

OTKA Zárójelentés 2009 - PD60416 – dr. Rácz Bence

Az előagy serkentő szinapszisainak elsöprő többsége dendrittüskén végződik, funkciójukat azonban még 100 évvel Ramón y Cajal eredeti megfigyelését követően is kérdések övezik. A dendrittüskék a serkentő szinaptikus jelátvitel elsődleges célpontjai az emlős előagyban. A tüskék nagyon változatosak, mind morfológiailag, mind méret szempontjából. Ismert, hogy nagy tüske-fejjel rendelkező dendrittüskék stabilak és sok AMPA típusú glutamát receptort expresszálnak, ugyanakkor a kis méretű tüskék mozgékonyabbak, és gyenge vagy minimális szinaptikus átvitel jellemző rájuk (Nusser, 2000; Matsuzaki et al., 2001). Noha a posztzinaptikus denzitás (PSD) a legfeltűnőbb denrittüske komponens, belső felépítésük lényegesen összetettebb, mint azt valaha feltételeztük. Morfológiájuk továbbá aktivitás-függő szabályozás alatt áll, ami igen komplex jelátvitelre utal a PSD és a citoskeleton között (Kennedy, 2000; Walikonis et al., 2000; Zhou et al., 2001; Carlisle and Kennedy, 2005).

A kifejlett rágcsáló agy dendrittüskéinek méretében, alakjában és számában is változásokat (pl. mozgás, alakváltozás) figyelhetünk meg *in vivo*. Ezen változások már régóta a tudományos figyelem középpontjába kerültek a különféle idegrendszeri plaszticitási folyamatokban (pl. tanulás, memória) betöltött szerepük miatt (Trachtenberg et al., 2002). Morfológiájuk szabályozásában fellépő anomáliák pedig igen súlyos neuropszichiátriai kórképek kialakulásához vezetnek (Fiala et al., 2002). A dendrittüskék strukturális felépítése, architektúrája, ami az idegsejt-aktivitást morfológiai változásokká alakítják alig ismertek.

A legtöbben megegyeznek abban, hogy a tüskék felépítése a hatékony jelátvitel (neurotranszmisszió) szolgálatában áll (Nimchinsky et al., 2002). A PSD, a dendritikus jelátviteli berendezés fókuszpontja, a tüskék csak egyik organelluma. A tüskék szerkezete a PSD-on túl igen kevésbé ismert.

Jelen OTKA pályázat célja az volt, hogy betekintést kapjunk a dendrittüskéket felépítő citoskeleton szerkezetébe.

A dendrittüskék alapvető citoskeletonális eleme az F-aktin (Fifkova and Delay, 1982). Számos bizonyíték utal arra, hogy motilitásukat biztosító gyors, aktin-függő folyamatok glutamát kontrollja alatt állnak (Star et al., 2002), ami az aktin-szabályozó fehérjék tüskemorfológia szabályozásában betöltött jelentőségére világít rá (Ackermann and Matus, 2003; Hering and Sheng, 2003). Funkcionális szempontból ez igen lényeges: egyre több adat bizonyítja, hogy a tüskék dimenzionális változásai alapvető szerepet játszanak a szinaptikus jelátvitel tulajdonságainak tartós szabályozásában (Yuste et al., 2000). Az aktin-átalakítás (aktin-reorganizáció) biokémiai alapjait átfogóan tanulmányozzák *in vitro* modellrendszerekben (Pollard and Borisy, 2003), azonban a tüskékben folyó aktin-reorganizációt szabályozó fehérjék megoszlásáról alig voltak ismereteink.

A kutatási időszakban a következő fehérjék megoszlását, architektúráját írtuk le dendrittüskékben:

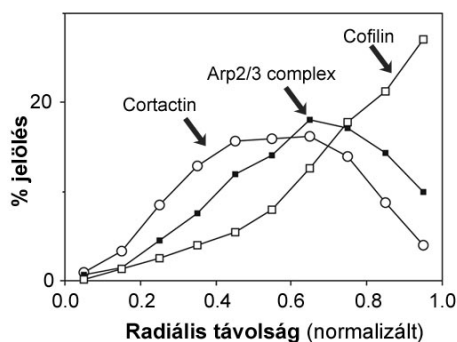
Cofilin, amely az aktin citoskeleton depolimerizációjáért felelős (Bamburg et al., 1999; Bamburg and Bernstein, 2008). Fény és elektronmikroszkópos vizsgálatokkal kombinált kvantitatív analízissel megállapítottuk, hogy a cofilin a dendrittüskék

citoplazmájának membránhoz közeli régiójában található (shell), míg a dendrittüske centrális részén (core) alig fordul elő (Racz and Weinberg, 2006). E mellett kimutattuk, hogy a cofilin a posztszinaptikus denzitásban is koncentrálódik, és hasonló eloszlást mutat a NMDA receptorokkal. Eredményeink funkcionális jelentőségét más kutatócsoportok később alátámasztották: a cofilin membrán asszociálódása az Eph4 lokalizációjával mutat korrelációt (Zhou et al., 2007). Mivel a cofilin a dendrittüskek strukturális plaszticitási folyamatokban betöltött szerepe miatt vált többek között ismertté (Fukazawa et al., 2003; Meng et al., 2003), valószínűsíthető hogy a membrán kapcsolt ephrin-EphA4-kontakt helyeken, a submembrán domain-ben fejt ki hatását (aktin-depolimerizáció) – pont ott, ahol mi a legnagyobb koncentrációját találtuk.

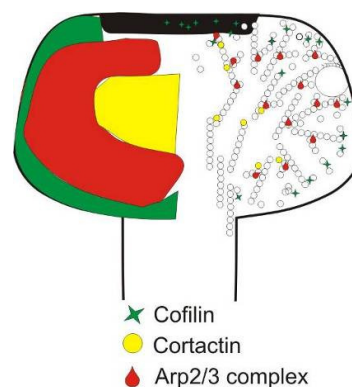
Elkészítettük az aktin citoszkeleton szabályozó enzimének, az **Arp2/3 komplex** karakterizálását a felnőtt rágcsáló hippokampusz dendrittüskekben is (Racz and Weinberg, 2008). Eredményeink szerint Arp2/3 komplex a tüskék nem-szinaptikus membránjához közel, de azzal nem asszociálódva egy sub-membrán torroidban helyezkedik el, ill. a tüskék geometriai középpontját is elkerüli. Új megfigyelésünk, hogy a komplex magasabb koncentrációt mutat a tüskék ún. endocitotikus zónájának területén (Racz et al., 2004), amely arra enged következtetni, hogy az Arp2/3 komplex – más modell rendszerekhez hasonlóan – aktív szerepet játszik a szinaptikus fehérje szállításban (synaptic protein trafficking).

Az Arp2/3 komplex a hosszú F-aktin filamentumokon hoz létre oldalágot, majd ezt az új ágat (daughter-filament) polimerizálja (Kiehart and Franke, 2002; Welch and Mullins, 2002; Pollard, 2007). Eredményeink szerint tehát a dendrittüskekben az enzim pozíciója a legkomplexebb aktin-hálózat helyét jelzi, és nagy valószínűséggel alapvető szerepet játszik a denrittüskek fejformájának kialakításában, ezáltal az aktivitásfüggő tüske-fejforma szabályozásában. (Racz and Weinberg, 2008) – ezt a cikket a megjelent számban kiemelték a szerkesztők és kommentárt is fűztek hozzá, ld. melléklet).

Eddigi eredményeink az alábbi 2 ábra segítségével foglalhatóak össze:



1. ábra. 3 aktin-szabályozó fehérje megoszlása tüske citoplazmájában: immunarany jelölés, kvantitatív vizsgálat. Cofilin a membránhoz közel, cortactin a tüske közepén, míg az Arp2/3 komplex e kettő között található nagy koncentrációban. (Racz and Weinberg 2005, 2006, 2008)



2. ábra. Aktin-szabályozó fehérjék megoszlása dendrittüskekben, sematikus ábrázolva. Cofilin (zöld csillagok), Arp2/3 (piros cseppek), és cortactin (sárga korongok), térben egymástól elkülönülten fordulnak elő, hogy a „tüskevázat” (G- és F-aktin, fehér körök) optimálisan, a megfelelő funkciókkal ellássák. Valószínűleg az egyes szabályozási folyamatok optimalizálása miatt szükséges ez a megoszlás.

Megállapítható, hogy a dendrittüskék vázát alkotó citoskeleton szerveződéséről igen fontos, új ismeretek birtokába jutottunk kutatásaink során, eredményeink feltárták az aktin hálózat szabályozásában résztvevő néhány alapvető enzim megoszlását. Valószínűsíthető, hogy kóros elváltozások megzavarják ezt a stabil molekuláris felépítményt, ami könnyen befolyásolhatja a szinaptikus információátvitelt, mentális, pszichiátriai tüneteket eredményezve.

További vizsgálataink az aktin citoskeleton és az endocitotikus zóna kapcsolatára irányultak.

Az endocitózis fontos szerepet játszik a PSD-ből kiinduló fehérje szállításban, amely a szinaptikus plaszticitási folyamatok alapjául szolgáló egyik legfontosabb mechanizmus. Korábbi, ultrastrukturális munkánk egy új, laterális elhelyezkedésű területet fedezett fel a dendrittüskében (laterális domain), ahol az endocitózis molekuláris komponensei rendkívüli rendezettségben találhatók (Racz et al., 2004). Kimutattuk, hogy három, az endocitózisban résztvevő fehérje tartósan jelen van a PSD-sal szomszédos, de attól eltérő membrán régióban (az ún. „endocitotikus zóná”-ban), amely egy specializált, fehérjeszállításra „szakosodott” terület, másnéven „domain” jelenlétére utal.

A dendrittüskékben magas koncentrációban található szerkezeti fehérje az aktin (Matus, 2000), amely mind a PSD-ban található (Wyszynski et al., 1998; Qualmann et al., 2004), mind az endocitózisban részt vevő fehérjékhez kötődik (Schafer, 2002; Gundelfinger et al., 2003). Tehát feltételezhető, hogy az aktin-citoskeleton nemcsak kapcsoló, de koordináló szereppel is rendelkezik e két funkcionális egység között. Kíváncsiak voltunk arra, hogy valóban játszik-e az aktin citoskeleton aktív szerepet a két domain koordinálásában, az endocitotikus zóna helyének meghatározásában, hiszen mind az aktin szabályozásban résztvevő fehérjék, mind az szinaptikus fehérje reciklálásában (szinaptikus endocitózisban) résztvevő molekulák (pl. az Arp2/3 komplex is) a dendrittüskék egy meghatározott területén (az ún. endocitotikus zónában, EZ) magasabb koncentrációban vannak jelen. Ezért megvizsgáltuk a kettő közötti kapcsolatot. Kézenfekvő volt a feltételezés, hogy az aktin citoskeleton alapvető szerepet játszik az endocitotikus domain helyének meghatározásában, annak kijelölésében.

Ehhez egy már korábban vizsgált molekulát, a dynamin-t választottuk, hiszen nem csak az endocitotikus vezikula-képzésben játszik kulcsszerpet, de az aktin citoskeleton is e molekula segítségével teremt kapcsolatot a membránról leváló clathrin-burkos vezikulával (Schafer, 2004). Sőt, a már levált burkos vezikulát az aktin citoskeleton mozgatja a dendrittüskében (Qualmann and Kessels, 2002). Eredményeink szerint az aktin citoskeleton nem játszik aktív szerepet az EZ helyének kialakításában, hanem a dynamin szinaptikus fehérjékkel (Shank, Homer) kialakított kapcsolata játssza a kulcsszerpet az EZ helynek kijelölésében (Lu et al., 2007).

Záró megjegyzések - a költségtervtől történő jelentősebb eltérések, azok okai és hatása a kutatás folyamatára, különös tekintettel a pályázathoz és a kutatási szerződéshez viszonyított esetleges eltérésekre:

Sajnos a posztdoktori pályázathoz semmilyen KUTATÁSra fordítható forrást jelen OTKA pályázat nem biztosított, annak ellenére, hogy a kutatási tervhez mellékelt pénzügyi tervben a 3 évre mintegy 12 millió Ft lett megjelölve. Tehát az elvégzett munka és az összesen 20 fölötti impact faktoral rendelkező publikációkat 100%-ban nem pályázati forrásokból származó finanszírozásból, pl. a külföldi kollaboráló kollégák pl.: Richard Weinberg és Michael Ehlers nagylelkűségének köszönhető. Számos esetben saját jövedelem terhére történtek költségek, pl. a Journal of Neuroscience 450\$-os publikációs díjának felét saját pénzből fedeztem. Ezek a tények sajnos igen megnehezítették a 3. project teljes befejezését. Meglátásom szerint az OTKA szabályzatot a jövőben úgy lenne érdemes módosítani, hogy posztdoktori kutatást csak akkor lehessen támogatni, ha hozzá kutatásra fordítható anyagi forrást is tudnak biztosítani. Jelen esetben igen szerencsés vagyok, hogy korábbi munkahelyem támogatta a kutatást – bár ezt nem hivatalosan tette, természetesen csak addig, amíg ezek ott is rendelkezésre álltak. Végezetül engedjék meg, hogy hálásan megköszönjem utólag is az ösztöndíj odaítélését, amely véleményem szerint igen értékes és fontos eredményekkel gazdagította a tudományos eredmények palettáját, a dendrittüskéről alkotott általános felfogást. Továbbá lehetővé tette, hogy az Egyesült Államokból hazaköltözzek, és magyarországi laboratóriumban végezhessem a kísérleteket. Remélem, hogy a jövőben is számíthatok az OTKA tudományos/kutatási pályázataira.

This Week in The Journal

● Cellular/Molecular

Actin-Branching Protein Localization in Spines

Bence RÁCZ and Richard J. Weinberg

Dendritic spines start as thin filaments, but as their synapses strengthen, they evolve into short mushroom-shaped structures, presumably due to changes in the actin cytoskeleton. Actin dynamics are regulated by actin-binding proteins, some of which are concentrated in discrete domains of the spine. This week, RÁCZ and Weinberg describe the localization of a protein involved in actin branching, based on immunoelectron microscopy. By averaging data from many spines, the authors found that ARPC-2, a part of the Arp2/3 protein complex, is concentrated in a ring at a fixed distance from the plasma membrane, about halfway between the spine neck and the postsynaptic density. This region was previously defined as an endocytic zone, rich in proteins involved in activity-dependent endocytosis and receptor trafficking. This is consistent with previous evidence that Arp2/3 is involved in clathrin-coated vesicle formation and movement. The localization also suggests that Arp2/3 as a potential mediator of synaptic plasticity.

Irodalomjegyzék

- Ackermann M, Matus A (2003) Activity-induced targeting of profilin and stabilization of dendritic spine morphology. *Nat Neurosci* 6:1194-1200.
- Bamburg JR, Bernstein BW (2008) ADF/cofilin. *Curr Biol* 18:R273-275.
- Bamburg JR, McGough A, Ono S (1999) Putting a new twist on actin: ADF/cofilins modulate actin dynamics. *Trends Cell Biol* 9:364-370.
- Carlisle HJ, Kennedy MB (2005) Spine architecture and synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 28:182-187.
- Fiala JC, Spacek J, Harris KM (2002) Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders? *Brain Res Brain Res Rev* 39:29-54.
- Fifkova E, Delay RJ (1982) Cytoplasmic actin in neuronal processes as a possible mediator of synaptic plasticity. *J Cell Biol* 95:345-350.
- Fukazawa Y, Saitoh Y, Ozawa F, Ohta Y, Mizuno K, Inokuchi K (2003) Hippocampal LTP is accompanied by enhanced F-actin content within the dendritic spine that is essential for late LTP maintenance in vivo. *Neuron* 38:447-460.
- Gundelfinger ED, Kessels MM, Qualmann B (2003) Temporal and spatial coordination of exocytosis and endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:127-139.
- Hering H, Sheng M (2003) Activity-dependent redistribution and essential role of cortactin in dendritic spine morphogenesis. *J Neurosci* 23:11759-11769.
- Kennedy MB (2000) Signal-processing machines at the postsynaptic density. *Science* 290:750-754.
- Kiehart DP, Franke JD (2002) Actin dynamics: the Arp2/3 complex branches out. *Curr Biol* 12:R557-559.
- Lu J, Helton TD, Blanpied TA, Racz B, Newpher TM, Weinberg RJ, Ehlers MD (2007) Postsynaptic positioning of endocytic zones and AMPA receptor cycling by physical coupling of dynamin-3 to Homer. *Neuron* 55:874-889.
- Matsuzaki M, Ellis-Davies GC, Nemoto T, Miyashita Y, Iino M, Kasai H (2001) Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat Neurosci* 4:1086-1092.
- Matus A (2000) Actin-based plasticity in dendritic spines. *Science* 290:754-758.
- Meng Y, Zhang Y, Tregoubov V, Falls DL, Jia Z (2003) Regulation of spine morphology and synaptic function by LIMK and the actin cytoskeleton. *Rev Neurosci* 14:233-240.
- Nimchinsky EA, Sabatini BL, Svoboda K (2002) Structure and function of dendritic spines. *Annu Rev Physiol* 64:313-353.
- Nusser Z (2000) AMPA and NMDA receptors: similarities and differences in their synaptic distribution. *Curr Opin Neurobiol* 10:337-341.
- Pollard TD (2007) Regulation of actin filament assembly by arp2/3 complex and formins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 36:451-477.
- Pollard TD, Borisy GG (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112:453-465.
- Qualmann B, Kessels MM (2002) Endocytosis and the cytoskeleton. *Int Rev Cytol* 220:93-144.
- Qualmann B, Boeckers TM, Jeromin M, Gundelfinger ED, Kessels MM (2004) Linkage of the actin cytoskeleton to the postsynaptic density via direct interactions of Abp1 with the ProSAP/Shank family. *J Neurosci* 24:2481-2495.
- Racz B, Weinberg RJ (2006) Spatial organization of cofilin in dendritic spines. *Neuroscience* 138:447-456.

- Racz B, Weinberg RJ (2008) Organization of the Arp2/3 complex in hippocampal spines. *J Neurosci* 28:5654-5659.
- Racz B, Blanpied TA, Ehlers MD, Weinberg RJ (2004) Lateral organization of endocytic machinery in dendritic spines. *Nat Neurosci* 7:917-918.
- Schafer DA (2002) Coupling actin dynamics and membrane dynamics during endocytosis. *Curr Opin Cell Biol* 14:76-81.
- Schafer DA (2004) Regulating actin dynamics at membranes: a focus on dynamin. *Traffic* 5:463-469.
- Star EN, Kwiatkowski DJ, Murthy VN (2002) Rapid turnover of actin in dendritic spines and its regulation by activity. *Nat Neurosci* 5:239-246.
- Trachtenberg JT, Chen BE, Knott GW, Feng G, Sanes JR, Welker E, Svoboda K (2002) Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature* 420:788-794.
- Walikonis RS, Jensen ON, Mann M, Provance DW, Jr., Mercer JA, Kennedy MB (2000) Identification of proteins in the postsynaptic density fraction by mass spectrometry. *J Neurosci* 20:4069-4080.
- Welch MD, Mullins RD (2002) Cellular control of actin nucleation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18:247-288.
- Wyszynski M, Kharazia V, Shanghvi R, Rao A, Beggs AH, Craig AM, Weinberg R, Sheng M (1998) Differential regional expression and ultrastructural localization of alpha-actinin-2, a putative NMDA receptor-anchoring protein, in rat brain. *J Neurosci* 18:1383-1392.
- Yuste R, Majewska A, Holthoff K (2000) From form to function: calcium compartmentalization in dendritic spines. *Nat Neurosci* 3:653-659.
- Zhou L, Martinez SJ, Haber M, Jones EV, Bouvier D, Doucet G, Corera AT, Fon EA, Zisch AH, Murai KK (2007) EphA4 signaling regulates phospholipase Cgamma1 activation, cofilin membrane association, and dendritic spine morphology. *J Neurosci* 27:5127-5138.
- Zhou Q, Xiao M, Nicoll RA (2001) Contribution of cytoskeleton to the internalization of AMPA receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:1261-1266.