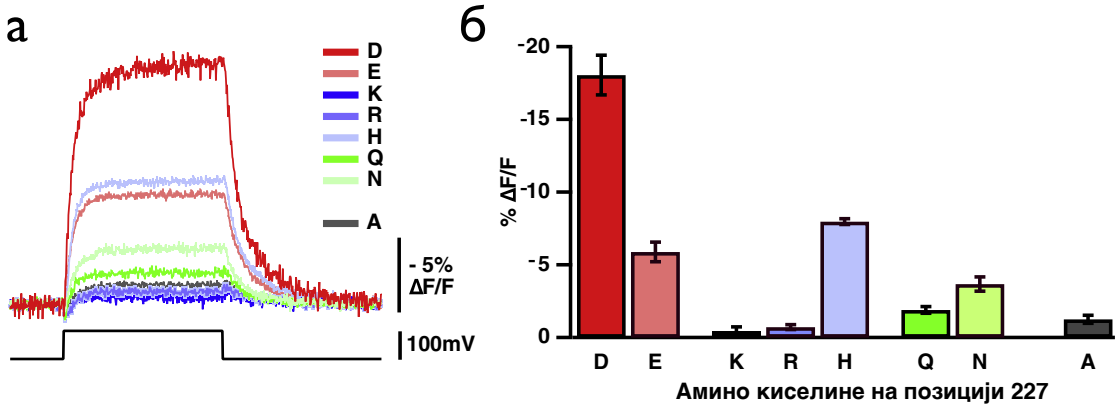


в

Мутација амино киселина у секвенци *super ecliptic pHluorin*	% ΔF/F (средња вредност ± SEM)
R80Q	- 20.7 ± 1.1
Q149N	-19.0 ± 1
D147S	-10.9 ± 0.9
F202S	-2.3 ± 0.2
T204Q	-3.6 ± 0.3
T206A	-27.9 ± 1
A227D	-18.1% ± 1.4

Слика 17. Модулаторни ефекат мутације A227D зависи од негативног наелектрисања на тој позицији и других остатака амино киселина који се налазе на површини ФП-а. Сви представљени одговори су изазвани +100mV волтажним пулсевима у *HEK293* ћелијама. а) Лево: 3D структура *EGFP* (*PDB* идентификација *1EMG*) у којој је приказана позиција аминокиселинских остатака у *super ecliptic pHluorin* (*ArcLight*) који су мутирани тако да одговарају онима који се налазе у *EGFP: Q80* (светло плава), *S147* (циклама), *N149* (жута), *S202* (плава), *Q204* (наранџаста), и *A206* (зелена). *A227D* мутација је обележена црвеним. Десно: фракциона промена у интезитету флуоресценције, % ΔF/F (средња вредност ± *SEM*), седам *CiVS* волтажних проба које садрже различите мутације у оквиру *super ecliptic pHluorin* који је уграђен на позицији *S249*. Ове модификације су мутације уоквиру *super ecliptic pHluorin (A227D)* на местима која су приказана у левом панелу. *ArcLight* (црвена, n = 10), *ArcLight* са појединачним мутацијама: *R80Q* (плаво зелена, n = 6), *D147S* (пурпурно црвена, n = 7), *Q149N* (жута, n = 6), *F202S* (плава, n = 8), *T204Q* (наранџаста, n = 8) и *T206A* (зелена, n = 6). По један покушај је снимљен у свакој ћелији, добијене максималне вредности су потом упросечени. в) Табеларни приказ резултата из графика под б.

Ми смо такође, истражили потенцијалну могућност да би замена *A227* (аланина) у *ecliptic pHluorin* са неком другом амино киселином, сем аспартичне киселине (*D*) могла да утиче на сензитивност пробе. У ту сврху су издизајниране пробе у којима се на позицији 227 налазе или амино киселине са јако киселим остацима (глутаминска киселина-E), или са поларним остацима а сличне у величини (глутамин-Q и аспарагин-N) или са позитивно наелектрисаним остацима хистидин (H), лизин (K) и аргинин (R). Глутаминска киселина је довела до повећања ΔF/F одговора у односу на аланин али је пораст био упола мањи у односу на пробу са аспартичном киселином на истој позицији (-5.9 ± 0.7% ΔF/F у односу на -1.3 ± 0.3%; Слика 18). Две амино киселине базних остатака (аргинин и лизин) на позицији 227 дале су пробе мале сензитивности -0.4 ± 0.2% ΔF/F, односно -0.7 ± 0.2% (Слика 18). Хистидин (H) резултује у проби која даје сигнал од -7.8 ± 0.2% ΔF/F, што је уједно највиши сигнал који је добијен после оног са аспартичном киселином (D) (18.1 ± 1.4 % ΔF/F). Глутамин (-1.9 ± 0.2% ΔF/F) или аспаргин (-3.7 ± 0.5% ΔF/F) су такође довели до побољшања у промени интензитета флуоресценције али ово побољшање је и даље мање у односу на оно које је постигнуто са асапартичном киселином (Слика 18). Ови резултати указују да је присуство негативно наелектрисане групе на позицији 227 неопходно за повећање у промени флуоресценције, али и да присуство само једног додатног угљениковог атома који је присутан у глутаминској киселини доводи до смањења овог ефекта. Замена *A227* са амино киселинама поларних остатака (хистидин, глутамин или аспарагин) такође доводи до повећања сигнала али је овај ефекат мањи од оног који изазива аспартична киселина (Слика 18). Ови резултати показују да су за овај ефекат значајни како наелектрисање тако и величина аминокиселинских остатака.

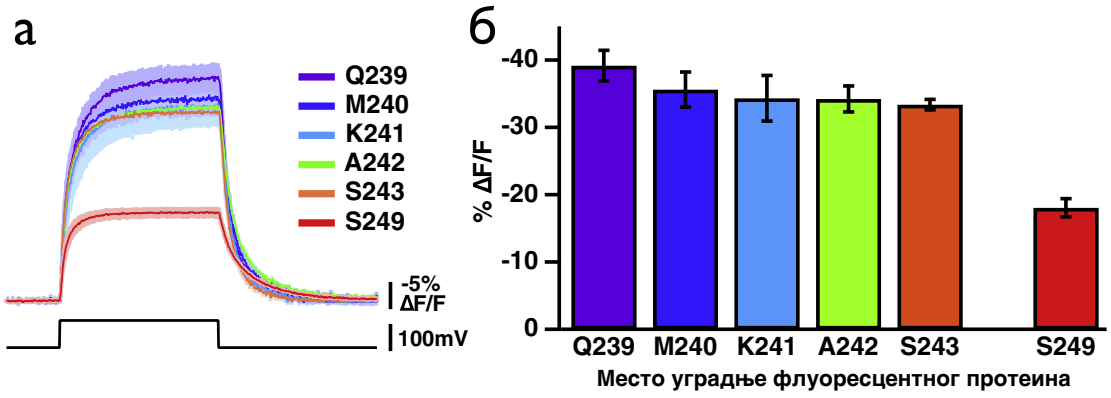


в

Амино киселина на позицији 227 у секвенци *ecliptic pHluorin*	% ΔF/F (средња вредност ± SEM)
аспартична киселина (D)	-18.1 ± 0.3
глутаминска киселина (E)	-5.9 ± 0.7
лизин (K)	-0.7 ± 0.2
аргинин (R)	-0.4 ± 0.2
хистидин (H)	-7.8 ± 0.2
глутамин (Q)	-1.9 ± 0.2
аспаргин (N)	-3.7 ± 0.5
аланин (A)	-1.3 ± 0.3

Слика 18. Модулаторни ефекат мутације A227D зависи како од наелектрисања тако и величине аминокиселинских остатака. а) Упросечени оптички записи добијени тестирањем *CiVS-ecliptic pHluorin* и седам проба које су мутанти који носе различите аминокиселинске остатке на позицији 227 у оквиру ФП-а. *CiVS-ecliptic pHluorin* (A, сива, n = 9). Појединачне мутације на позицији 227: *A227D* (црвена, n = 6), *A227E* (роза, n = 8), *A227K* (тамно плава, n = 4), *A227R* (светлије плава, n = 8), *A227H* (светло плава, n = 6), *A227Q* (зелена, n = 5), или *A227N* (светло зелена, n = 9). Десет покушаја је упросечено за сваку ћелију а потом су тако добијени записи за појединачне ћелије упросечени. б) и в) Графички и табеларни преглед максимума % ΔF/F (средња вредност ± *SEM*) проба представљених под а.

Из ранијих студија које су се бавиле развојем протеинских волтажних индикатора (Baker *et al*. 2008; Lundby *et al*., 2008) познато је да промена локације уградње ФП дуж аминокиселинске секвенце која повезује *CiVS* и фосфатазу може довести до промене у величини сигнала или брзини одговора пробе. Са намером да испитамо стабилност повишене волтажне сензитивности у односу на место уградње ФП уоквиру волтажног индикатора пет нових конструката је направљено у којима је *super ecliptic pHluorin A227D* уграђен ближе C4 домену *CiVS*-а, и то после амино киселина *Q239, M240, K241, A242*, или *S243* (Слика 19). Волтажни индикатори у којима је ФП уграђен после амино киселина *Q239, M240, K241, A242,* и *S243* су, за 100mV деполаризациони тест пулс, дали сигнале од -39.2 ± 2.3%, -35.6 ± 2.6%, -34.3 ± 3.3%, -34.2 ± 1.9% и -33.4 ± 0.8% редом (Слика 19). Дакле, велика побољшање у величини сигнала која су добијена овом мутацијом нису ограничена на специфичне локације уградње ФП дуж линкер сегмента. Из ових експеримената је евидентно да је чак и веће побољшање у сензитивности пробе добијено померањем ФП ближе ка C4 домену.



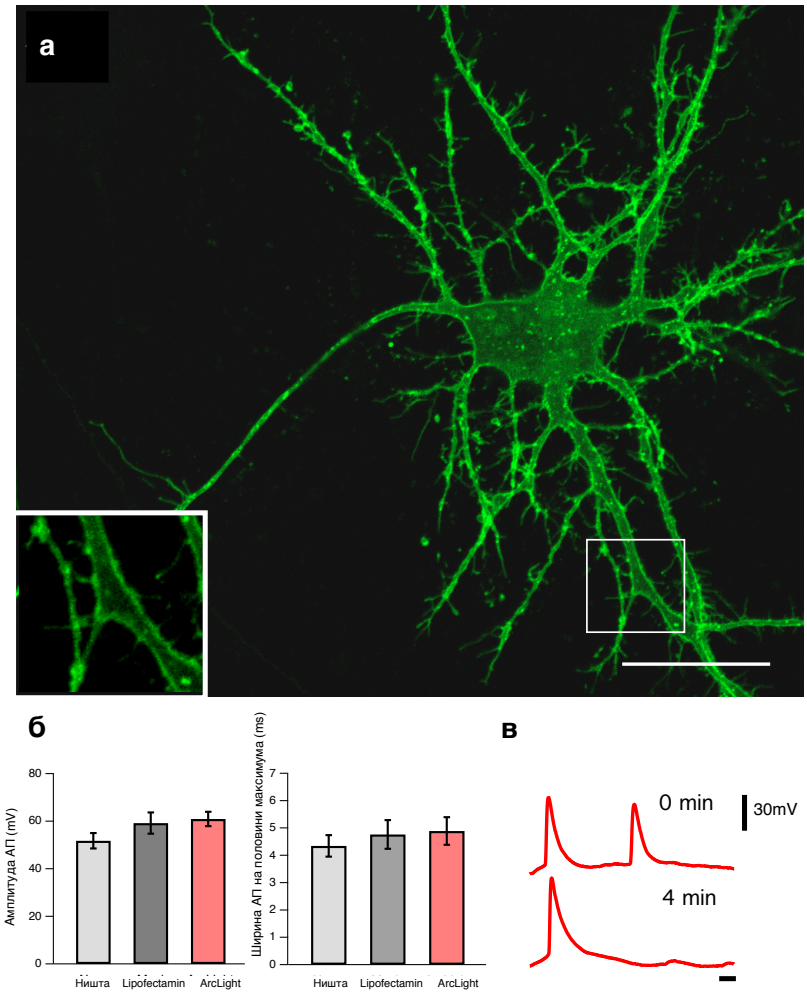
в

Амино киселина у секвенци *CiVS*	% ΔF/F (средња вредност ± SEM)
Q239	-39.2 ± 2.3
M240	-35.6 ± 2.6
K241	-34.3 ± 3.3
A242	-34.2 ± 1.9
S243	-33.4 ± 0.8

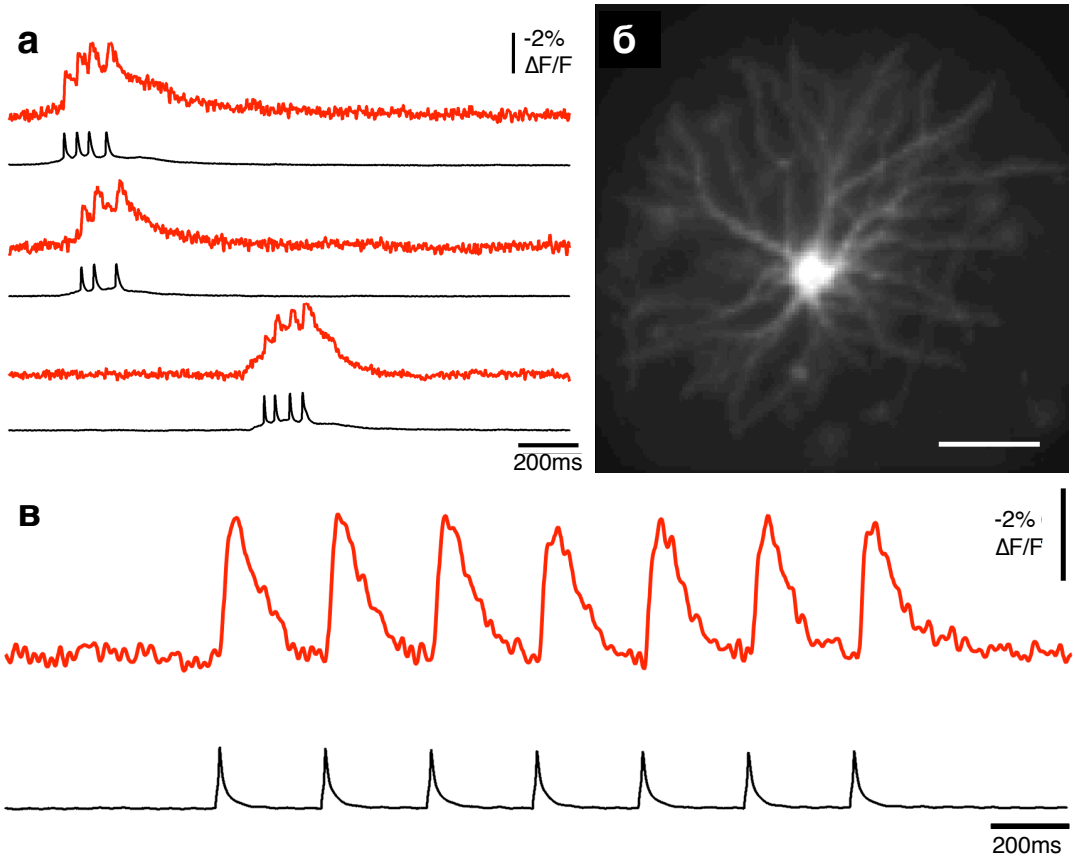
Слика 19. Утицај места уградње ФП уоквиру волтажног индикатора на модулаторни ефекат мутације A227D. а) Упросечени оптички записи добијени за *ArcLight* и *ArcLight*-изведене пробе са *super ecliptic pHluorin A227D* помереним на различите локације уоквиру *CiVS*: *ArcLight Q239* (љубичаста, n = 7), *ArcLight M240* (тамно плава, n = 8), *ArcLight K241* (плаво, n = 7), *ArcLight A242* (зелена, n = 7), *ArcLight S243* (наранџаста, n = 7), и *ArcLight (S249*; црвена, n = 10). По један покушај је снимљен у свакој ћелији, овако добијени оптички записи су потом упросечени. б) и в) Графички и табеларни преглед максимума % ΔF/F (средња вредност ± *SEM*) проба представљених под а.

Иницијално тестирање нивоа експресије и дистрибуције *ArcLight* пробе у примарним културама неурона је урађено применом конфокалне микроскопије (Слика 20а). Експресија пробе у хипокампалним неуронима миша у култури *in vivo* је дала светлу флуоресценцију која је присутна у соми и у дендритима (Слика 20а). У дендритима је приметно да је флуоресценција углавном мембрански локализована (Слика 20а). Потенцијални ефекат експресије пробе на побудљивост неурона је истражен поређењем појаве спонтаних акционих потенцијала у нетрансфекованим, лажно-трансфекованим и *ArcLight*-трансфекованим неуронима. У све три групе неурони нису показали статистички значајну разлику у ширини и амплитуди нервних импулса наводећи нас на закључак да експресија пробе не доводи до значајних промена у побудљивости неурона (Слика 20б). Експресија пробе не доводи до повишене фототоксичности обзиром да је појаву спонтаних нервних импулса чије се карактеристике нису мењале било могуће детектовати и после 4 минута (најдужи тестирани период) ексцитације (Слика 20в).

Упркос релативно спором одговору индикатора који је измерен при тестирању у *HEK293* ћелијама (fast τ~10 ms), спонтане (Слика 21а) и провоциране (Слика 21в) нервне импулсе је било могуће детектовати у неуронима који експримирају *ArcLight* пробе. Измерене су промене у интензитету флуоресценције које се крећу у распону од -1 до -5% $\Delta F/F$ (-3.2% ± 2.2%, n = 20 ћелија). Као што се и дало очекивати на основу измерених вредности за брзину пробе ова $\Delta F/F$ је нижа у односу на резултате добијене при тестирањима са пулсевима дужег трајања која с рађена у *HEK293* ћелијама (Слике 13 и 17). Сличне вредности су добијене приликом тестирања у којима је снимана активност у *HEK293* ћелијама као одговор на волтажне тест пулсеве који имају карактеристике акционих потенцијала (Слике 22). Спора кинетика пробе је разлог и што се при провоцираним високо-фреквентним електричним активностима флуоресценција не враћа на базални ниво између појединачних акционих потенцијала (Слика 21а). Ипак, и у овом случају било је могуће јасно детектовати појединачне акционе

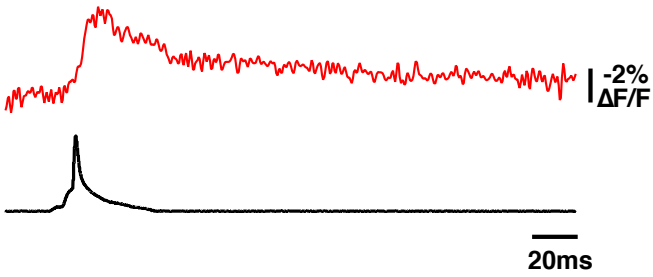


Слика 20. Нервна ћелија која експримира *ArcLight Q239* пробу снимљена уз употребу конфокалне микроскопије а експресије пробе не доводи до промене у амплитуди и трајању нервних импулса. а) Увеличано: увећани приказ уоквиреног дела ћелије који показује мембранску експресију *ArcLight Q239* у дендритима. Линија = 10 µm. Одсуство ефекта експресије пробе на амплитуду или ширину нервних импулса измерена на половини максималне вредности за амплитуду. б) Лево: Амплитуда спонтаних нервних импулса (средња вредност ± *SEM*) снимљених методом наметнуте струје на целу ћелију у хипокампалним неуронима миша гајеним *in vitro*: нетрансфековани (49 нервна импулса у 6 неурона), лажно трансфековани (изложени *Lipofectamine 2000*; 27 нервна импулса у 5 неурона) и *ArcLight Q239* или *A242* трансфековани неурони (91 нервна импулса у 16 неурона). Десно: Ширина нервних импулса (средња вредност ± *SEM*) измерена на половини максималне амплитуде у хипокампалним неуронима миша гајених *in vitro*. в) Облик спонтаних нервних импулса у *ArcLight Q239* трансфекованим хипокампалним неуронима миша гајених *in vitro* нису значајно промењени ласерском илуминацијом у трајању од 4 мин. Линија временске скале је 5 ms.

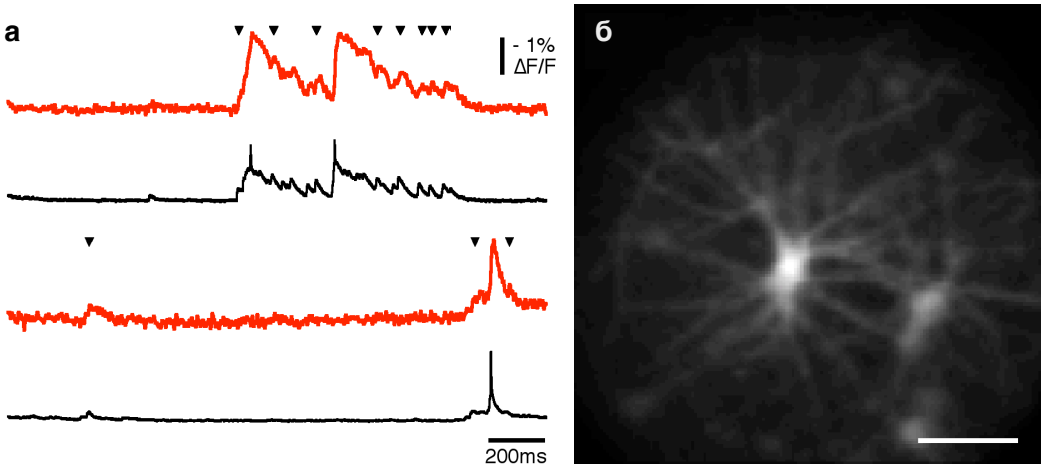


Слика 21. Праћење нервних импулси у нервним ћелијама помоћу *ArcLight Q242* пробе. а) Приказан је пример записа добијеног снимањем спонтаних нервних импулса у нервној ћелији приказаној под (б). Сви оптички записи су кориговани за ефекат избељивања ФП-а и филтрирани применом *Kaiser-Bessel 30* филтера. б) 80 x 80 депикселизована слика неурона чија је активност представљена под (а). Линија: 50 µm. в) Оптички и волтажни запис изазваних нервних импулса у неурону који експримира *ArcLight A242* пробу.

потенцијале. У поређењу са акционим потенцијалима дужи подпражни електрични догађаји мање амплитуде (највероватније ексцитаторни постсинаптички потенцијали) су лакши за детекцију и њих је неколико варијанти *ArcLight* проба, укључујући *ArcLight Q239* и *A242* успешно детектовало (Слика 23 и 24а). Електрична активност у нервним мрежама кортекса се базира на два типа сигнала: потпражним потенцијалима (рефлектују синаптички унос информација у дендрите) и супрапражним нервним импулсима (формирају реакцију нервних ћелија) (Grinvald *et al*., 2010). У складу са добром мембранском локализацијом

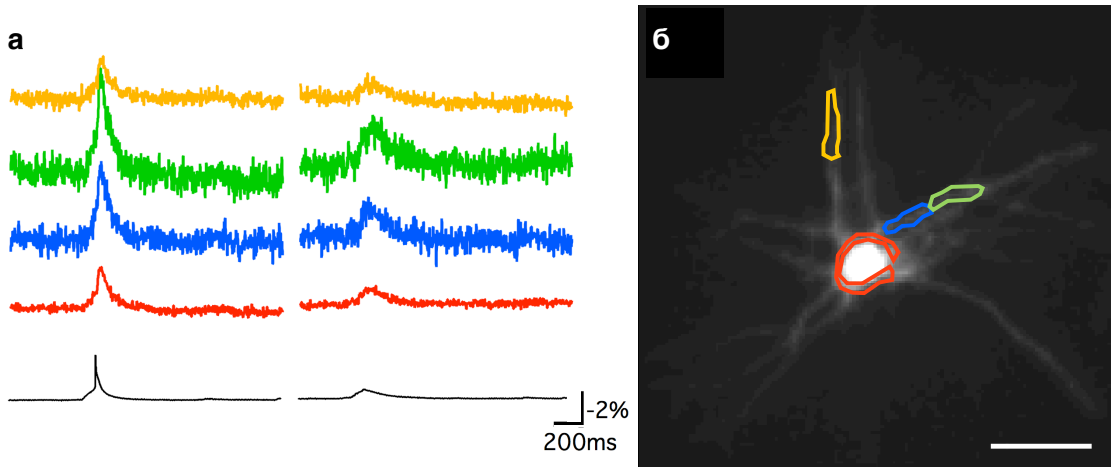


Слика 22. Флуоресцентни одговор који производи *ArcLight A242* експримиран у *HEK293* ћелији на деполаризационе промене које имају форму нервних импулса. Горњи запис је промена флуоресценције на пулс који има форму појединачног акционог потенцијала примењен на *HEK293* ћелију која експримира *ArcLight A242.* Доњи запис је волтажни пулс који је издвојен из спонтаних нервних импулса снимљених у хипокампалним неуронима. У флуоресцентном сигналу је урађена корекција за ефекат избељивања ФП-а.



Слика 23. Праћење подпражних деполаризација у нервним ћелијама помоћу *ArcLight Q239* пробе. а) Приказан је пример записа добијеног снимањем спонтане подпражне активности и нервних импулса у нервној ћелији приказаној под (б). Сви оптички записи су кориговани за ефекат избељивања ФП-а и филтрирани применом *Kaiser-Bessel 30* филтера. Стрелице указују на деполаризације (вероватно ЕПСП) које су изазвале видљиве промене у оптичком сигналу. б) 80 x 80 депикселизована слика неурона чија је активност представљена под (а). Линија: 50 μm.

која се може видети у дендритима, појединачни деполаризациони догађаји до којих долази при појави акционих потенцијала и подпражних догађаја су били лако уочљиви у дисталним дендритским сегментима при снимању са *ArcLight Q239* (Слика 24).

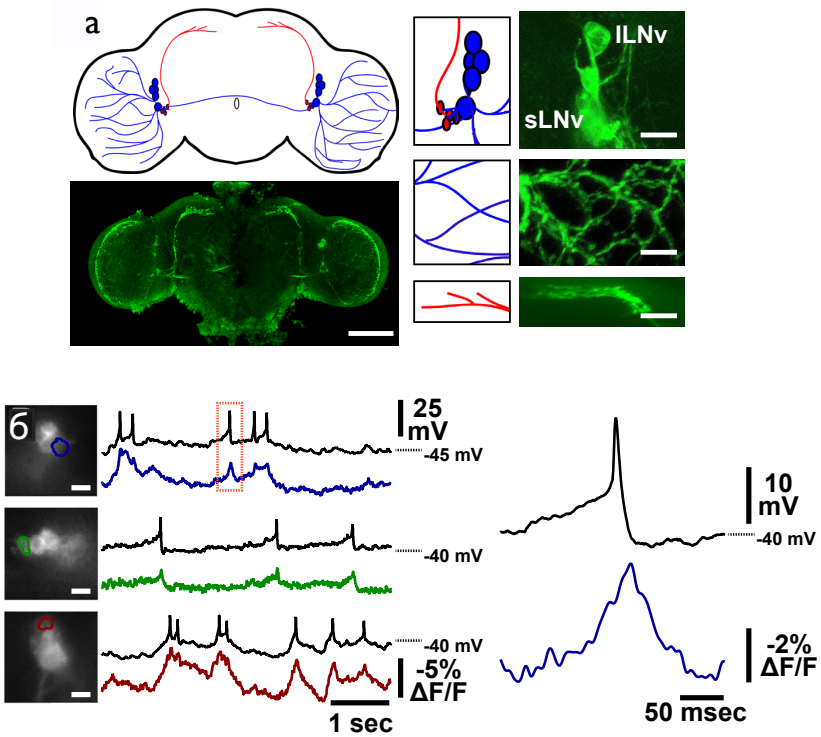


Слика 24. Праћење подпражних догађаја и нервних импулса у ћелијском телу и дендритима у нервној ћелији помоћу *ArcLight Q239* пробе. а) Приказан је пример записа добијеног снимањем нервниог импулса (леви панел) и подпражних догађаја (десни панел) са четри локације у нервној ћелији приказаној под (б). Оптички записи (обојени): %ΔF/F из области од интереса у истој боји под (б); запис снимљен електродом пласираном у ћелијско тело неурона. Сви оптички записи су кориговани за ефекат избељивања ФП-а и филтрирани применом *Kaiser-Bessel 30* филтера. б) 80 x 80 а слика неурона чија је активност представљена под (а), обележени региони су упросечени чиме су добијени записи приказани под (а). Линија: 50 μm.

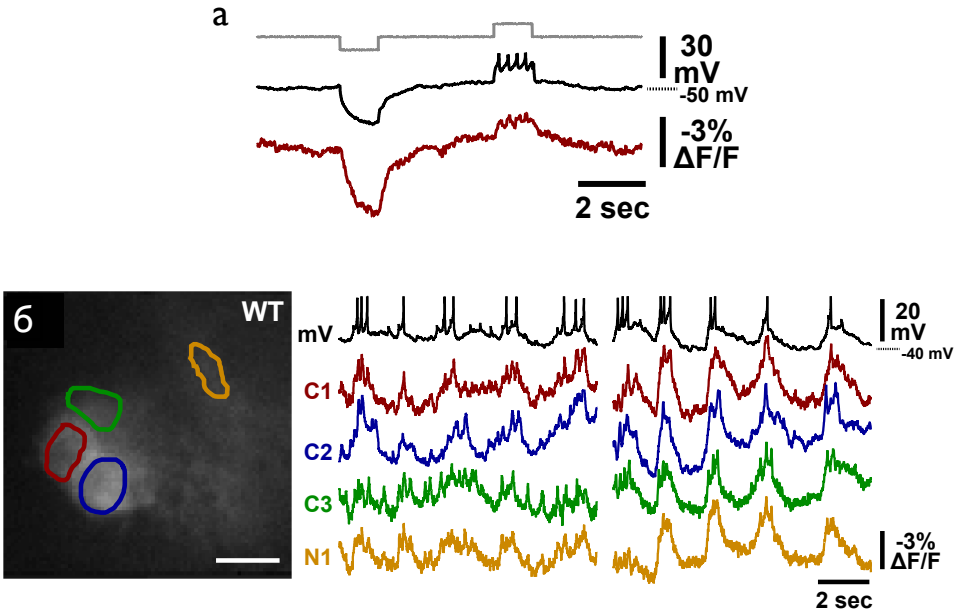
И док су до данас бројни генетички-кодирани волтажни индикатори описани (Baker *et al*., 2008; Kralj *et al*., 2011; Mutoh *et al*., 2012), за ниједан од ових индикатора се није показало да је погодан за рутинску употребу у оптичким снимањима спонтаних промена мембранског потенцијала у интактном мозгу. Специфична експресија *ArcLight*-а у бочно-вентралним циркадијаним сат неуронима (LNvs) у мозгу винске мушице (*Drosophila melanogaster)* је постигнута применом *GAL4/UAS* бинарног експресионог система. Ови неурони су кључни

даваоци темпа (*pacemakers*) контролог кола за циркадијану активност и есенцијали су за правилно одржавање временске активности (Nitabach and Taghert, 2008). И док су неки аспекти електрофизиолошке активности ових неурона детаљно истражени употребом метода наметнуте волтаже/струје на целу ћелију (Cao and Nitabach, 2008; McCarthy *et al*., 2011), многи детаљи о њиховој физиологији остају недоступним за истраживања у којима се користе на електродама-базиране методе. *ArcLight* је експримиран у ћелијским телима, нервним наставцима и дисталним пептидо-секреторним завршецима како великих, тако и малих *LNv* неуронима (*lLNvs* и *sLNvs*; Слика 25а). У студији је кориштен *in situ* препарат целог мозга за експерименте у којима је комбинација метода наметнуте волтаже/струје на целу ћелију и оптичког сликања омогућила симултано снимање електрофизиолошких и оптичких сигнала у мозгу мушице. Симултано снимање методом наметнуте струје на целу ћелију и снимање флуоресценције великом брзином (500Hz) показују да *ArcLight* поуздано прати спонтане подпражне догађаје и нервне импулсе у *lLNvs*, при чему деполаризација изазива смањење а хиперполаризација пораст у интензитету флуоресценције (Слика 25б), као што је претходно показано у сисарским неуронима. Подпражни догађаји и акциони потенцијали снимљени електрично одговарају спорим и брзим променама у флуоресценцији *ArcLight*-а што се може видети у сваком од овде приказана три репрезентативна симултана оптичко-електрична мерења. Нервни импулси у ћелијским телима *lLNvs* су јасно оптички уочљиви упркос чињеници да имају врло малу амплитуду (<20 mV), што је случај и са већином других неурона *Drosophila*-е за које је било могуће добити податке применом метода наметнуте струје на целу ћелију. *ArcLight* поуздано прати како деполаризационе тако и хиперполаризационе промене у мембрани неурона (Слика 25б и Слика 26), те тако омогућава оптичку детекцију инхибиторних синаптичких потенцијала.

Да би детаљније проучили однос између мембранског потенцијала и флуоресценције *ArcLight-а* у интактном мозгу мушице методом наметнуте волтаже на целу ћелију на *ArcLight*-експримирајуће *lLNvs* примењен је низ



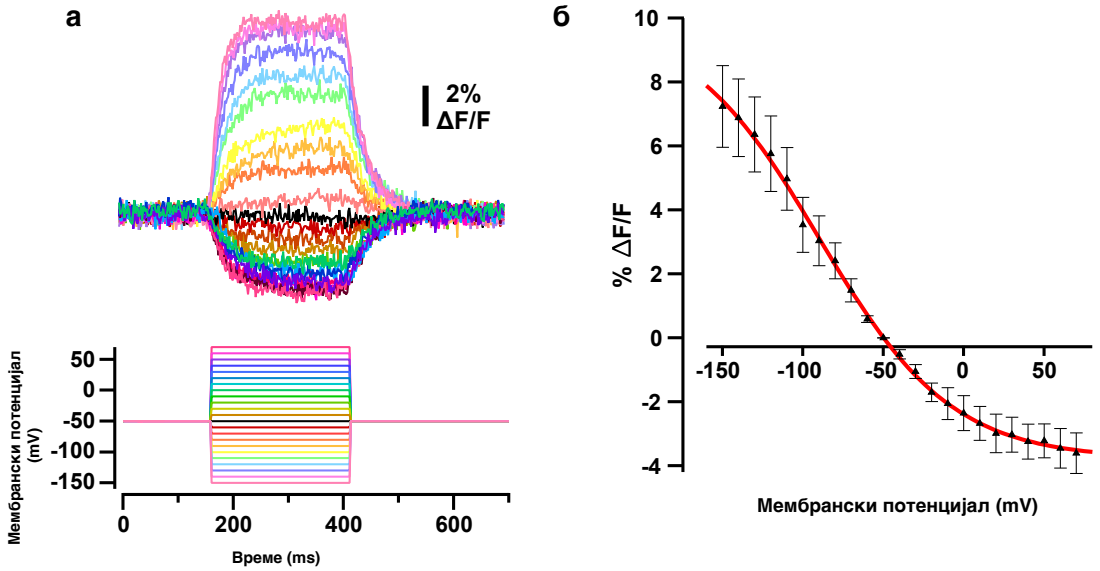
Слика 25. Оптичко снимање подпражне активности и нервних импулса у интактном нервном колу помоћу *ArcLight* пробе. а) Шематски приказ експресије *ArcLight* у бочно-вентралним сат неуронима (*lateral ventral clock neurons-LNVs*) *Drosophila melanogaster* је горе лево. Велики *LNVs (lLNVs)* и њихови наставци су приказани плавим, а мали *LNVs (sLNVs)* и њихове дорзомедијалне пептосекреторне терминалне пројекције (dorsomedial peptidergic terminal projections) су црвене. Приказане су слике добијене конфокалном микроскопијом уз имунохистохемијско бојење целог мозга (доле, лево), *LNV* ћелијских тела (горе, десно), *lLNV* нервни наставци у оптичком лобусу (средина, десно), и *sLNV* дорзомедијални пептосекреторни наставци (доле, десно). Линије = 100μm са леве стране, 10μm са десне стране. б) Дата су три примера симултаног снимања методом наметнуте струје на целу ћелију и оптичког снимања *lLNvs in situ* у препарату целог мозга. Лево су приказани примери 80x80 депикселизованих слика за сваки запис са обележеним регионима где се налази неурон чија је активност снимана и електрично; црним су обележени записи електричне активности, а обојеним записи оптичких сигнала. Увеличани приказ уоквиреног региона приказаног десно. Све линије: 10μm. Приказана су три примера од укупно осам колико је урађено.



Слика 26. Оптичко снимање провоциране и спонтане нервне активности у интактном нервном колу помоћу *ArcLight* пробе. а) Симултано снимање методом наметнуте струје на целу ћелију и оптичким снимањем *lLNvs* у препарату целог мозга уз примену пулса хиперполаризационе и деполаризационе струје од 10 pA. Струја је приказана сивим, запис добијен из електроде је црн, *ArcLight* оптички сигнал је црвен. Пример представља седам урађених експеримената. б) Оптички снимак ћелијских тела неколико неурона (C1-3) и једног наставка (N1) показује синхронизовану мембранску активност у *wild-type lLNVs*. Региони са којих је мерена активност су уоквирени бојом која одговара боји оптичког записа, при чему је запис електричне активности који одговара ћелији обележеној црвеним приказан црним. Ово је пример од осам урађених експеримената.

волтажних пулсева при чему је мерена промена у интезитету флуоресценције (Слика 27, једначина 4). Промена флуоресценције у односу на промену потенцијала је мерена уз примену 2 μM TTX како би се утишали нервни импулси и синаптички потенцијали. Интересантно је да је Болцманова крива донекле померена у лево у односу на исту добијену тестирањем пробе у *HEK293* ћелијама (Слика 13в), наглашавајући већу промену у флуоресценцији која настаје при

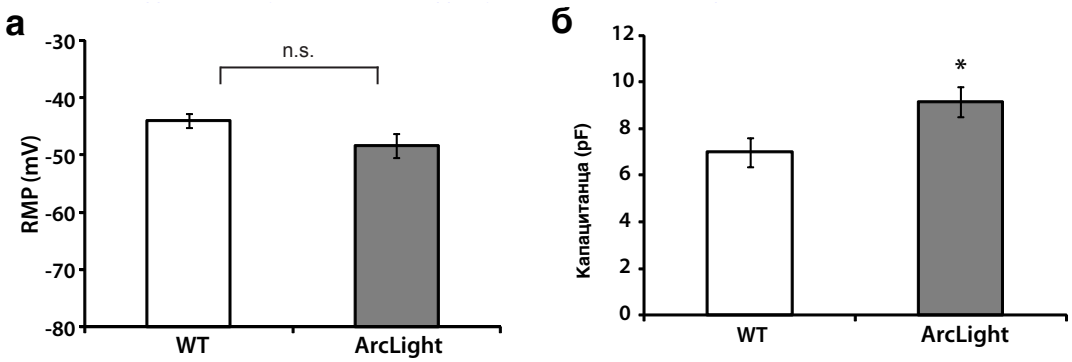
хиперполаризацији него при деполаризацији (Слика 26а). Ова разлика у волтажној осетљивости *ArcLight*-а је највероватније последица разлике у липидном саставу плазма мембране између ова два типа ћелија (Villalba-Galea *et al*., 2009a).



Слика 27. Болцманова крива описује промену у флоресценцији *ArcLight* у односу на промену мембранског потенцијала. Крива је добијена на основу праћења активности *lLNvs* ћелија уз примену методе наметнуте волтаже на целу ћелију. Снимање активности ћелија је урађено у препарату целог мозга и уз примену 2 μM TTX како би се утишали нервни импулси и синаптички потенцијали. а) *ArcLight* оптички сигнали из репрезентативне ћелије и одговарајући протокол који се састојао од низа хиперполаризујућих и деполаризујућих пулсева, ћелија је држана на потенцијалу од -50 mV. б) Болцманова крива је добијена на основу упросечених оптичких одговора добијених из пет *lLNVs* ћелија које експримирају *ArcLight* (средња вредност ± *SEM*).

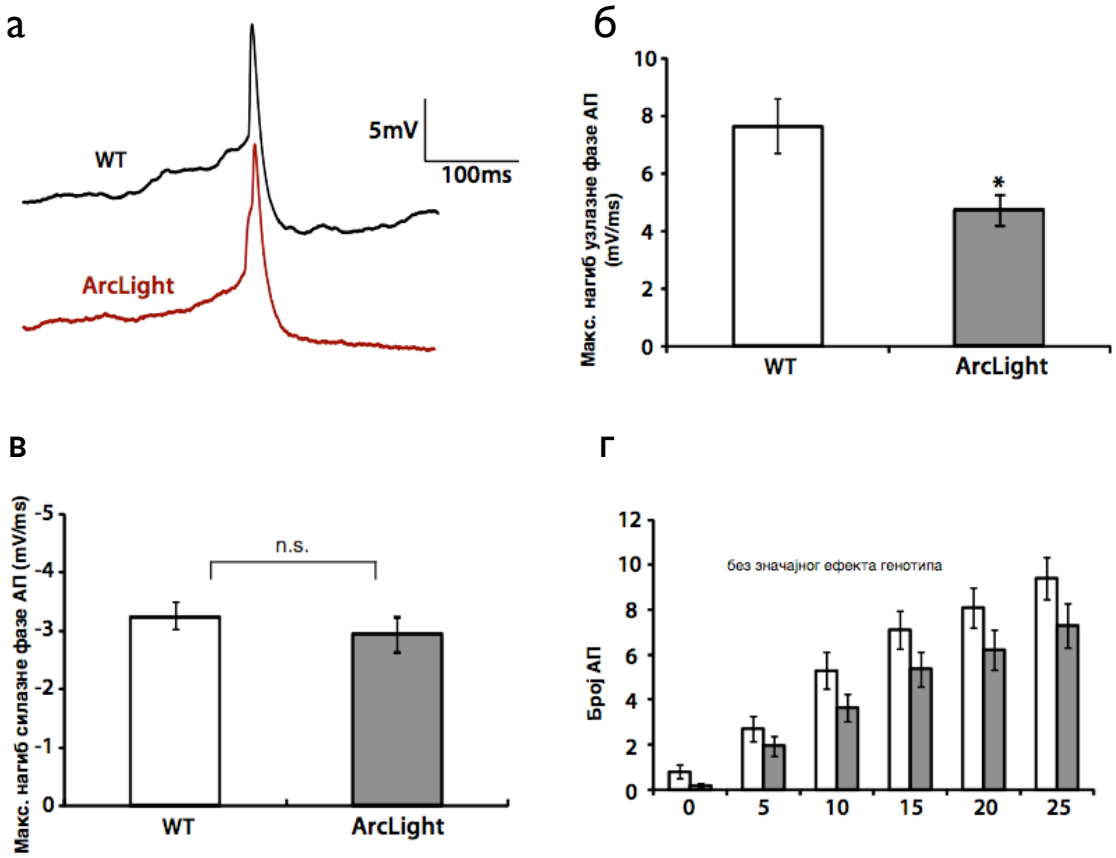
Обзиром на могућност да експресија *ArcLight* пробе може да доведе до пораста у електричној капацитанци ћелијске мембране и тиме промени физиолошке особине ћелије (Sjulson and Miesenböck, 2008), изведен је низ биофизичких тестова на *ArcLight*-експримирајућим *lLNvs* (Слика 28, Слика 29 и Слика 30).

Просечна измерена вредност за потенцијал мировања (RMP) је -48.4 ± 2.1 mV (n=17) у *ArcLight*-експримирајућим *lLNvs* и - 44.0 ± 1.2 mV (n= 10) у контролним *lLNVs* (Слика 28а), што не показује статистички значајну разлику (p=0.15, неупарени Студентов т-тест). Мембранка капацитанца (Слика 28б) у *ArcLight*-експримирајућим *lLNvs* је 9.15 ± 0.66 pF (n=25), што је статистички значајно више у односу на вредности добијене за контролне lLNVs (7.0 ± 0.63 pF, n=12) ($p < 0.05$, неупарени Студентов т-тест).



Слика 28. Процена утицаја експресије *ArcLight*-а на биофизичке карактеристике мембране *lLNVs* је вршена поређењем са контролним ћелијама које експримирају ФП цитоплазматично. Сви подаци су представљени као средња вредност ± *SEM*. а) Потенцијал мировања мембране (RMP) *lLNVs* је мерен методом наметнуте струје на целу ћелију. б) Капацитанца мембране *lLNVs* је мерена тако што су на ћелију примењивани хиперполаришући волтажни пулсеви применом метода наметнуте волтаже на целу ћелију и мерењем временске константе резултујуће мембранске струје подешавањем на експоненцијалну криву објашњену са једним фактором.

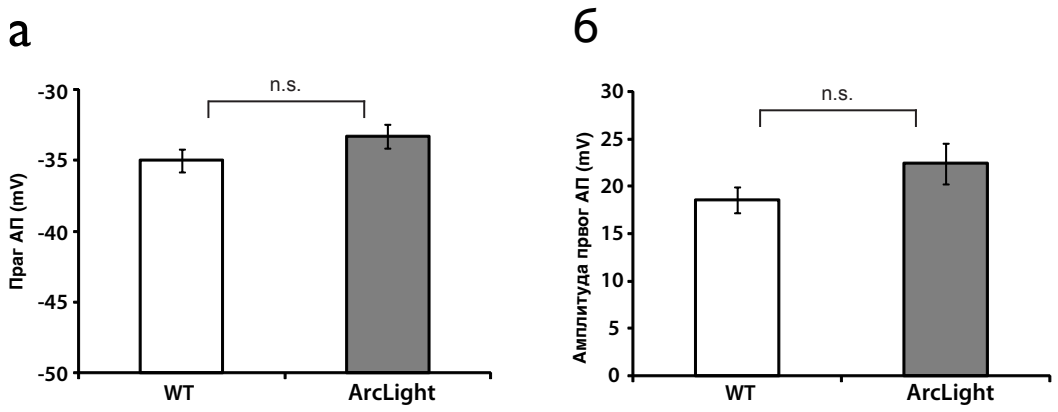
Максималан нагиб узлазне фазе нервних импулса (Слика 29б) износи 7.52 ± 0.93 mV/ms (n=10) у *ArcLight*-експримирајућим *lLNvs* и 4.58 ± 0.51 mV/ms (n=10) у контроли, што показује статистички значајну разлику ($p < 0.05$, неупарени Студентов т-тест). Максимални нагиб силазне фазе нервног импулса (Слика 29в)



Слика 29. Процена утицаја експресије *ArcLight*-а на карактеристике нервних импулса у *lLNVs* је вршена поређењем са контролним ћелијама које експримирају ФП цитоплазматично а) Репрезентативни записи спонтаних нервних импулса (APs) снимљених у *ArcLight*-експримирајућим (црвена) и контролним (црна) *lLNVs*. б) Поређење максималаног нагиба узлазне фазе акционих потенцијала у *ArcLight*-експримирајућим (n=10) и контролним *lLNVs* (n=10), показује значајну статистичку разлику ($p < 0.05$). в) Поређење максималаног нагиба силазне фазе акционих потенцијала у *ArcLight*-експримирајућим *lLNVs* (n=11) и у *WT* (n=10) неуронима не показује значајну разлику ($p = 0.48$). г) Активност је изазвана применом 500ms струјних пулсева јачине -10 до +25 pA при чему су пулсеви појачавани у корацима од 5pA, број изазвани нервних импулса је квантификован.

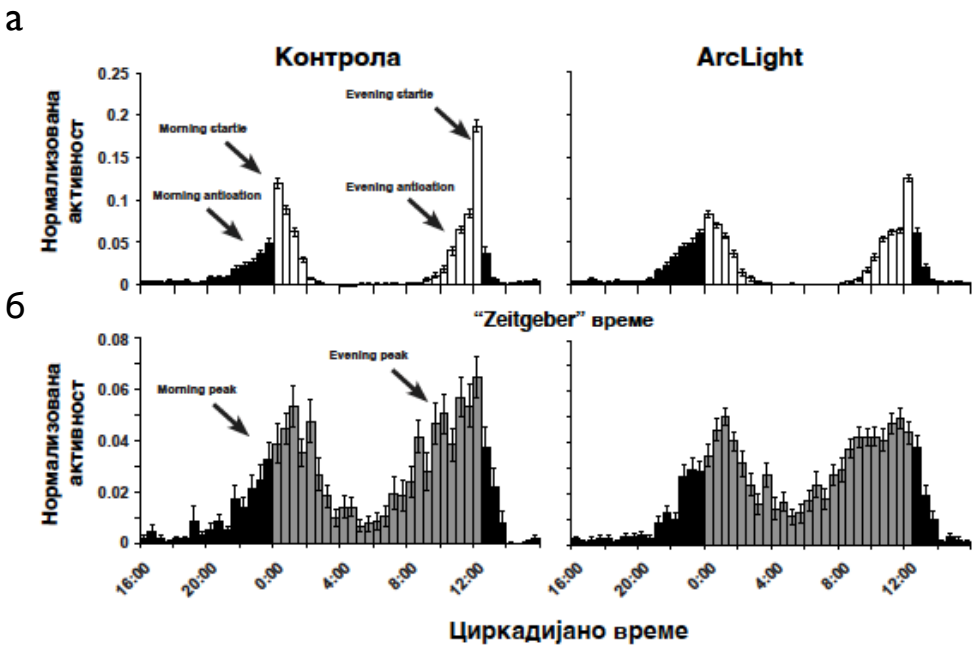
је -3.21 ± 0.23 mV/ms у *ArcLight*-експримирајућим *lLNvs* (n=11) и 2.92 ± 0.32 mV/ms у WT (n=10), што није значајно различито (p=0.48, неупарени Студентов т-тест). Активност је изазвана применом 500ms струјних пулсева јачине -10 до +25 pA при чему су пулсеви појачавани у корацима од 5pA, број изазвани нервних импулса је квантификован (Figure 29г). Нема статистички значајне разлике између броја изазваних акционих потенцијала између *ArcLight*-експримирајућим *lLNvs* (n=11) и контролних lLNvs (n=10) (p = 0.132, двофакторска ANOVA).

Праг акционих потенвијала (Слика 30а) износи -33.3 ± 0.84 mV у *ArcLight*-експримирајућим *lLNvs* (n=11) и -35.0 ± 0.80 mV у контроли (n=10), што статистички није значајна разлика (p = 0.185, неупарени Студентов т-тест). Просечна амплитуда (Слика 30б) првог изазваног нервног импулса је 22.43 ± 2.13 mV *ArcLight*-експримирајућим *lLNvs* (n=11) и 18.57 ± 1.40mV у контролним (n=10), што статистички није значајна разлика (p = 0.19, неупарени Студентов т-тест).



Слика 30. Утицај експресије *ArcLight*-а на осетљивост мембране у *lLNVs* у поређењу са контролним ћелијама које експримирају ФП цитоплазматично а) Праг нервних импулса је дефинисан као мембранска волтажа на почетку брзог узлазног нагиба нервног импулса који је изазван убризгавањем струје у *ArcLight*-експримирајући *lLNVs* (n=11) и у контроле (n=10), није показана статистички значајна разлика (p = 0.185). б) Просечне амплитуде првог струјом-изазваног нервног импулса у *ArcLight*-експримирајући *lLNVs* (n=11) и у контроле (n=10).

Мушице које експримирају *ArcLight* у *LNVs* показују нормалне дневне шеме у локомоторној активности у условима 12h:12h светло:мрак. Ово укључује и предвиђене јутарње и вечерње скокове у активности који претходе паљењу и гашењу светла, као и јутарње повећање активности као одговор на паљење светла и вечерње смањење активности у одговору на гашење светла (Слика 31а). Мушице које експримирају ArcLight у LNVs показују нормалну циркадијану шему активности током првог дана у условима константног мрака након прелаза из услова 12h:12h светло:мрак. Ово важи и за јутарње и вечерње максимуме у активности који су вођени циркадијаном контролном мрежом и који су показатељ нормалног рада *LNVs* и њихове способности да комуницирају са другим сат неуронима у циркадијаној контролној мрежи (Слика 31б).

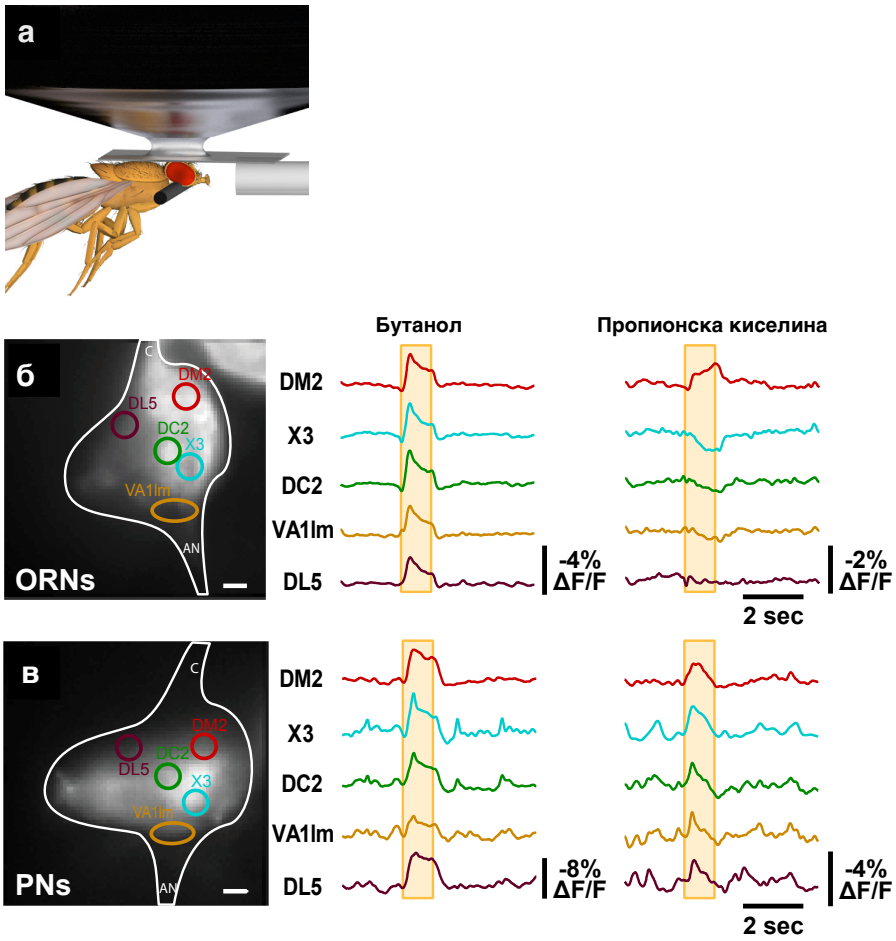


Слика 31. Дневна и циркадијана локомоторна активност мушких мушица које експримирају или *ArcLight* (n=29) или за мембрану везани CD4-GFP као негативна контрола (n=30) у LNVs ћелијама. а) Мушице које експримирају *ArcLight* у *LNVs* показују нормалне шеме дневне локомоторне активности при 2h:12h светло:мрак условима (бело = светло; црно = мрак). б) Мушице које експримирају *ArcLight* у *LNVs* показују нормалну циркадијану шему активности током првог дана у условима константног мрака након прелаза из услова 12h:12h светло:мрак (сива = субјективан дан; црно = субјективна ноћ).

Иако експресија *ArcLight* у *lLNVs* доводи до статистички значајног повећања капацитанце мембране и промена у кинетици нервних импулса (у поређењу са контролним ћелијама које експримирају ФП у цитоплазми) ове промене не утичу значајније на способност функционалне обраде информација у овим ћелијама. Однос улаз-излаз у овим ћелијама који је праћен мерењем броја нервних импулса изазваних струјним импулсима различите јачине не показује разлику између ћелија које експримирају *ArcLight и* контроле (Слика 29). Мушице које експримирају *ArcLight* показују нормалану циркадијану локомоцију (Слика 31), што је карактеристика у понашању која је изузетно осетљива према променама у биофизичким карактеристикама мембране sLNVs и lLNVs ћелија (Nitabach *et al*., 2002; 2006; Wu *et al*., 2008; Choi *et al*., 2012). Ови резултати показују да је, при тестираном нивоу експресије пробе који не доводи до значајније промене физиолошких особина неурона, јачина оптичких сигнала које производи *ArcLight* довољна за детекцију електричних транзијената у мембрани нервних ћелија.

Ми смо, такође тестирали способност *ArcLight* да детектује мирисним надражајима изазвану мембранску активност у пресинаптичким и постсинаптичким компартмантима првог олфакторног релеја у гломерулима антеналног лобуса *Drosophila-е.* У ову сврху користили смо *in vivo* препарат који омогућава симултану аутоматизовану контролу апликације мириса и снимања промене флуоресценције (Слика 32а). Зависно од примењеног мириса, бутанола или пропионске киселине *ArcLight* експримиран у свим рецепторним неуронима олфакторног система јасно детектује деполаризационе и хиперполаризационе догађаје у централним пресинаптичким завршецима у појединачним гломерулусима (Слика 32б). Специфична промене детектоване у гломерулусима у одговору на два тестирана мириса су у генералном сагласју са резултатима добијеним при директном мерењу броја нервних импулса изазваних мирисним надражајима применом екстрацелуларно пласираних електрода на ћелијска тела рецепторних неурона на периферији (Wilson *et al*., 2004; Hallem and Carlson, 2006).

Добијени резултати су у складу и са резултатима добијеним употребом оптичких индикатора за Ca2+ који детектују индиректни нисходни другостепеним



Слика 32. Појединачни оптички сигнали добијени *in vivo* праћењем мембранске активности при примени мирисних надражаја. а) Дијаграм *in vivo* препарата кориштеног за оптичко праћење мембранске активности изазване мирисним надражајима у антеналном лобусу *Drosophile melanogaster*. б) Записи добијени оптичким снимањем мембранске активности изазване мирисним надражајима бутанолом или пропионском киселином у пресинаптичким завршецима олфакторних рецепторних неурона. Жутим квадратом је обележен тренутак апликације мириса, а гломерулуси у антеналном лобусу су обележени стандардним именима као у (Hallem and Carlson, 2006; Silbering et al., 2008). в) Записи добијени оптичким снимањем мембранске активности изазване мирисним надражајима у постсинаптичким завршецима у пројекционим неуронима.

гласнцима омогућен пренос сигнала до кога долази услед промена у мембранској активности (Silbering *et al*., 2008).

Дискусија

У поређењу са традиционалним методама које подразумевају употребу ектрода оптичко снимања нервне активности представља мање инвазивну опцију која нуди прецизније усмерена мерења са бројних локација истовремено. Ипак, овај циљ до данас није заиста био могућ обзиром на слабе перформансе свих до сада развијених синтетичких и протеинских боја. У овом раду је описан развој синтетичког протеинског конструкта који при експресији у сисарским нервним ћелијама показује смањење у интезитету флуоресценције у одговору на промене у мембранском потенцијалу. Експресија пробе *ArcLight* у хипокампалним неуронима сисара и у нервним ћелијама у интактном мозгу трансгене винске мушице (*Drosophila melanogaster*) доводи до појаве флуоресценције која је и по интензитету, и по волтажној сензитивности довољно велика да омогућава поуздану детекцију акционих потенцијала без потребе за упросечавањем сигнала. Проба је такође, довољно осетљива да омогућава детекцију подпражних догађаја и волтажних промена у финијим структурама нервне ћелије (нпр. дендритима). *ArcLight* је прва гентички кодирана проба која производи поуздане и велике сигнале *in vivo,* и као таква представља очигледан напредак у развоју групе метода које ће омогућити неурофизиолошка истраживања базирана искључиво на оптичким методама.

ElectricPk је прва проба базирана на *CiVS* која успешно прати брза померања у волтажном сензору, што указује на чињеницу да примена циркуларно пермутованих протеина у дизајну ових проба нуди извесне предности. Брза кинетика реакције *ElectricPk-a* (2 ms) је у супротности са доминантно спором брзином реакције (>12 ms) других *CiVS* проба (Dimitrov *et al*., 2007; Tsutsui *et al*., 2008; Lundby *et al*., 2010; Perron *et al*., 2009; Jin *et al*., 2012). Пробе које показују сличну, брзу кинетику (SPARC; Ataka and Pieribone, 2002; Zahra; Baker *et al*., 2012; Mishina *et al*., 2012) имају недовољну сензитивност и лошу мембранску експресију што их чини практично неупотрбљивим за релевантне експерименте са сисарима. Механизам који доводи до промене флуоресценције *ElectricPk-a* није

јасан, али је условљен циркуларном пермутацијом ФП-а обзиром да конструкт који садржи немодификовани ФП уграђен на истој позицији у волтажном сензору непоказује волтажну сензитивност. Досадашња сазнања показују да промена волтаже изазива неколико реаранжмана у структури волтажно-осетљивог сензора. Промена волтаже иницијално доводи до брзог померања наелектрисаних група у ВСД-у која се могу мерити као струја. Ова струја је аналогна такозваној струји отварања вратница која се јавља у волтажно-зависним јонским каналима. Ове брзе промене се у већини волтажних проба виде као иницијална, брза промена у флуоресценцији док је највећи део промене интезитета флуоресценције изазван каснијим, споријим конформацоним променама волтажног сензора (Villalba-Galea *et al*., 2008). Чини се да промена флуоресценције *ElectricPk*, као и већине циркуларно пермутованих проба које су описане у овом раду прати само брзу компоненту у волтажно-зависном реаранжману *CiVSP*. Ови резултати потврђују да је могуће издизајнирати пробу која ће успешно пратити само брзе промене у структури волтажног сензора и то како у бесмртним ћелијским линијама, тако и у неуронима. *ElectricPk* карактерише и линеаран однос промене флуоресценције у односу на волтажу што није случај са осталим *CiVS* пробама (Dimitrov *et al*., 2007; Tsutsui *et al*., 2008; Lundby *et al*., 2010; Perron *et al*., 2009; Jin *et al*., 2012). Овај резултат додатно указује да промена флуоресценције ове пробе највероватније прати брза померања наелектрисаних група у С4 домену. Ово откриће показује да је могуће добити пробу која ће пратити волтажне промене са адекватном брзином, а која се базира на примени најпопуларнијег волтажног сензора *CiVSP*.

Идеја да се cpEGFP из калцијумских индикатора (*GCaMP* фамилија индикатора) примени у дизајну волтажних проба је претходно истраживана у лабораторији Томаса Кнопфела (*Thomas Knöpfel*). У овој студији конструкти аналогни овде описаним су добијени употребом *cpEGFP* из *GCaMP2* индикатора (Gautam *et al*., 2009). Једино конструкт *VSFP (A) cpEGFP* из поменуте студије има место уградње ФП-а које се не може поредити са овде описаним конструктима, али зато је *VSFP(B)cpEGFP* аналоган *pLB1.1* или *pLB2.1,* VSFP(C)cpEGFP је

сличан *pLB4.1*, а *VSFP(D)cpEGFP* је упоредив са *pLB7.1*. Обе студије показују да су комбинације ових отвора на ФП-у (величина и локација) и места споја волтажног сензора и ФП-а неповољне за дизајн проба. У оба случаја добијене пробе су показале слабу базалну флуоресценцију и нису даље тестиране. Резултати обе студије још једном потврђују да и врло дискретне промене у конструкцији проба могу суштински утицати на њихове карактеристике. Чини се да је систематска анализа великог броја потенцијалних проба критична за проналажење успешних комбинација. Обзиром да хиперполаризујући тест пулсеви изазивају линеарно повећање у флуоресценцији *ElectricPk,* могуће је да би неки од конструката који нису показали присуство базалне флуоресценције показали повећање у интензитету флуоресценције под утицајем промене у волтажи. Како смо током рада на волтажну осетљивост тестирали само пробе које су показивале базалну флуоресценцију могуће је да смо пропустили да детектујемо пробе које би на промене у волтажи реаговале повећањем у интезитету флуоресценције. Већина волтажних проба базираних на *CiVS,* које су до сада развијене су због своје споре кинетике неодговарајуће за праћење брзих промена карактеристичних за нервну активност (тј. нервне импулсе). Тестирана у *in vitro* гајеним сисарским неуронима *ElectricPk* проба успешно прати акционе потенцијале са временском резолуцијом која је у рангу сигнала који се добијају употребом синтетичких боја малих молекулских маса. Ово је први ФП сензор који би се уз додатне корекције у сензитивности могао користити у студијама праћења порекла настанка и пропагације акционих потенцијала на нивоу појединачних нервних ћелија. *ElectricPk* показује да је могуће применити принципе који су се показали успешним у дизајну калцијумских индикатора за добијање бољих волтажних сензора. Иако развијање ФРЕТ проба теоретски нуди предности рациометријског снимања, и изузетне осетљивости према врло малим променама у растојању/орјентацији две флуорофоре недавна открића у пољу калцијумских индикатора показују да пробе базиране на појединачним, циркуларно-пермутованим ФП могу произвести изузетно велике сигнале. У овде описаном

случају, *ElectricPk* за разлику од осталих сличних волтажних сензора прати само брзе промене у волтажно осетљивом домену *CiVS*. Иако врло брзи, сигнали које производи ElectricPk су релативно мали. За очекивати је да ће даљи циклуси модификација ове пробе довести до побољшања у сензитивности, слично као што се десило у случају калцијумским сензорима.

У овој студији је такође, описан развој фамилије флуоресцирајућих протеинских волтажних сензора *ArcLight* који показују велике промене у интензитту флуоресценције у одговору на промене у волтажи. И након читавог низа експеримената остаје нејасно како мутација *A227D* изазива тако драматичан пораст у сензитивности волтажне пробе. Могуће је да *D227* интереагује са мембраном, са другим аминокиселинским остацима на ФП-у или са групама које улазе у састав секвенце која повезује волтажни сензор и ФП. Такође. могуће је и да је *D227* асоциран са унутрашњом страном плазма мембране. Померена pH сензитивност карактеристична за *ecliptic pHluorin* и *super ecliptic pHluorin* ФП-а је могуће неопходна за модуларни ефекат *D227*. Иако ова студија показује да мутација *D227* не утиче на ексцитациони и емисиони спектар, или pH сензитивност слободног ФП-а, могуће је да промена у локалном наелектрисању на једној страни површине ФП-а до које мутација доводи има значај за волтажну модулацију. Могуће је и да *D227* делује као "локална киселина" изазивајући реверзну протонацију остатака локалних амино киселина *T203* и/или *H148* за које се од раније зна да могу бити под утицајем промена у pH вредности (Brejc *et al*., 1997; Elsliger *et al*., 1999) или пак, да производи промене у кретању протона како преко површине ФП-а, тако и у бета бурету ФП-а (Agmon, 2005; Shinobu *et al*., 2010). Обзиром на чињеницу да аспартична киселина, која спада у киселе амино киселине са својим малим стерним ефектом, изазива највећи модуларни ефекат од свих амино киселина које су тестиране на критичној 227 позицији говори у прилог хипотезе о "локалној киселини". Такође, изгледа да модуларни ефекат *A227D* зависи од неколико других група које су присутне у *ecliptic pHluorin*, обзиром да интродукција ове мутације није довела до повећања сензитивности у конструкту

базираном на врло сличном флуоресцирајућем протеину *EGFP*. Просторна близина неопходних аминокиселинских група које се све налазе на истој површини бета буре указују да ова поршина највероватније интерреагује са спољашњим фактором који је неопходан за модулацију флуоресценције. Спора кинетика промене *ArcLight* индикатора указује да је највећи део промене интензитета флуоресценције повезан са волтажно-зависним секундарним реаранжманима наелектрисаних група у волтажном сензору (Villalba-Galea *et al*., 2009). Такође, сигмоидалан облик криве која описује однос волтаже према флуоресценцији указује да је процес повезан са конформационим променама које настају услед померања наелектрисања и да се хромофора не налази под директним утицајем промена у електричном пољу (као што је случај са органским волтажним бојама мале молекулсе масе). Недостатак линеарности у односу волтаже и флуоресценције и спора кинетика *ArcLight* индикатора искључују могућност детаљних студија облика и пропагације акционих потенцијала на нивоу појединачних ћелија као што је то могуће са органским бојама (Popovic *et al*., 2011). Ипак, детекција акционих потенцијала овом пробом је могућа уз употребу снимања нижег пропусног опсега.

Фамилија *ArcLight* проба представља највеће побошање у величини сигнала у волтажним индикаторима базираним на ФП које омогућавају праћење акционих потенцијала и подпражних деполаризација у неуронима и потенцијално другим типовима ћелија и органела. Студија на трансгеним винским мушицама показује да *ArcLight* проба прати како потпражне сигнале, тако и акционе потенцијале у циљаним неуронима у интактном мозгу. *ArcLight* индикатором је било могуће праћење пропагације електричних сигнала дуж нервних наставака. У овој студији употреба *ArcLight-а* нам је омогућила оптичко снимање синаптичких инпута у неуроне укључене у контролу циркадијаног ритма чија је активност раније праћена употребом метода наметнуте струје на целу ћелију. Оптичким снимањем мембранске активности у пресинаптичким и постсинаптичким мембранама које улазе у састав првог синаптичког преноса у олфакторном

систему винске мушице потврђена је ефектност ове пробе за оптичка снимања у другим деловима нервног система. Овде приказани резултати су показатељ да *ArcLight* по први пут омогућава поуздано симултано праћење активности у већем броју циљаних неурона у нервном колу у интактном мозгу без потребе за упросечавањем сигнала. И као што су генетички кодирани флуоресцирајући сензори довели до револуције у пољу детекције сигнала базираних на интрацелуларном Ca2+, *ArcLight* сада омогућава оптичка мерења мембранског потенцијала у интактним нервним колима, кључног ћелијског параметра који лежи у основи обраде информација у нервном систему.

У поређењу са другим спонтано флуоресцирајућим протеинима који се могу користити у дизајну волтажних сензора (Kralj *et al*., 2011, 2012), флуоресцирајући протеини који су структурно слични зеленом флуоресцентном протеину (*GFP)* се одликују значајно већим интензитетом флуоресценције. Волтажни индикатори који се базирају на родопсинима из микроорганизама нуде предности као што су спектар који је померен ка већим таласним дужинама (црвени део спектра) али је интензитет флуоресценције ових проба значајно мањи него проба које су базиране на ФП. *Arch D95N* има квантни принос од 0.0004 (Kralj et al., 2012) у односу на 0.54 за *EGFP* (Ilagan et al., 2010). Уз то кинетика ове пробе драстично опада са модификацијама које се морају спровести да би се добио непроводљиви облик пробе.

Непосредан циљ будућих истраживања је наставак тестирања и процене могућности практичне примене ових проба у студијама на другим физиолошким препаратима. Постоји читав низ експерименталних услова који укључују употребу различитих типова микроскопије (стандардна епифлуоресцентна микроскопија, мултифотон микроскопија) за *in vitro* студије на неуронима гајеним у култури и можданим исечцима, као и за *in vivo* студије у другим модел организмима као што су *Caenorhabditis elegans*, *Danio rerio* и глодари. Разлике које смо нашли у карактеристикама волтажне осетљивости *ArcLight* пробе тестиране у сисарској ћелијској линији (HEK293 ћелије) и неуронима винске мушице указују да свака од

поменутих парадигми захтева потврду перформанси пробе и карактеризацију флуоресцентног сигнала у датом типу ћелија и под датим условима.

И док тренутне пробе представљају значајан напредак у поређењу са раније развијеним пробама њихова сензитивност је и даље мала у поређењу са најпопуларнијим генетички кодираним пробама које припадају фамилији *GCaMP* индикатора. Ови калцијумски сензори (тренутна верзија, *GCaMP 6*) се одликују ниском базалном флуоресценцијом и врло високом променом у интезитету флуоресценције (и до >1000% у неким случајевима) која прати промене у нивоу унутарћелијског Ca2+. Сама чињеница да *GCaMP* индикатори на промене реагују са порастом у интензитету флуоресценције је предност у односу на *ArcLight* у коме долази до смањења флуоресценције. Пораст у флуоресценцији омогућава већу промену ΔF/F за исту промену у интезитету. Такође, пратећи проблеми везани за избељивање ФП-а су мање изражени у ситуацији када протеин проводи највећи део времена у непобуђеном стању. Са друге стране, велики модуларни ефекат који показује мутација *D227* уводи као нов концепт у дизајну волтажних проба могућност модификације ФП-а као начин да се добију побољшане пробе. У претходним студијама модификације су се базирале или на употреби различитих ФП-а или на промени локације његове уградње у оквиру волтажног сензора али покушаји мутације самог ФП-а нису до сада објављени. У овој студији, показано је да мали број појединачних мутација у структури ФП-а доводи до драматичног пораста у волтажној осетљивости пробе. Мутације одговорне за ову драматично повећану волтажну сензитивност не довде до очиглених промена у биофизичким карактеристикама ФП-а (нпр. екситационом и емисионом спектру, pH осетљивости) које би омогућиле *a priori* идентификацију употребом класичних метода мутагенезе и тестирања у бактеријама соја *Escherichia coli.* Будући мутирани сезори и даље морају бити тестирани у еукариотским ћелијама у којима ће конструкт бити локализован у плазма мембрани и у којима је могуће контролисати потенцијал мировања. Дизајн платформе која би омогућила синтезу и тестирање великог броја проба би олакшао тренутну ситуацију у којој

недостатак рационалног приступа отежава бржи напредак у овом пољу. Технике у молекуларној биологији као што су континуални циклуси усмерених и случајних мутагенеза се успешно примењују у дизајну флуоресцентних протеина и нуде могућност креирања читавих библиотека конструката са различитим карактеристикама које би највероватније резултирале побољшаним пробама. Много већи изазов представља дизајн платформе за тестирање проба која би имала високу продуктивност уз одговарајућу поузданост у одговарајућем временском периоду. Обзиром да перформансе пробе зависе од типа ћелија у којима се врши тестирање, постаје јасно да се поуздани резултати могу очекивати само у случају да се платформа базира на тестирању у побудљивим сисарским ћелијама (нервним ћелијама). Примена техника гајења ћелијских културе које би омогућиле адекватне услове раста и одржавања нервних ћелија су још увек врло захтевне. Такође, од свих потенцијалних метода које омогућавају експресију проба само оне на употреби модификованих вируса имају задовољавајућу стопу успеха уз минималне пратеће ефекте. Ове методе још увек нису широко доступне. Додатну групу проблема представљају технички изазови везани за колекцију сигнала и даља обраду добијенх података.

У мозгу сисара обрада информација везаних за специфичне феномене у понашању укључује велики број неурона који се простиру преко релативно великих површина ткива. Да бисмо били у стању да разумемо како нервна активност доводи до одређеног понашања неопходно је да се активност прати барем у делу неурона који улазе у састав већих површина које контролишу одређене догађаје. Ова активност потом може бити корелисана у вишедимензионалном простору у односу на специфичне аспекте понашања. Методе оптичког снимања сличне методама које су описане у овом раду нуде највећу шансу за успех у постизању овог захтевног циља. Поред тога што је потребно добити нформације о великом броју неурона који се простиру преко великих површина, сигнали морају имати високу темпоралну резолуцију која би омогућила дискриминацију догађаја који се одигравају у милисекундама у

неуронима који су есенцијални за обраду датих информација. И док још увек немамо оптички метод који омогућава довољно брзу стандардну епифлуоресцентну микроскопију уз низак шум напредак у овој области постигнут у последњих пар година наводи на оптимизам. Оно што је потребно је комбинација оптичких волтажних проба и метода оптичког снимања које омогућавају снимање нервне активности у горњим деловима мождне коре са високом фреквенцијом и резолуцијом. Постизање овог циља би представљао драматичан корак напред ка разумевању глобалне функције мозга у кичмењацима. Комбинација оптичких метода снимања активности нервних ћелија са недавно развијеним методама које омогућују дискретну, генетички дефинисану оптичку контролу њихове активности ће умногоме проширити наше разумевање како се информације обрађују у нерном систему сисара.

Литература

Agmon N (2005) Proton pathways in green fluorescence protein. Biophys J 88: 2452–2461.

Akemann W, Mutoh H, Perron A, Park YK, Iwamoto Y, Knöpfel T (2012) Imaging neural circuit dynamics with a voltage-sensitive fluorescent protein. J Neurophysiol 108: 2323–2337.

Akerboom J, Rivera JDV, Guilbe MMR, Malave ECA, Hernandez HH, Tian L, Hires SA, Marvin JS, Looger LL, Schreiter ER (2008) Crystal Structures of the GCaMP Calcium Sensor Reveal the Mechanism of Fluorescence Signal Change and Aid Rational Design. Journal of Biological Chemistry 284: 6455–6464.

Akerboom JJ et al. (2012) Optimization of a GCaMP calcium indicator for neural activity imaging. J Neurosci 32:13819–13840.

Antić SS, Zecević DD (1995) Optical signals from neurons with internally applied voltage-sensitive dyes. J Neurosci 15:1392–1405.

Ataka K, Pieribone VA (2002) A genetically targetable fluorescent probe of channel gating with rapid kinetics. Biophys J 82: 509–516.

Baines RA, Uhler JP, Thompson A, Sweeney ST, Bate M (2001) Altered electrical properties in Drosophila neurons developing without synaptic transmission. J Neurosci 21:1523–1531.

Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY (1999) Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. Proc Natl Acad Sci USA 96:11241–11246.

Baker B, Lee H, Pieribone V, Cohen L (2007) Three fluorescent protein voltage sensors exhibit low plasma membrane expression in mammalian cells. J Neurosci 161: 32-38.

Baker BJ, Mutoh H, Dimitrov D, Akemann W, Perron A, Iwamoto Y, Jin L, Cohen LB, Isacoff EY, Pieribone VA, Hughes T, Knöpfel T (2008) Genetically encoded fluorescent sensors of membrane potential. Brain Cell Bio 36: 53–67.

Baker BJ, Jin L, Han Z, Cohen LB, Popovic M, Platisa J, Pieribone V (2012) Genetically encoded fluorescent voltage sensors using the voltage-sensing domain of Nematostella and Danio phosphatases exhibit fast kinetics. J Neurosci Methods 208:190–196.

Barnett L, Platisa J, Popovic M, Pieribone VA, Hughes T (2012) A fluorescent, genetically-encoded voltage probe capable of resolving action potentials. PLoS ONE 7: e43454.

Bezanilla F (2008) Ion channels: from conductance to structure. Neuron 60: 456–468.

Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G (2005) Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. Nature 8(9): 1263-1268.

Brejc K, Sixma TK, Kitts PA, Kain SR, Tsien RY, Ormö M, Remington SJ (1997) Structural basis for dual excitation and photoisomerization of the Aequorea victoria green fluorescent protein. Proc Natl Acad Sci USA 94: 2306–2311.

Cao G, Nitabach MN (2008) Circadian control of membrane excitability in Drosophila melanogaster lateral ventral clock neurons. J Neurosci 28: 6493–6501.

Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science 263: 802-805.

Choi CC, Cao GG, Tanenhaus AKA, McCarthy EVE, Jung MM, Schleyer WW, Shang YY, Rosbash MM, Yin JCPJ, Nitabach MNM (2012) Autoreceptor control of peptide/neurotransmitter corelease from PDF neurons determines allocation of circadian activity in drosophila. Cell Rep 2: 332–344.

Cohen LB, Keynes RD, Hille B (1968) Light scattering and birefringence changes during nerve activity. Nature 218 (5140): 438-441.

Cohen LB, Salzberg BM, Davila HV, Ross WN (1974) Changes in axon fluorescence during activity: molecular probes of membrane potential. J Membrain Biol 19: 1-36.

Cohen LB (2011) Historical Overview and General Methods of Membrane Potential Imaging. Membrane Potential Imaging in the Nervous System. In: *Membrane Potential Imaging in the Nervous System: Methods and Applications.* Canepari M, Zecevic D (eds.), DOI 10.1007/978-1-4419-6558-5_1. Springer Sciencie+Buisness Media. LLC.

Dimitrov D, He Y, Mutoh H, Baker BJ, Cohen L, Akemann W, Knöpfel T (2007) Engineering and Characterization of an Enhanced Fluorescent Protein Voltage Sensor. PLoS ONE 2: e440.

Dombeck D, Khabbaz A, Collman F (2007) Imaging large-scale neural activity with cellular resolution in awake, mobile mice. Neuron 56: 43-57.

Elsliger MA, Wachter RM, Hanson GT, Kallio K (1999) Structural and spectral response of green fluorescent protein variants to changes in pH. Biochemistry 38: 5296-5301.

Feldmeyer D, Brecht M, Helmchen F, Petersen CCH, Poulet JFA, Staiger JF, Luhmann HJ, Schwarz C (2012) Barrel cortex function. Prog Neurobiol. DOI:10.1016/j.pneurobio.2012.11.002

Fiala A, Spall T (2003) In vivo calcium imaging of brain activity in Drosophila by transgenic cameleon expression. Sci STKE 2003: PL6.

Frostig RD, Chen-Bee CH (2009) Visualizing adult cortical plasticity using intrinsic signal optical imaging. In: I*n vivo optical imaging of Brain Function*. Frostig R (ed.). CRC Press.

Gautam SG, Perron A, Mutoh H, Knopfel T (2009) Exploration of Fluorescent Protein Voltage Probes Based on Circularly Permuted Fluorescent Proteins. Frontiers in Neuroengineering 2: 1-8

Grinvald A, Hildesheim R (2004) VSDI: a new era in functional imaging of cortical dynamics. Nat Rev Neurosci 5: 874-885.

Groth AC, Fish M, Nusse R, Calos MP (2004) Construction of transgenic Drosophila by using the site-specific integrase from phage phiC31. Genetics 166:1775–1782.

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca2+ indicators with greatly improved fluorescence properties. Journal of Biological Chemistry 260: 3440-3450.

Guerrero GG, Siegel MSM, Roska BB, Loots EE, Isacoff EYE (2002) Tuning FlaSh: Redesign of the Dynamics, Voltage Range, and Color of the Genetically Encoded Optical Sensor of Membrane Potential. Biophys J 83: 3607–3618.

Hai A, Shappir J, Spira ME (2010) In-cell recordings by extracellular microelectrodes. Nat Meth 7: 200–202.

Hallem EA, Carlson JR (2006) Coding of odors by a receptor repertoire. Cell 125:143–160.

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. Pflugers Arch 391:85–100.

Hill DK, Keynes RD (1949) Opacity Changes in Stimulated Nerve. J Physiol (Lond) 108: 278–281.

Hille B (2001) Ion Channels of Excitable Membranes. Sinauer Associates, Incorporated, USA.

Hodgkin AL, Huxley AF, Katz B (1952) Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of Loligo. J Physiol (Lond) 116: 424–448.

Homma R, Baker BJ, Jin L, Garaschuk O, Konnerth A, Cohen LB, Zecevic D (2009) Wide-field and two-photon imaging of brain activity with voltage- and calcium-sensitive dyes. Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci 364: 2453–2467.

Hossain MI, Iwasaki H, Okochi Y, Chahine M, Higashijima S, Nagayama K, Okamura Y (2008) Enzyme Domain Affects the Movement of the Voltage Sensor in Ascidian and Zebrafish Voltage-sensing Phosphatases. Journal of Biological Chemistry 283:18248–18259.

Ilagan RP, Rhoades E, Gruber DF, Kao H-T, Pieribone VA, Regan L (2010) A new bright green-emitting fluorescent protein--engineered monomeric and dimeric forms. FEBS J 277:1967–1978.

Inouye S, Tsuji FI (1994) Evidence for redox forms of the Aequorea green fluorescent protein. FEBS Lett 351: 211-214.

Irwin B. Levitan, Leonard K. Kaczmarek (2001) The Neuron : Cell and Molecular Biology. Oxford University Press, USA.

Jin L, Han Z, Platisa J, Wooltorton JRA, Cohen LB, Pieribone VA (2012) Single action potentials and subthreshold electrical events imaged in neurons with a fluorescent protein voltage probe. Neuron 75:779–785.

Johnston D, Wu DJSM-S (1995) Foundations of Cellular Neurophysiology. Bradford Book. USA.

Kralj JM, Douglass AD, Hochbaum DR, Maclaurin D, Cohen AE (2011) Optical recording of action potentials in mammalian neurons using a microbial rhodopsin. Nat Meth 9: 90–95.

Larsson MC, Domingos AI, Jones WD, Chiappe ME, Amrein H, Vosshall LB (2004) Or83b encodes a broadly expressed odorant receptor essential for Drosophila olfaction. Neuron 43: 703–714.

Loew LM (2011) Design and use of organic voltage sensitive dyes. Membrane Potential Imaging in the Nervous System. In: *Membrane Potential Imaging in the Nervous System: Methods and Applications.* Canepari M, Zecevic D (eds.), DOI 10.1007/978-1-4419-6558-5_1. Springer Sciencie+Buisness Media. LLC.

Looger LL, Griesbeck O (2012) Genetically encoded neural activity indicators. Curr Opin Neurobiol 22:18–23.

Lundby A, Mutoh H, Dimitrov D, Akemann W (2008) Engineering of a genetically encodable fluorescent voltage sensor exploiting fast Ci-VSP voltage-sensing movements. PLoS ONE 3: e2514.

Lundby A, Akemann W, Knöpfel T (2010) Biophysical characterization of the fluorescent protein voltage probe VSFP2.3 based on the voltage-sensing domain of Ci-VSP. Eur Biophys J 39: 1625–1635.

McCarthy von E, Wu Y, deCarvalho T, Brandt C, Cao G, Nitabach MN (2011) Synchronized bilateral synaptic inputs to Drosophila melanogaster neuropeptidergic rest/arousal neurons. J Neurosci 31: 8181-8193.

Miesenböck GG, De Angelis DAD, Rothman JEJ (1998) Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. Nature 394:192–195.

Mishina Y, Mutoh H, Knöpfel T (2012) Transfer of Kv3.1 Voltage Sensor Features to the Isolated Ci-VSP Voltage-Sensing Domain. Biophys J 103: 669–676.

Miyawaki A, Llopis J, Heim R, McCaffery JM, Adams JA (1997) Fluorescent indicators for Ca2+; based on green fluorescent proteins and calmodulin. Nature 388: 882-887.

Murata Y, Iwasaki H, Sasaki M, Inaba K, Okamura Y (2005) Phosphoinositide phosphatase activity coupled to an intrinsic voltage sensor. Nature 435:1239–1243.

Murata Y, Okamura Y (2007) Depolarization activates the phosphoinositide phosphatase Ci-VSP, as detected in Xenopus oocytes coexpressing sensors of PIP2. J Physiol (Lond) 583: 875–889.

Mutoh H, Perron A, Dimitrov D, Iwamoto Y, Akemann W, Chudakov DM, Knöpfel T (2009) Spectrally-Resolved Response Properties of the Three Most Advanced FRET Based Fluorescent Protein Voltage Probes. PLoS ONE 4: e4555.

Mutoh H, Akemann W, Knöpfel T (2012) Genetically Engineered Fluorescent Voltage Reporters. ACS Chem Neurosci 3: 585–592.

Nagai T, Sawano A, Park ES, Miyawaki A (2001) Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca2+. Proc Natl Acad Sci USA 98: 3197–3202.

Nakai J, Ohkura M, Imoto K (2001) A high signal-to-noise Ca2+ probe composed of a single green fluorescent protein. Nat Biotechnol 19:137-141.

Nicolelis MA, Wiest M, Thomson E, Meloy J (2008) Multielectrode Recordings in the Somatosensory System. In: *Methods for Neural Ensemble Recordings*. Nicolelis MAL (ed.) 2nd ed. Boca Raton (FL): CRC Press.

Nitabach MN, Blau J, Holmes TC (2002) Electrical silencing of Drosophila pacemaker neurons stops the free-running circadian clock. Cell 109: 485–495.

Nitabach MN, Wu Y, Sheeba V, Lemon WC, Strumbos J, Zelensky PK, White BH, Holmes TC (2006) Electrical hyperexcitation of lateral ventral pacemaker neurons desynchronizes downstream circadian oscillators in the fly circadian circuit and induces multiple behavioral periods. J Neurosci 26: 479–489.

Nitabach MN, Taghert PH (2008) Organization of the Drosophila Circadian Control Circuit. Current Biology 18: R84-R93.

Okamura Y, Murata Y, Iwasaki H (2009) Voltage-sensing phosphatase: actions and potentials. J Physiol (Lond) 587: 513–520.

Perron A, Mutoh H, Launey T (2009) Red-Shifted Voltage-Sensitive Fluorescent Proteins. Chem Biol 16: 1268-1277.

Perron A, Akemann W, Mutoh H (2012) Genetically encoded probes for optical imaging of brain electrical activity. In: *Progress in Brain Research.* Knopfel T, Boyden E (eds.) 196. ISSN: 0079-6123. Elsevier BV.

Peterka DS, Takahashi H, Yuste R (2011) Imaging Voltage in Neurons. Neuron 69: 9–21.

Pfeiffer BD, Ngo T-TB, Hibbard KL, Murphy C, Jenett A, Truman JW, Rubin GM (2010) Refinement of tools for targeted gene expression in Drosophila. Genetics 186: 735–755.

Popovic MA, Foust AJ, McCormick DA, Zecevic D (2011) The spatio-temporal characteristics of action potential initiation in layer 5 pyramidal neurons: a voltage imaging study. J Physiol (Lond) 589: 4167–4187.

Prasher DCD, Eckenrode VKV, Ward WWW, Prendergast FGF, Cormier MJM (1992) Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein. Gene 111: 229–233.

Renn SC, Park JH, Rosbash M, Hall JC, Taghert PH (1999) A pdf neuropeptide gene mutation and ablation of PDF neurons each cause severe abnormalities of behavioral circadian rhythms in Drosophila. Cell 99: 791–802.

Sakai R, Canonigo VR, Raj CD, Knopfel T (2001) Design and characterization of a DNA−encoded, voltage−sensitive fluorescent protein. European Journal of Neuroscience 13: 2314-2318.

Sankaranarayanan S, De Angelis D, Rothman JE, Ryan TA (2000) The use of pHluorins for optical measurements of presynaptic activity. Biophys J 79: 2199–2208.

Scanziani M, Häusser M (2009) Electrophysiology in the age of light. Nature 461: 930–939.

Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. J Cell Comp Physiol 59: 223–239.

Shinobu A, Palm GJ, Schierbeek AJ, Agmon N (2010) Visualizing Proton Antenna in a High-Resolution Green Fluorescent Protein Structure. J Am Chem Soc 132: 11093–11102.

Siegel MSM, Isacoff EYE (1997) A Genetically Encoded Optical Probe of Membrane Voltage. Neuron 19: 7–7.

Silbering AF, Okada R, Ito K, Galizia CG (2008) Olfactory Information Processing in the Drosophila Antennal Lobe: Anything Goes? J Neurosci 28:13075–13087.

Sjulson L, Miesenböck G (2008) Rational optimization and Imaging in vivo of a genetically encoded optical voltage reporter. J Neurosci 28: 5582–5593.

Stocker RFR, Heimbeck GG, Gendre NN, de Belle JSJ (1997) Neuroblast ablation in Drosophila P[GAL4] lines reveals origins of olfactory interneurons. J Neurobiol 32: 443–456.

Tian L, Hires SA, Mao T, Huber D, Chiappe ME, Chalasani SH, Petreanu L, Akerboom J, McKinney SA, Schreiter ER, Bargmann CI, Jayaraman V, Svoboda K, Looger LL (2009) Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators. Nat Meth 6: 875–881.

Topell S, Hennecke J, Glockshuber R (1999) Circularly permuted variants of the green fluorescent protein. FEBS Lett 457: 283–289.

Tsutsui H, Karasawa S, Okamura Y, Miyawaki A (2008) Improving membrane voltage measurements using FRET with new fluorescent proteins. Nat Meth 5: 683–685.

Villalba-Galea CA, Sandtner W, Starace DM, Bezanilla F (2008) S4-based voltage sensors have three major conformations. PNAS 105: 17600-17607.

Villalba-Galea CA, Sandtner W, Dimitrov D, Mutoh H, Knöpfel T, Bezanilla F (2009) Charge movement of a voltage-sensitive fluorescent protein. Biophys J 96: L19–L21.

Wilson RI, Turner GC, Laurent G (2004) Transformation of olfactory representations in the Drosophila antennal lobe. Science 303: 366–370.

Wu Y, Cao G, Nitabach MN (2008) Electrical Silencing of PDF Neurons Advances the Phase of non-PDF Clock Neurons in Drosophila. Journal of Biological Rhythms 23:117–128.

Zhao YY, Araki SS, Wu JJ, Teramoto TT, Chang Y-FY, Nakano MM, Abdelfattah ASA, Fujiwara MM, Ishihara TT, Nagai TT, Campbell RER (2011) An expanded palette of genetically encoded Ca^{2+} indicators. Science 333:1888–1891.

Биографија

Јелена Ч. Платиша-Поповић је рођена у Београду 31. октобра 1976 године где је завршила основну и средњу медицинску школу "Београд". Основне студије из Биологије је завршила на Биолошком факултету, Универзитета у Београду. Докторске студије на Факултету за физичку хемију је започела 2009. године.

Од марта 2006. до марта 2007. године је радила у VII Београдској гимназији у Београду. Од априла 2007. до јула 2012. године је била запослена на Институту за биолошка истраживања „Синиша Станковић". На Одељењу за Физиологију биљака је радила на пројекту под вођством Др. Бранке Винтерхалтер. Од јануара 2010. године ради у Лабораторији за ћелијску неурофизиологију у Џон Б Пирс Лабораторији- Јел Универзитету (The John B. Pierce Laboratory-Yale University) под вођством Др. Винсент Пирбона (Vincent Pieribone, PhD).

Библиографија

Guan Cao, **Jelena Platisa,** Vincent A Pieribone, Davide Raccuglia, Michael Kunst, Michael N Nitabach (2013). Genetically Targeted Optical Electrophysiology in Intact Neural Circuits. Cell, 154 (4):904-913.

Milan Dragićević, **Jelena Platiša**, Radomirka Nikolić, Slađana Todorović, Milica Bogdanovć, Ana Simonović (2013): Herbicide Phosphinothricin Causes Direct Stimulation Hormesis. Dose-Response 1 (1), 1-17

Lei Jin, Zhou Han, **Jelena Platisa**, Julian R Wooltorton, Lawrence B Cohen, Vincent A Pieribone (2012). Single action potentials and subthreshold events imaged in neurons with a novel fluorescent protein voltage probe. Neuron 75: 779-785.

Lauren Barnett, **Jelena Platisa**, Vincent A Pieribone, Thomas Hughes (2012). A Fluorescent, Genetically-Encoded Voltage Probe Capable of Resolving Action Potentials. PlosOne Vol. 7(9): e43454.

Bradley J. Baker, Lei Jin, Zhou Han, Lawrence B. Cohen, Marko Popovic, **Jelena Platisa**, Vincent Pieribone. Genetically encoded fluorescent voltage sensors using the voltage-

sensing domain of Nematostella and Danio phosphatases exhibit fast kinetics. Journal of Neuroscience Methods (2012), 208(2):190-196.

Joon Hyuk Park, **Jelena Platisa**, Justus V Verhagen, Shree H Gautam, Ahmad Osman, Dongsoo Kim, Vincent A Pieribone, Eugenio Culurciello. Head-mountable high speed camera for optical neural recording.Journal of Neuroscience Methods (2011), 201(2):290-5.

Savić, J., **Platiša, J.**, Dragićević, M., Nikolić, R., Mitić, N., Cingel, A., Vinterhalter, B. The activity of peroxidases and superoxide dismutases in transgenic phosphinothricin-resistant Lotus corniculatus shoots. Archives of Biological Sciences (2010), 62, 1063-1070.

B Vinterhalter, J Savić, **J Platiša**, M Raspor, S Ninković, N Mitić, D Vinterhalter (2008). Nickel tolerance and hyperaccumulation in shoot cultures regenerated from hairy root cultures of Alyssum murale Waldst et Kit. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 94 (3), 299-303.

J. Platisa, S. Veljovic-Jovanovic, B. Vinterhalter, A. Smigocki and S. Ninkovic. Induction of peroxidase and superoxide dismutase in transformed embryogenic calli of alfalfa (Medicago sativa L.), Journal of Plant Physiology (2008), 8(165): 895-900.

Зборници са међународних/националних научних скупова

DA Storace, U Sung, **J Platisa**, LB Cohen, VA Pieribone (2013). In Vivo Imaging of Odor-Evoked Responses in the Olfactory Bulb using Arclight, a Novel Fp Voltage Probe.Biophysical J (2013), 104 (2,): 679a

Zhou Han, Lei Jin, **Jelena Platisa,** Julian Wooltorton, Brian M. Salzberg, Lawrence B. Cohen, Vincent A. Pieribone. Improved Genetically Encoded Voltage Sensitive Optical Probes Detect Action Potentials and Subthreshold Events. Biophysical J (2012), 120(3): 214a.

Han Z, Jin L, **Platisa J,** Cohen LB, Pieribone VA. Critical fluorescent protein residues are required for producing large signals with the novel fluorescent protein voltage sensor ArcLight. Optogenetics IV. 2012 Neuroscience Meeting Planner. New Orleans, LA: Society for Neuroscience, 2012. Online.

Platisa J, Barnett L, Popovic M, Hughes T, Pieribone VA. Superior response kinetics of circularly permuted fluorescent proteins as reporters in CiVSP-based voltage sensors.

Optical methods. 2012 Neuroscience Meeting Planner. New Orleans, LA: Society for Neuroscience, 2012. Online.

J. Platisa-Popovic, M. Dragicevic, R. Nikolic, N. Mitic, S. Zdravkovic-Korac, S. Ninkovic. Antioxidative enzymes analysis in bar-gene transformed plants of Lotus corniculatus L., Book of Abstracts, 5th Balkan Botanical Congress, Faculty of Biology, University of Belgrade and Serbian Academy of Sciences and Arts, p44.

M. Dragicevic, **J. Platisa-Popovic,** A. Simonovic, R. Nikolic, N. Mitic, B. Vinterhalter. The effects of phosphinothricin on glutamine synthetase activity and mobility in Lotus corniculatus L., Book of Abstracts, 5th Balkan Botanical Congress, Faculty of Biology, University of Belgrade and Serbian Academy of Sciences and Arts, p45.

J. Platisa, S. Veljovic-Jovanovic and S. Ninkovic (2005): Protein and peroxidase analysis in different transgenic lines of alfalfa (Medicago sativa L.), Book of Abstracts, XVI Symposium, Society of Plant Physiology SCG, p24.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Јелена Ч. Платиша - Поповић

број индекса 20080320

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Синтеза и карактеризација генетички кодираних флуоресцентних вокселских индикатора

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, септембар 2013.

Јелена Платиша Поповић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јелена М Платиша-Поповић

Број индекса 20080320

Студијски програм физичка хемија

Наслов рада Синтеза и карактеризација генетички кодираних флуоресцентних зондажних проба

Ментор др Горан Бошић др Винсент Пиеривоне

Потписани/а Јелена Платиша-Поповић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, септембар 2013

Јелена Платиша Поповић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Синтеза и карактеризација генетички кодираних флуоресцентних волтажних проба

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, септембар 2013

Јелена Глушац-Стојковић

1. Ауторство - Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.