

OTKA 83830 kutatás zárójelentés 2015:

Az elmúlt négy évben a kutatóhelyen végzett munkák eredményeképpen rendkívül izgalmas eredmények születtek, ill. vannak születőben jelenleg is. Kutatásaink fókuszában immár másfél évtizede az emlős előagy serkentő működésű glutamaterg ún. tüskeszinapszisai állnak. A dendrittüskékre már régen felfigyelt az agykutató társadalom: ismert, hogy méretük és szinaptikus hatékonyságuk igen szoros összefüggést mutat. A tüskék térfogata önmagában meghatározza a posztzinaptikus receptív felszín (a posztzinaptikus denzitás, PSD) méretét, a glutamát receptorok számát és a preszinaptikus ingerületre adott válasz magnitúdóját: nagyobb tüskék több receptorral rendelkeznek és hatékonyabb szinaptikus ingerület-átvitelre képesek. Az olyan stimulusok, amelyek tartós szinaptikus hatásnövekedést képesek kiváltani – amelyet a tanulás és memória idegrendszeri alapfolyamatának is tekintünk – tüskeméret növekedéssel és több glutamát receptor szinapszisba helyeződésével, míg a tartós szinaptikus hatáscsökkenés tüske-zsugorodással és receptor-szám csökkenéssel járnak. A neuronális jelátvitelben sarkaltos szerepet játszó tüskeszinapszisok alakját a bennük található dinamikus aktin citoskeleton határozza meg. Az aktin egy globuláris monomerekből (G-aktin) enzimatisz szabályozófehérjék segítségével fonalakká polimerizálódó (F-aktin) mikrofilamentum típus, amely evolúciósan igen konzervált módon egyaránt jelen van az egysejtűekben és a legfejlettebb emlősök sejtjeiben, így az idegsejtekben is. Az idegsejtek felszínén található tüskék aktivitás-függő morfológiai változásának alapjául is elsősorban az aktin-hálózat dinamikus átépülése áll. Ez az ún. aktivitás-függő aktin reorganizáció igen komplex kapcsolatra utal az idegi impulzusokat közvetlenül felfogó glutamát receptorok és az aktin-alapú „tüskeváz” között.

A kutatási időszakban elvégzett munkánk a tüskék strukturális megjelenésében bekövetkező változásokra fókuszált, génkiütött (KO), transzgenikus állatokban, *in vitro* rendszerekben valamint metabolikus változások során. Vizsgáltunk továbbá a tüskék alakjához és a szinaptikus sejt felszíni fehérjék diffúziójához alapvetően szükséges

egyéb citoszkeletális elemeket is. Az kutatási periódus alatt hazai és nemzetközi kollaborációs munka révén jöttek létre azok az eredmények, amelyeknek köszönhetően ma már sokkal jobban ismerjük ezen szinaptikus kapcsolatok szerkezetét és működését.

I. A szinaptikus-citoszkeleton: az aktin és szabályozásában résztvevő fehérjék

a) A túske-szerkezetről alkotott felfogásunk egyik jelentős állomása, hogy az előagyi serkentő szinapszisokról publikált, alapvetően elektronmikroszkópos (ultrastrukturális) és funkcionális adatok alapján egy új túske-modellt dolgoztunk ki (Rácz & Weinberg 2013). Megállapítottuk, hogy a dendrittüskékben az egyes aktin-reorganizációs feladatokat ellátó enzimek szegregáltak, szinte funkcionális kompartmentekben fordulnak elő. Az azóta eltelt rövid időszakban is jelentős mennyiségű hivatkozás érkezett erre a munkánkra.

b) A tüskékben található biokémiai „gépezet” tehát koncentráltan és igen szigorúan kompartmentalizálva tartalmazza a hatékony szinaptikus jelátvitelhez elengedhetelen jelátvivő és aktin-szabályozó fehérjéket. Ezen fehérjék közül többről kimutatták, hogy alapvető szerepet játszhatnak nemcsak a normál, hanem a esetlegesen a kóros idegrendszeri működésekben, mentális zavarokat okozva. Az idegsejtek szinaptikus receptorai (pl. AMPA ill. NMDA receptorok) által fogadott információt az ún. Rho/Rac GTPáz szignál-transzdukciós molekulák közvetítik a citoplazmában található szabályozó enzimeknek, többek között a WAVE-1 fehérjének is, amely továbbítja az információt az aktin-hálózat átépítéséért közvetlenül felelős Arp2/3 komplexnek. Az általunk vizsgált WAVE-1 fehérje számos szignalizációs útvonal felől képes begyűjteni és integrálni az információt, majd ezt továbbítja az aktin citoszkeleton felé az Arp2/3 komplex szabályozásán keresztül. A szinaptikus dendrittüskékben korábban már kimutattuk az Arp2/3 komplex jelétét (Rácz et al, 2008). Érdekes módon számos, az

Arp2/3 és WAVE-1 fehérjék upstream szabályozásában bekövetkező szignalizációs hiba (melynek gyakran genetikai okai vannak) súlyos neuropszichiátriai kórképek kialakulásához vezetnek. Az elmúlt kutatási periódusban számos elektronmikroszkópos vizsgálatot végeztünk, amely ennek a szignalizációs útnak a meghibásodásával foglalkozott. Érdekes módon, ha az Arp2/3 komplex egyik fehérje alegysége (ArpC3) felnőtt korban, indukáltan kiütésre került (conditional knock-out, cKO), akkor az állatok hippocampuszában és agykérgében az általunk szintén ebben a kutatási periódusban leírt, a WAVE-1 KO állatokban is megfigyelt (Hazai et al. 2013) aberráns szinaptikus morfológia alakult ki: a tüskék ellaposodnak, ahelyett hogy klasszikus 'gomba' morfológiájúak lennének, szinaptikus felszíneik lényeges eltéréseket mutatnak, és preszinaptikus axonterminálisokkal eddig még nem ismert morfológiájú kapcsolatokat hoznak létre, melyek funkcionálisan is különböznek a vad-típusú állatokban megfigyelt szinapszisoktól (Hazai et al, 2013, Kim IH et al, 2013, Rácz et al, 2014) .

A citoszkeleton ezen kulcsfontosságú szabályozóinak vizsgálatát természetesen tovább folytattuk, mivel rendkívül izgalmas funkcionális és esetenként klinikai vonatkozások feltárására nyílik lehetőség. Megfigyeltük, hogy a hippocampuszon kívül a frontális kéreg (frontal cortex-FC) túskezeszinapszisainak hasonló elváltozása alapvető szerepet játszanak a skizofrénia-jellegű mentális zavarok kialakításában. Az itt található, kóros túskezeszinapszisokkal rendelkező piramis sejtek hyperaktívá válnak; mivel ezek a sejtek megfigyeléseink szerint közvetlen kapcsolatban állnak a substantia nigra tyrozin-hydroxiláz (TH) sejtjeivel (amelyek a striatalis dopamin termelésért szinte kizárólagosan felelősek), feltételeztük, hogy ezek lehetnek felelősek a megemelkedett striatalis dopamin szintért, amely a skizofrénia egyik jellemzője. Kísérleteink során bebizonyítottuk, hogy valóban, a frontális kéreg piramis sejtjeinek túskegedeformációja tehető felelőssé ezen ideghálózat kóros működéséért, amellyel új perspektívát nyitottunk a skizofrénia megértéséhez (Kim IH.et al, 2015). Eredményeinket a legrangosabb idegtudományi szaklapban publikáltuk (Nature Neuroscience).

c) Igen fontos szabályozó funkcióval bír a cofilin nevű, elsősorban aktin depolimerizációért felelős fehérje is, melynek szerepét a szinaptikus plaszticitásban már régóta ismerjük. Az a szignalizációs útvonal, amely a cofilin aktivitását befolyásolja szinaptikus aktivitás során, kevésbé ismert. Egyik lehetséges upstream szabályozó lehet a protein kináz D (PKD), hiszen az már ismert, hogy egyéb, nem neuronális sejtekben stabilizálja az F-aktin hálózatot. Transzgenikus egerek hippocampusán végzett elektronmikroszkópos vizsgálatainkkal kimutattuk, hogy a PKD hiánya megváltoztatja a tüskék morfológiáját és a tüskefej/PSD arány jelentősen eltér a kontroll állatokétól. Eredményeink szerint a PKD a cofilin és/vagy cortactin szabályozásán keresztül fejt ki ezt a hatását (Bencsik et al. 2015 - *in press*). Mindezen túl – kollaborációban Schlett Katalin (ELTE) és Klaus Pfizenmayer (Universität Stuttgart) kutatócsoportjával - kognitív zavarokat is találtunk ezeknél az egereknél.

d) A coronin aktin kötő fehérje tervezett vizsgálata technikai okokból részben meghiúsult. Hegedűs Tamás laboratóriumában teszteltük a piacon elérhető összes antitestet, amelyekről bebizonyosodott, hogy nem megbízhatóan és nem specifikusan jelöli a fehérjét. Kértünk Mark F. Bear (UNC, NC, USA) laboratóriumából is antitestet, hiszen a coronin funkciót *in vitro* Ő írta le. Sajnos az sem bizonyult immunhisztokémia vizsgálatokra alkalmasnak, így a coronin dendrittüskékben való detektálását rajtunk kívül álló okok miatt nem tudtuk elvégezni.

II. Metabolikus hatásokra bekövetkező szinaptikus változások

a) Az elmúlt 4 éves kutatási periódusban TDK-s hallgatók bevonásával végeztünk el több, nagyszabású kísérletsorozatot, amelyben a csökkentett táplálékbevitel hatásait vizsgáltuk. Babits Réka III. éves állatorvostan hallgató a kari TDK konferencián különdíjas lett. Az különböző ideig csökkentett takarmánymennyiségen tartott ill. kontroll állatok CT vizsgálatának kivitelezése (testzsír—izom arány változás) is folyamatosan zajlik a Kaposvári Egyetem Állattudományi Kar Diagnosztikai és Onkoradiológiai

Intézetében lévő, kisállatok vizsgálatára is alkalmas Siemens Cardio CT-készülékével. Kidolgoztunk egy olyan protokollt, amely során a vizsgált állatokat elég a perfúziós fixálást követően, az agy eltávolítása után a CT vizsgálati helyszínre szállítani. Így élő állatot nem teszünk ki a hosszadalmas szállításnak, és a kapott eredmények is sokkal megbízhatóbbak lesznek, nem játszik pl. a stressz, mint módosító tényező közre. Minden kísérletbe bevont, már fixált patkány cadaverről 1mm-es rétegvastagságú CT sorozatfelvétel készült; ezen digitális felvételek analízise jelenleg is folyamatban ill. publikálás van. Eredményeink szerint nincsen szignifikáns különbség az élő de altatott ill. a fixált és 4°C-ra hűtött cadaverek CT vizsgálatnál kinyerhető paramétereinek között.

Kvantitatív elektronmikroszkópos vizsgálataink szerint négy hétig tartó, 40%-al csökkent táplálékbevitel jelentősen és szignifikánsan megnövelte a komplex szinaptikus felszínnel (ún. perforált szinapszissal) rendelkező kapcsolatok arányát a kontroll, ad-libitum etetett állatokhoz képest. Ez az eredmény rávilágít a hippocampus esetleges érintettségére a metabolikus folyamatok szabályozásában, hiszen eddig nem volt arról ismeretünk, hogy rövid ideig tartó csökkent táplálékbevitel átrendeződést indukálna egy olyan agyterületen, amely közvetlenül nem vesz részt a táplálékfelvétel szabályozásában. A kézirat jelenleg bírálat alatt van a Hippocampus (Wiley) folyóiratban; megjegyzendő azonban, hogy a CT vizsgálatok eredménye és az óriási mennyiségű elektronmikroszkópos felvétel vizsgálata nem fejeződik be a jelentési időszak végéig, az elkövetkezendő hónapokban is számos új eredmény fog napvilágot látni.

b) Ezen eredmények mentén az elmúlt két évben nagyszámú hím ill. nőstény patkányon elvégzett kísérlet-sorozatot is elvégeztünk, melynek során az állatok táplálékban különböző fajtájú szénhidrátforrások voltak (keményítő, glükóz, fruktóz, ill. ezek különböző arányú keverékei). Ez utóbbi kísérletsorozat kiértékelése jelenleg is tart laboratóriumomban, az eredmények feldolgozása és publikálása az elkövetkezendő évben várható.

III. Septin-komplex szerepe a dendrittüskék fehérje-szállításában

Mivel a coronin vizsgálata elektronmikroszkópos szinten nem volt lehetséges, ezért egy másik citoskeletális fehérje, a Septin családba tartozó Sept7 felé irányult a figyelmünk. Ismert, hogy a szinapszisokban található receptorok száma nemcsak a tüskék méretével korrelál, de a szinaptikus hatékonyságot is alapvetően befolyásolja. A serkentő dendrittüskék szinapszisaiban található receptorok mennyisége - többek között - laterális membrán-diffúzióval szabályozott. Számos eredmény mutatott rá arra, hogy a tüskék nyaka limitálja a fehérjék és egyéb membránkomponensek hozzáférését a tüske fejéhez. Azt azonban nem ismerjük pontosan, hogy a tüske nyak geometriája önmagában elegendő-e ehhez a folyamathoz, vagy egy aktív és szelektív diffúziós barrier kontrollja alatt áll a tüskébe/-ből irányuló transzport. Vizsgálatainkat egy, a GTPáz családba tartozó citoskeletális komplex, a Septin-7 (Sept7) vizsgálatára fókuszáltuk, amely komplex a fejlődés során stabilan a tüskék nyakánál a membrán belső oldalán lokalizálódik. Elektronmikroszkópos vizsgálataink egyértelműen kimutatták, hogy a Septin komplex a tüske-nyak szubmembrán görbületénél lokalizálódik, ami szerepet játszik a laterális membrán-diffúzióban. Eredményeinket a PLOS ONE lapban publikáltuk (Ewers H et al 2014.)

Végezetül engedjék meg, hogy hálásan megköszönjem kutatócsoportom nevében is a pályázatunk finanszírozását, amely véleményem szerint igen értékes és fontos eredményekkel gazdagította a tudományos eredmények palettáját, az emlős szinaptikus dendrittüskéről alkotott általános felfogást. Külön kiemelném, hogy rendkívül jelentős és rangos lapokban jelentek meg eredményeink, amelyeket mind aktív egyetemi oktatók oktatási feladataik mellett végzett elkötelezett kutatómunkája adta meg a lehetőséget.

Budapest, 2015. július 20.

Rácz Bence sk.

Hivatkozott irodalom

Rácz B, Weinberg RJ. (2008) Organization of the Arp2/3 complex in hippocampal spines.

The Journal of Neuroscience 28 (22) p.5654-5659.

Rácz, Bence; Weinberg, Richard J (2013) Microdomains in forebrain spines: an ultrastructural perspective *Molecular Neurobiology* 47 (1) p.77-89

Kim, Il Hwan; Racz, Bence; Wang, Hong; Burianek, Lauren; Weinberg, Richard; Yasuda, Ryohei; Wetsel, William C; Soderling, Scott H (2013) Disruption of Arp2/3 results in asymmetric structural plasticity of dendritic spines and progressive synaptic and behavioral abnormalities *The Journal of Neuroscience* 33 (14) p.6081-6092

Hazai, Diána; Szudoczki, Róbert; Ding, Jindong; Soderling, Scott H; Weinberg, Richard J; Sótónyi, Péter; Rácz, Bence; (2013) Ultrastructural abnormalities in CA1 hippocampus caused by deletion of the actin regulator WAVE-1, *PloS one* 8 (9) e75248

Racz, Bence; Hazai, Diana; Czeibert, Kalman; Sotonyi, Peter; (2014) Quantitative electron-microscopic investigation in a mouse model of cytoskeleton-related neurologic disorder** *MAGYAR ALLATORVOSOK LAPJA* 136 (1) p.52-58

Ewers, Helge; Tada, Tomoko; Petersen, Jennifer D; Racz, Bence; Sheng, Morgan; Choquet, Daniel; (2014) A septin-dependent diffusion barrier at dendritic spine necks *PloS one* 9 (12) e113916

Kim, Il Hwan; Rossi, Mark A; Aryal, Dipendra K; Racz, Bence; Kim, Namsoo; Uezu, Akiyoshi; Wang, Fan; Wetsel, William C; Weinberg, Richard J; Yin, Henry; (2015) Spine pruning drives antipsychotic-sensitive locomotion via circuit control of striatal dopamine *Nature Neuroscience* 18 (6) p.883-891

