

# A TŰSKESZINAPSZISOK SZERKEZETE

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

DR. RÁCZ BENCE  
EGYETEMI TANÁR  
ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM

*Úgy tűnik, a természet nincs tisztában a kényelem és az  
egység iránti intellektuális igényünkkel,  
és nagyon gyakran örömet leli a  
bonyolultságban és a sokféleségben.*

**Ramón y Cajal, 1906**

*Minden bemutatott mikroszkópos eredmény a szerző vagy munkacsoportban a szerző közvetlen szakmai irányítása alatt álló kutató (TDK hallgató, PhD hallgató, Posztdoktor) munkája; a szerző elemezte az ezekből a vizsgálatokból származó adatokat és írta az értekezés alapjául szolgáló publikációk releváns részeit.*

## Tartalomjegyzék

---

<b>Rövidítések jegyzéke és magyarázata .....</b>	<b>3</b>
<b>Bevezetés .....</b>	<b>5</b>
Az előagyi szinapszisok és a neuronális kommunikáció .....	5
Plasztikus jelátvitel a glutamáterg tüske-szinapszisokban .....	7
Posztzinaptikus endocitózis.....	11
A posztzinaptikus citoszkeleton (tüskeváz) .....	15
A dendrittüske-váz jelentősége neuropszichiátriai kórképekben .....	25
Táplálékbevitel csökkentés okozta változások a tüske-szinapszisok szerkezetében....	31
<b>Célkitűzések.....</b>	<b>32</b>
<b>Alkalmazott anyagok és módszerek.....</b>	<b>33</b>
Felhasznált állatok és szövettani mintavétel.....	33
Fénymikroszkópos mintafeldolgozás .....	37
Elektronmikroszkópos mintafeldolgozás .....	39
<b>Eredmények .....</b>	<b>43</b>
Endocitotikus zóna a tüskeszinapszisokban .....	43
Aktin-szabályozó fehérjék szerveződése a tüskékben .....	52
Tüskeszinapszisok szerkezete neuropszichiátriai modellekben .....	81
Táplálék-bevitel csökkentés okozta szinaptikus változások .....	99
<b>Megvitatás és Következtetések .....</b>	<b>105</b>
Endocitotikus zóna jelentősége a tüskeszinapszisokban .....	105
Az aktin-szabályozó fehérjék mikrodoménekbe szerveződnek .....	108
A tüske-szinapszisok szerkezete egyes kórképekben.....	116
A táplálkozás hatása a tüskeszinapsziokra .....	120
<b>Összefoglalás .....</b>	<b>123</b>
<b>Köszönetnyilvánítás .....</b>	<b>124</b>
<b>Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények.....</b>	<b>125</b>
<b>Az értekezéshez fel nem használt saját közlemények .....</b>	<b>126</b>
<b>Publikációs mutatók az értekezés beadásakor .....</b>	<b>127</b>
<b>Irodalomjegyzék .....</b>	<b>128</b>

## Rövidítések jegyzéke és magyarázata

---

**AL:** *ad libitum*; az így táplált állatok korlátlan mennyiségben juthatnak takarmányhoz, amikor csak kedvük tartja

**AMPA:** *α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionsav*, az AMPA-típusú glutamát receptorok specifikus agonistája

**AP-2:** *Adaptor Protein-2*, a transzmembrán cargo és a clathrin közötti fizikai összeköttetést megteremtő, endocitózisban szerepet játszó fehérje

**ASD:** *Autism Spectrum Disorder* – Autizmus spektrum-betegség

**CaMKII:** *Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II* - *Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-függő fehérje kináz II*

**CA1-3:** A hippocampus klasszikus, Cajal szerinti felosztása. A CA a latin *Cornu Ammonis-ammonszarv* rövidítése. Ezek régióit számokkal jelöljük (1-3)

**CF:** *climbing fiber* – kúszó rost, a kisagyi Purkinje sejtek dendritjeit innerválja

**DIV:** *days in vitro* – *in vitro* körülmények között eltöltött időtartam napokban kifejezve

**DiO:** *DiOC<sub>18</sub>(3)*, *Benzoxazolium*, *3-octadecil-2-[3-(3-octadecil-2(3H)-benzoxazolylidén)-1-propenil]-, perklorát*. A DiO, egy zöld fluoreszcens, lipofil karbocianin festék, amelyet lipofil nyomjelzőként használtunk

**EC:** entorhinális kéreg

**EPSP:** excitatórikus posztzinaptikus potenciál

**EZ:** endocitotikus zóna

**FR:** *Food-restriction, food-restricted* – az így táplált állatok esetében a napi táplálékbevitel mennyisége korlátozott volt; táplálékbevitel csökkentés

**GA:** glutáraldehid, az elektronmikroszkópiában leggyakrabban használt fixálószer

**GC:** *granule cell* – szemcse sejt

**GCL:** *granule cell layer* - szemcsesejt réteg

**GD/DG:** *Gyrus Dentatus/dentate gyrus*

**GFP:** *Green fluorescent protein* – zöld fluoreszcens fehérje

**G-protein:** Guanin nukleotid-kötő fehérje. A klasszikus G-fehérjék három alegységből állnak, egy  $\alpha$ , egy  $\beta$ , és egy  $\gamma$ . GTP kötődése az  $\alpha$  alegységhez jelátviteli útvonalakat képes beindítani. A monomer G-proteineket általában kis GTPázoknak hívjuk

**HNA:** homogén neuropil area/terület

**ID:** - *Intellectual Disorder* – értelmi fogyatékoság

**L1:** A neocortex legkülső, molekuláris rétege (*stratum moleculare*, I. réteg)

**L2/3:** A neocortex 2. ill. 3. rétege, (*stratum granulosum externum* ill. *stratum pyramidale*; II. ill. III. réteg)

**LTP:** *Long Term Potentiation*, tartós szinaptikus hatékonyság növekedés

**LTD:** *Long Term Depression*, tartós szinaptikus hatékonyság csökkenés

**MF:** *mossy fiber* – moharost

**mPFC:** mediális prefrontális kéreg

**NMDA:** *N-metil-D-aszpartát*, az NMDA glutamát receptorok specifikus agonistája

**PB:** foszfát puffer

**PC:** *Purkinje cell*- Purkinje sejt

**PCL:** *purkinje cell layer* - Purkinje-sejt réteg a kisagyban

**PF:** *parallel fiber* – párhuzamos rost a kisagy molekuláris rétegében; a szemcsesejtek axonja

**PFA:** paraformaldehid, a formaldehid (metanal) polimerje (polioximetilén); általánosan elterjedt és alkalmazott szövettani fixálószer

**PND:** *postnatal day* – születés után eltelt napok számszerűsítve

**PSD:** posztzinaptikus denzitás, a szinapszisok elektronmikroszkópban jól látható, több millió kDa fehérjemátrixból álló posztzinaptikus megvastagodása

**RFP:** *red fluorescent protein* – vörös fluoreszcens fehérje

**Rho GTPáz:** A Rho GTPázok a kis GTPázok egy családja, amelyek szerepe a szinaptikus tüskék fejlődésében, kialakulásában és szerkezeti plaszticitásában alapvető. RhoGTPázok szabályozzák az aktin-alapú ill. mikrotubuláris citoskeletonot.

**RNSi:** RNS interferencia – biológiai folyamat, amely során az RNS-molekulák részt vesznek a génexpresszió szekvencia-specifikus szuppressziójában (kettős szálú RNS beépülésével), translációs vagy transzkripciós represszió révén

**SNc:** Substantia nigra pars compacta

**SPF:** *Specific Patogen Free*, ismert kórokozótól mentes – laboratóriumi felhasználásra szánt állatok esetében használatos

**SZ:** Skizofrénia

**VTA:** Ventrális tegmentális area – ventrális tegmentum

**WAVE-1:** Wiscott-Aldrich Syndrome Verprolin homology fehérje – 1 izoforma

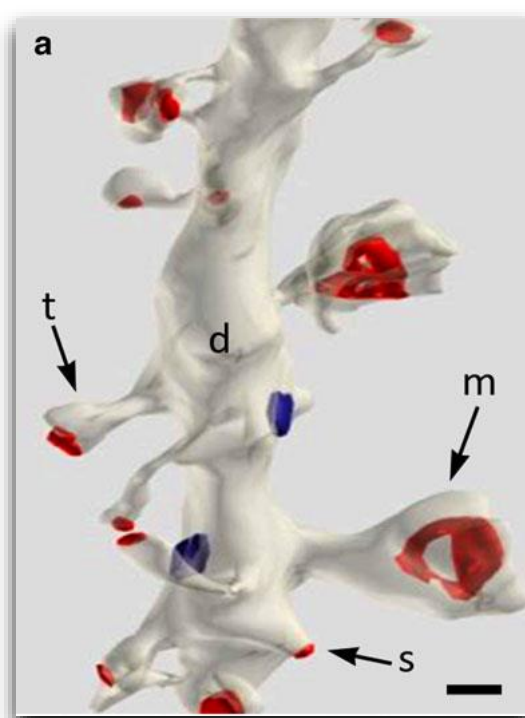
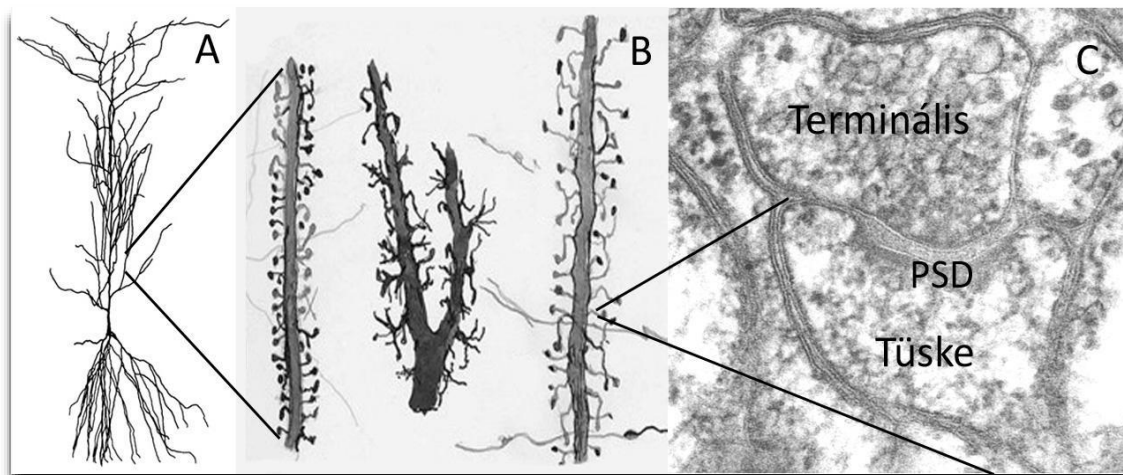
## Bevezetés

---

### Az előagyi szinapszisok és a neuronális kommunikáció

Az emberi agy mintegy 90 milliárd neuront tartalmaz (Herculano-Houzel, 2012), de az idegrendszeri kutatásokhoz leggyakrabban használt rágcsálók (pl.: egér vagy patkány) agyában is jóval több, mint 100 millió neuron található (Herculano-Houzel et al., 2006). Az emlős agy működése alapvetően ezen idegsejtek szinaptikus kapcsolatrendszerére épül (Kandel, 2013). Az idegsejtek számát jóval meghaladja a közöttük kialakuló kapcsolatok mennyisége: az agy fejlettségének függvényében ezek száma akár  $10^{11}$ - $10^{14}$  is lehet. Egy piramissejt több ezer szinaptikus „bemenetet” is fogadhat (Megias et al., 2001). Ha számításba vesszük az idegsejteknek bonyolult nyúlványrendszerét is (**1. A. ábra**), valamint azt, hogy a rájuk érkező kapcsolatok nem csak a fogadó nyúlványok (dendritek) felszínén oszlanak el változatosan, hanem aktivitásuk még időben is eltér egymástól, akkor egy rendkívül bonyolult, elektromosan és kémiaiilag aktív hálózat tárul elénk. Ebben a hálózatban igen komplex feladat hárul egy-egy idegsejtre a neuronális információfeldolgozás során. Ezzel a roppant feladattal megfelelő szinaptikus „gépezet” segítségével birkóznak meg az idegsejtek.

Az emlős előagyi ideghálózat túlnyomó többsége serkentő működésű, vagyis a szinaptikus kapcsolatok ingerülete áterjed a posztszinaptikus partnerre. A serkentő axonterminálisok döntő többsége - amelyek jelátvivő anyaga a szinaptikus vezikulákba csomagolt aminosav, a glutamát - azonban nem közvetlenül az idegsejtek nyúlványainak felszínén, hanem azok apró kitüremkedésein, ún. *dendrittüskéken* végződnek. Ezek a tüskék a beérkező ingerület feldolgozásra specializálódott, önálló biokémiai „mikroszámítógépek”, amelyek alapvető szerepet játszanak az általuk fogadott szinaptikus aktivitás feldolgozásában és továbbításában a dendrit-törzs ill. a sejttest felé. Jelenlétükre már *Ramón y Cajal* is felfigyelt. Cajal még nem tudhatta - hiszen az 1900-as évek elején még nem létezett elektronmikroszkóp - hogy ezek a tüskék valójában az ingerület feldolgozására és közvetítésére szakosodott dinamikus szinaptikus kapcsolatok (**1. B. ábra**).



**1. ábra. Felső panel:** **A.** Egy agykérgi piramisisejt morfológiája (neurolucida rajz) **B.** Ramón y Cajal rajza különböző tüskés dendritszakaszokról; (Ramón y Cajal, 1952). **C.** Serkentő tüske-szinapszis elektronmikroszkópos képén jól felismerhető a vezikulákkal teli axonterminális, a dendrittüske és a poszt-szinaptikus denzitás (PSD). A tüske fejében lévő fonal-hálózat az aktin citoszkeleton, amely a tüskevázat építi fel. **Alsó panel:** **a.** A dendritikus tüskék megjelenése az elektronmikroszkópban. Ultravékony sorozatmetszetek 3D rekonstrukciója a dendritikus tengely ugyanazon szegmensén a vékony (t - thin) és a gomba (m - mushroom) alakú tüskékkel együtt a tönkszerű (s - stubby) tüskéket mutatja. A serkentő poszt-szinaptikus denzitások (szinaptikus kontaktusok) vörös színűek, míg a gátló szinapszisok (jellemzően közvetlenül a dendrit-törzsön) kék színűek. A kép a <http://synapses.clm.utexas.edu/anatomy/compare/compare.stm> oldalról származik, J. Spacek szíves engedélyével. Méretsáv: 200 nm

A központi idegrendszerben az egyes neuronok dendritjeivel akár több ezer serkentő szinaptikus végződés is kapcsolatba léphet, amelyek különböző forrásokból/modalitásokból

származó információt továbbítanak. Az egyes szinapszisokban a posztszinaptikus membrán az első hely, ahol az információ feldolgozása megtörténik. A serkentő szinapszisok posztszinaptikus membránján a neurotranszmitter-receptorok fehérje alapú szignalizációs gépezetéhez kapcsolódnak, amelyek képesek szabályozni és finomhangolni a szinaptikus átvitel erősségét. Ezen fehérjék posztszinaptikus felhalmozódása látható az elektronmikroszkópban, amit posztszinaptikus denzitásnak (PSD) nevezzük (1. C. ábra). A PSD azáltal, hogy az idegi aktivitásra reagálva változtatja a molekuláris összetételét és így a szinaptikus erősséget, hozzájárul az információ-feldolgozáshoz és akár az emlékek vagy memórianyomok kialakulásához is.

A dendrittüskék régóta a tudományos figyelem fókuszában állnak. Megállapították, hogy méretük és szinaptikus hatékonyságuk igen szoros összefüggést mutat. A tüskék térfogata erősen korrelál a posztszinaptikus receptív felszín ill. a posztszinaptikus denzitás méretével, az itt található glutamát receptorok számával és a preszinaptikus ingerületre adott válasz magnitúdójával is: nagyobb tüskék több receptorral rendelkeznek és hatékonyabb szinaptikus ingerületátvitelre képesek. Az olyan stimulusok, amelyek tartós szinaptikus hatás- vagy hatékonyságnövekedést képesek kiváltani – amelyet egyébként a tanulás és memória idegrendszeri alapfolyamatának is tekintünk – tüskeméret növekedéssel és több glutamát receptor szinapszisba helyezésével, míg a tartós szinaptikus hatás- vagy hatékonyságcsökkenés tüske-zsugorodással és receptor-szám csökkenéssel járnak. A receptorok szinapszisba szállítását a tüskén belül szelektív ún. endoszóma rendszer végzi. A tüske-szinapszisok alakja tehát nem állandó, a szinapszisok molekuláris változásait szorosan követik a tüskék morfológiájában bekövetkező változások (1. a. ábra).

## Plasztikus jelátvitel a glutamáterg tüske-szinapszisokban

A glutamáterg szinapszisok közvetítik a gyors szinaptikus átvitelt a központi idegrendszerben és képesek tartós változásokra kommunikációs képességükben és tulajdonságaikban. A hatékonyság e tartós változásait gyakran hosszú távú plaszticitásnak vagy másnéven tartós (szinaptikus) hatékonyságnövekedésnek (*long term potentiation* – LTP), vagy hatékonyságcsökkenésnek (*long term depression* – LTD) nevezik. A klasszikus glutamáterg tüske-szinapszis egy preszinaptikus idegvégződés és egy posztszinaptikus dendrittüske közötti kommunikációs pont (1. C. ábra).



A serkentő tüskeszinapszisok működése két fő receptortípuson alapul, amelyeket az aminosav glutamát aktivál: az egyik az az  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionsav receptorok (AMPA-receptorok - AMPAR), a másik típus pedig az *N*-metil *D*-aszpartát receptor-csatorna. Ez a két receptor - amelyek eltérő élettani tulajdonságokkal rendelkeznek - gyakran egymás mellett fordulnak elő ugyanabban a tüske-szinapszisban, vagyis a legjobban ismert hippokampális CA1 stratum radiatumában előforduló tüskeszinapszisok is mindkét receptortípust tartalmazzák. Amikor a preszinaptikus idegvégződés gyenge elektromos ingerlése glutamát felszabadulását okozza az axonvégződés szinaptikus vezikuláiból, a glutamát mind az NMDA, mind az AMPA receptorokhoz kötődik. Ez a gyenge ingerlés általában csak az AMPA receptorokat aktiválja, ami a posztzinaptikus neuron enyhe depolarizációját eredményezi. Amikor a glutamát ilyen enyhén depolarizált vagy nyugalmi membránfeszültségen az NMDA receptorhoz kötődik, nagyon kevés ion áramlik át a csatornán. Ez az alacsony vezetőképesség azért következik be, mert a csatorna pórusát magnézium-ionok blokkolják, ami megakadályozza, hogy más ionok szabadon áthaladjanak a csatornán. Ilyen körülmények között az EPSP-t teljes egészében az AMPA receptorok közvetítik. Amennyiben megfelelő erősségű vagy frekvenciájú inger érkezik az adott axonterminálison keresztül, az AMPA receptorok képesek a membránt eléggé depolarizálni ahhoz, hogy a magnézium elhagyja az NMDA-csatornát. Így az NMDA-csatorna már aktívan reagál a glutamátra, és nemcsak Na<sup>+</sup>-ionokat, hanem nagy mennyiségű Ca<sup>2+</sup>-t is átenged (Luscher and Malenka, 2012).

A Ca<sup>2+</sup> fontos másodlagos hírvivőként működik, számos intracelluláris jelátviteli kaszkádot aktiválva. Például a Ca<sup>2+</sup> az ún. kalcium kalmodulinhoz kötődve számos fehérje kinázt aktivál, köztük a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-függő fehérje kináz II-t (CaM-kináz II, CaMKII). A CaMKII kétféleképpen hat az AMPA-receptorokra: először is foszforilálja a dendrittüske membránjában már jelen lévő AMPA-receptorokat, ezáltal növelve azok nátrium-ionokkal szembeni áteresztőképességét. A CaMKII elősegíti továbbá az AMPA-receptorok tüskemembránba helyeződését az intracelluláris raktárakból, így több receptor áll rendelkezésre a posztzinaptikus membránban (Sanhueza et al., 2011). Az AMPA-receptorok számának növekedése következtében az adott erősségű ingerre adott válasz erősebb lesz, mint az NMDA-receptorok aktiválódása előtt volt. Ebben a tekintetben a szinapszist „megerősítettnek” vagy potenciáltnak nevezzük, és ezt a fiziológiai változást tartják a tartós szinaptikus hatásnövekedés (*long term potentiation* - LTP) kifejeződés egyik mechanizmusának (2. ábra).

A tanulás és memóriafolyamatok alapjának tekinthető LTP (ill. LTD) egyik fő összetevője tehát az AMPA-receptorok újraszerveződése a posztszinaptikus membránban. Annak ellenére, hogy hatalmas erőfeszítéseket tettek az ezen átrendeződés háttérében álló másodlagos hírvivő-molekulák és biokémiai mechanizmusok azonosítására, az alapvető kérdések továbbra is ellentmondásosak vagy homályosak maradnak. Az a meggyőződésem, hogy számos kérdést közvetlen anatómiai módszerekkel is meg lehet válaszolni, ennek bemutatása adja értekezésem alapjául szolgáló kutatómunkám gerincét.

Több évtizednyi kutatást néhány mondatba sűrítve: az előagyi piramisisejtek (elsősorban hippokampális sejtek vizsgálatán alapuló eredmények alapján) tüskéire érkező szinapszisoknál a tartós szinaptikus plaszticitás egyik fő összetevője *posztszinaptikus*. Az NMDAR-csatornákon keresztül a tüskékbe belépő  $Ca^{2+}$  egy intracelluláris biokémiai kaskádöt indít el (Sanhueza et al., 2011), amely a posztszinaptikus membrán esetében az AMPAR-ok szinapszisba illesztéséhez vagy onnan eltávolításához vezet (Heine et al., 2008, Triller and Choquet, 2005). Az LTP-vel járó gyors, masszív kalciumbevétel aktiválja a CaMKII-t (Ding et al., 2013, Bayer and Schulman, 2019), ami az AMPAR-ok intracelluláris raktárakból történő felszíni kifejeződéséhez vezet, excitotikus molekulák segítségével. Ezzel szemben az LTD-hez társuló lassabb és kisebb  $Ca^{2+}$  emelkedések foszfatázokat aktiválnak, ami az AMPAR-ok clathrin-mediált endocitózisához vezet a tüskemembránból (Benoist et al., 2013, Moretto and Passafaro, 2018). Ezen látszólag egyszerű történet mögött azonban számos rejtély és ellentmondás marad.

Számos kísérleti eredmény azt mutatja, hogy a posztszinaptikus membránban a receptorok koncentrikus szerveződésűek, a középpontban NMDA-receptorok koncentrálnak, körülötte AMPAR-ok, és a metabotróp glutamát-receptorok gyűrűje a PSD külső szélénél vagy azon túl helyezkedik el (Kharazia and Weinberg, 1997, Valtschanoff and Weinberg, 2001). Kvantitatív immunogold vizsgálatok kimutatták, hogy a PSD területe arányos az AMPAR-tartalommal, és például a hippokampális CA1 kis tüske-szinapszisaiból teljesen hiányozhatnak az AMPA-receptorok (Bourne and Harris, 2011, Harris and Weinberg, 2012). Ezzel szemben a PSD mérete és az NMDAR-tartalom között sokkal gyengébb kapcsolat van, így még a legkisebb szinapszisok is tartalmaznak NMDA-receptorokat. Ezek a megfigyelések anatómiai alapot nyújtanak az elektrofiziológiai megfigyelések magyarázatára javasolt posztszinaptikusan csendes szinapszisaik (Hanse et al., 2009).

A modellrendszerekben indukált LTP/LTD és a tanulás ill. memória háttérében feltehetően jelenlévő szinaptikus plaszticitás közötti pontos kapcsolat továbbra is bizonytalan,

de ma már széles körben elfogadott, hogy a jelenségek számos hasonló háttér-mechanizmuson osztoznak. Például a felnőtt hippokampusz szinapszisei a hatékonyság széles skáláját mutatják; ez a változatosság a szinaptikus súlyozás különböző fokozatait tükrözi az állat élete során. Így egy nagy, AMPAR-ban gazdag szinapszis egy nagy tüskén a felnőtt egyed hippokampális CA1 régiójában olyan szinapszist képvisel, amely a múltban valamikor „potenciálódott”, míg egy kisméretű, AMPA-ban szegény szinapszis egy „apró” tüskén hatékonyságcsökkenéssel ment keresztül (LTD). Ez a hipotézis azt jelenti, hogy a kísérleti rendszerekben a „potenciált” és „csökkent működésű” szinapszisek között észlelt különbségek tükrözni fogják a nagy és kis szinapszisek közötti különbségeket az ép agyban is.

Régóta ismert, hogy a dendrittüskék a fejlődés során képesek mozogni és aktivitás-függő alakváltozásokon mennek keresztül; újabb adatok azt mutatják, hogy a tüskék még a felnőtt agyban is képesek gyorsan növekedni és zsugorodni (Noguchi et al., 2019). A tüskék mozgékonyságának a szinaptogenezisben betöltött szerepe mellett maga a tüske mérete is funkcionálisan fontos lehet, mivel szabályozza a kalcium vagy más diffúz mediátorok összekapcsolódását a tüske és a dendritörzs között. Az ultrastrukturális adatok szoros kapcsolatot mutatnak a tüske-térfogat, a PSD mérete (területe) és a preszinaptikus axonterminális vezikuláris tartalma között (Harris and Stevens, 1989, Sorra and Harris, 2000). Ezek az adatok, valamint az a felfedezés, hogy a PSD mérete összefügg az AMPAR-tartalommal, alátámasztották a tüske mérete és a szinaptikus hatékonyság közötti kapcsolatot; az *in vitro* neuronokból és szeletkultúrából származó adatok közvetlenül megerősítik ezt a kapcsolatot (Kasai et al., 2010, Matsuzaki et al., 2001, Makino and Malinow, 2009). Nehéz azonban a jelenlegi eredményeket egységes egészzé szintetizálni, részben azért, mert a tenyésztett neuronokból, szeletkultúrából, fiatal állatokból származó akut szeletekből és felnőtt agyból származó munkák együttesen vannak jelen kortárs ismereteink háttérében, és nagyon korlátozott ismeretekkel rendelkezünk arról, hogy valójában mennyire hasonlítanak egymáshoz ezek a sokszor végtelenül leegyszerűsített modell rendszerek. Az emlősökben az idegi plaszticitás terén végzett kutatások többsége az intakt agynál jobban ill. egyszerűbben vizsgálható modell rendszereket használnak. Ez hagyományosan a nagyon fiatal állatokból származó hippokampusz szeleteket jelenti; az utóbbi időben ezt a technikát nagyrészt felváltották a szeletkultúrák vagy primer neurontenyészetek, amelyek még könnyebben manipulálhatók kísérleti úton. Továbbra sem világos azonban, hogy ezek mennyire alkalmasak az agyi szinapszisek modelljeként. Ezért vizsgálataimat elsősorban intakt agyból származó

szövetminták mikroszkópos vizsgálatával végeztem. A továbbiakban a dendrittüskék szerveződésének hátterében húzódó szerkezeti és funkcionális egységek azon tudományos hátterét mutatom be, amelyek az értekezésben prezentált, rágcsáló agyból származó kísérletek ill. kutatásom alapjául szolgáltak.

## Posztszinaptikus endocitózis

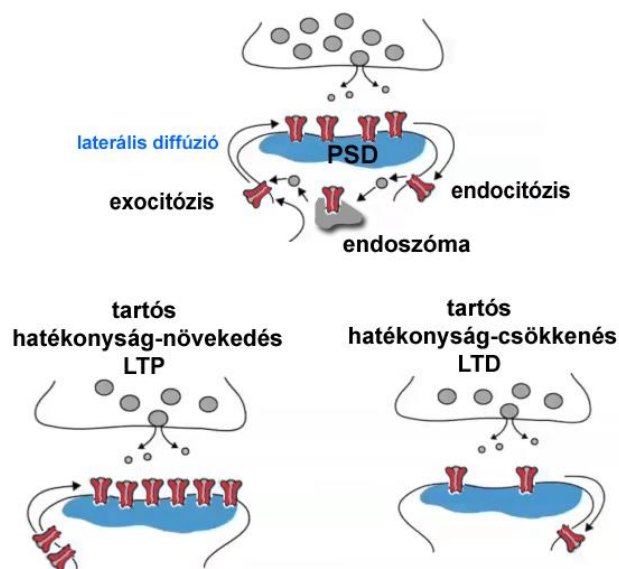
### Az endocitotikus zóna (EZ)

A posztszinaptikus membrán-kötött szállítás (*membrán-trafficking*) fontos szerepet játszik a szinaptikus plaszticitás kialakításában, mégis a különböző fehérjék, ill. membrán-komponensek szállításában alapvető szerepet játszó molekuláris gépezetről csak kevés ismerettel rendelkezünk. A posztszinaptikus dendrittüskék legnyilvánvalóbb szerkezeti eleme a PSD, amely egy igen kompakt fehérje-mátrix. Elsősorban Itt találhatóak a glutamáterg neurotranszmisszióért felelős receptorok, valamint a jeltovábbításért felelős molekulák, mindezek bonyolult fehérje-állványzatba (*scaffold*) ágyazva (Sheng and Hoogenraad, 2007). A PSD ugyanakkor a dendrittüske membránfelületének csak kevesebb, mint 10-15%-át foglalja el, a fennmaradó 80-85% szerepéről ismereteink korlátozottak. Több évtizeden át tartó kutatások eredményeképpen ugyanakkor már ismert, hogy szinaptikus plaszticitás során – aktivitás-függően - változik a dendrittüskék alakja és mérete. Hasonló folyamatok zajlanak le az idegrendszer fejlődése és például tanulási folyamatok során is (Sorra and Harris, 2000, Bourne and Harris, 2008a). Azt is tudjuk, hogy a szinaptikus fehérjeszállítás sarkalatos szerepet játszik a szinaptikus szerkezeti plaszticitásban: például clathrin-függő endocitózis áll a tartós szinaptikus hatáscsökkenés hátterében, minek eredményeképpen a szinapsziszból a glutamát receptorok elszállítódnak (**2. ábra**) (Carroll et al., 2001, Rosendale et al., 2017).

Mégis, nagyon keveset tudunk arról, hol és hogyan helyezkedik el az endocitózisért felelős molekuláris gépezet a dendrittüskékben. Vizsgálataink során három, a posztszinaptikus endocitózisban alapvető szerepet játszó fehérje eloszlását vizsgáltuk *in vivo* rágcsáló hippokampuszban; arra voltunk kíváncsiak, hogy vajon a főbb endocitotikus fehérjék – a PSD-hoz hasonlóan – térben jól körülhatárolható doménbe szerveződnek-e?

A clathrin molekula adaptorokhoz kapcsolódik (pl. AP-2), amely adaptor fehérjék közvetlenül a szállítani kívánt transzmembrán cargo-fehérjéhez kötődnek (Mousavi et al., 2004). Miután a clathrin-adaptor kapcsolódás sikeresen megtörtént a további, egymáshoz

kapcsolódó clathrin molekulák először egy átmeneti burkos gödröt (*coated pit*) hoznak létre a membránon, amely „bedomborodik”, végül pedig lefűződik a membránról (Maldonado-Baez and Wendland, 2006, Taylor et al., 2011). A lefűződésben elsősorban a dynamin játszik fontos szerepet (Conner and Schmid, 2003, Mousavi et al., 2004). Fénymikroszkópos vizsgálatok már felvetették annak a lehetőségét, hogy az endocitotikus gépezet része a poszt-szinaptikus membránnak: *in vitro* hippokampális neuronok tüskéiben gyakran lehet magas clathrin koncentrációt megfigyelni (Blanpied et al., 2002), ezek a clathrin-pontok nagyon közel találhatóak a PSD-hoz (átlagosan ~300nm távolságra) és a clathrin jel kolokalizálódik az AP2-vel és a dynaminnal. Ezen megfigyelések alapján kíváncsiak voltunk, hogy vajon a felnőtt agyban, *in vivo* is megtalálható-e egy ilyen funkcionális domén a dendrittüskékben? Ezért patkány hippokampusz piramiseltjeinek dendrittüskéit vizsgáltuk immunhisztokémiával kombinált elektronmikroszkópos technikákkal.



2. ábra. A szinaptikus hatékonyság szabályozása és a receptor-trafficking sematikus ábrázolása. Endocitózis áll a tartós szinaptikus hatékonyság-növekedés ill. hatás-csökkenés hátterében, aminek során a szinapszisba glutamát receptorok helyeződnek (LTP) vagy elszállítódnak onnan (LTD).

### *A dynamin szerepe a poszt-szinaptikus EZ lokalizációjában*

Nemcsak az AMPA receptorok, de számos más poszt-szinaptikus membránfehérje képes a PSD-ből diffúzióval távozni, majd endocitózist követően dinamikus intracelluláris szállítási folyamatok során keresztülhaladni (Tardin et al., 2003, Triller and Choquet, 2005, Ashby et al., 2006), lebontódni vagy újrafelhasználási céllal ismét beépülni (*recycling*) (Luscher et al., 1999,

Ehlers, 2000). A neuronális endocitotikus szállítási folyamat szigorú szabályozás alatt áll és a szinaptikus plaszticitás számos formájához elengedhetetlenül szükséges (Park et al., 2004b, Park et al., 2006, Brown et al., 2005).

Számos megfigyelés – többek között sajátjaink is – azt támasztották alá, hogy a posztzinaptikus szállítmány (*cargo*) endocitózisa specifikus sejt felszíni doménekben, ún. endocitotikus zónák területén történik, amely stabilan pozícionált, esetenként összeszerelődött, clathrinban gazdag területek a PSD közelében (Blanpied et al., 2002, Racz et al., 2004). A posztzinaptikus endocitózis ilyen szoros lokalizációjáról joggal feltételezzük, hogy a posztzinaptikus membrán összetételének, és a szinaptikus jelátvitel és plaszticitás szabályozásában alapvető szerepet játszik (Kennedy and Ehlers, 2006). Ugyanakkor azok a molekuláris mechanizmusok, amelyek az endocitotikus zónát a PSD közelébe pozícionálják nem ismertek.

Kísérleti modellként használt emlős sejt vonalakon a clathrin-mediálta endocitózis elkülönült, clathrin-burkos doménekben, tulajdonképpen bárhol történhet és közvetlen vagy közvetett térbeli kapcsolatot nem feltétlenül fedezhetünk fel az endocitózis és egyéb celluláris struktúrák között (Gaidarov et al., 1999, Kaksonen et al., 2006). Ezzel szemben hippokampális idegsejtek dendritjeiben a clathrinban gazdag területek és burkos gödrök igencsak specifikusan, néhány száz nanométerre a PSD-től lokalizálódnak (Blanpied et al., 2002, Racz et al., 2004). A posztzinaptikus membránál, az endocitotikus fehérjék (pl. clathrin & dynamin) részt vesznek az NMDAR/PSD-95 fehérje komplex kialakításában, sőt mind a PSD, mind az endocitotikus apparátus közös kapcsolódási pontokon keresztül kötődik az aktin citoskeletonhoz (Naisbitt et al., 1999). Mindezek azt sejtetik, hogy egy specifikus molekuláris „interfész” kapcsolja közvetlenül vagy közvetve a PSD-t az endocitotikus struktúrákhoz.

Ahogy az korábban már említettem, a clathrin-mediálta endocitózis végső lépése a burkos vezikula lefűződése, amelyet a nagy GTPáz dynamin család enzimjei végeznek oly módon, hogy oligomereket képeznek a lefűződő vezikula nyaki részénél (Praefcke and McMahon, 2004). Számos kutatási eredmény világított rá a dynamin „állványzat-szerű” szerepére, amely a membrán-dinamikát és a citoskeleton átrendeződését koordinálja a sejtek aktinban gazdag területein (ilyenek jellemző területek például a membrán-fodrok (membrane-ruffles), podoszómák, az ún. „aktin-üstökösök” (comet), mitotikus osztódási barázda vagy növekedési kúpok- (Schafer, 2004, Kruchten and McNiven, 2006). A dynamin molekulák prolinban gazdag C-terminális doménjük (PRD) segítségével, fehérje-interakciókon keresztül

kerülnek az fent említett szubcelluláris területekre (Praefcke and McMahon, 2004). Ez a specifikus lokalizáció nagy valószínűséggel szerepet játszik az endocitózis és az aktin citoszkeleton célzott és összehangolt együttműködésében az adott membránterületeken (Kruchten and McNiven, 2006).

Három különböző dynamin gént ismerünk (Cao et al., 1998). Az agyban előforduló dynamin-1 preszinaptikus axonterminálisokban koncentrálódik és szinaptikus vezikula-endocitózisban játszik alapvető szerepet. A dynamin-2 izoforma általánosan, minden sejt- és szövetféleségben előfordul és a már ismertetett membrán-lefűződésben játszik szerepet. A dynamin-3 azonban az agyban dúsul fel, és alapvetően posztszinaptikusan fordul elő (Gray et al., 2003). Míg a dynamin-1 és -2 izoformák a membrán-lefűződés és vezikula-leválás folyamatát mediálják, addig a dynamin-3 szerepéről nem sok konkrétum látott napvilágot. Megjegyzendő, hogy a dynamin-3 az egyetlen dynamin izoforma, amely képes a posztszinaptikus Homer adaptorhoz kapcsolódni (Gray et al., 2003), amely felveti annak a lehetőségét, hogy a dynamin-3 a PSD-állványzat kialakításában is részt vesz egyben.

A posztszinaptikus fehérje-állványzat központi fehérjéi a Shank/ProSAP családba tartoznak (Naisbitt et al., 1999). Shank számos fehérje-partnerrel kapcsolódhat, többek között a GKAP/SAPAP adaptor fehérjékkel, amelyek így kialakítják a Shank-NMDA receptor/PSD-95 komplexet (Naisbitt et al., 1999), illetve a kis tetramer Homer1 adaptor fehérjével, amely a Shank-et számos különféle partnerrel kapcsolja össze, mint például IP<sub>3</sub> receptor, metabotróp glutamát receptor (mGluRs) és nem utolsósorban a dynamin-3 (Bertaso et al., 2010, Tu et al., 1999, Gray et al., 2003). A Homer-Shank komplex létrejötte elősegíti a glutamáterg szinapszisok érését, beindítja az AMPA receptorok szinapszisba szállítódását és növeli a szinapszis hatékonyságát (Sala et al., 2001). Mégis, keveset tudunk a Homer downstream effektorairól, amelyek az AMPA receptorok mennyiségének szabályozásáért felelősek a posztszinaptikus membránban.

Kísérleteink során azokat a molekuláris mechanizmusokat szeretnénk volna megvizsgálni, amelyek az endocitotikus zónát funkcionálisan a posztszinaptikus denzitáshoz kapcsolja, valamint a lokalizált endocitózis szerepét a serkentő neurotranszmisszióban. Számos, az itt bemutatott mikroszkópos módszer mellett egyéb, a molekuláris biológia kísérleti eszköztárába tartozó módszerrel is körüljárva ezt a kérdést azt találtuk, hogy a dynamin-3 alapvető szerepet játszik a Homer/Shank kötődése révén az EZ szinapszishoz kapcsolásában.

## A posztzinaptikus citoskeleton (tüskeváz)

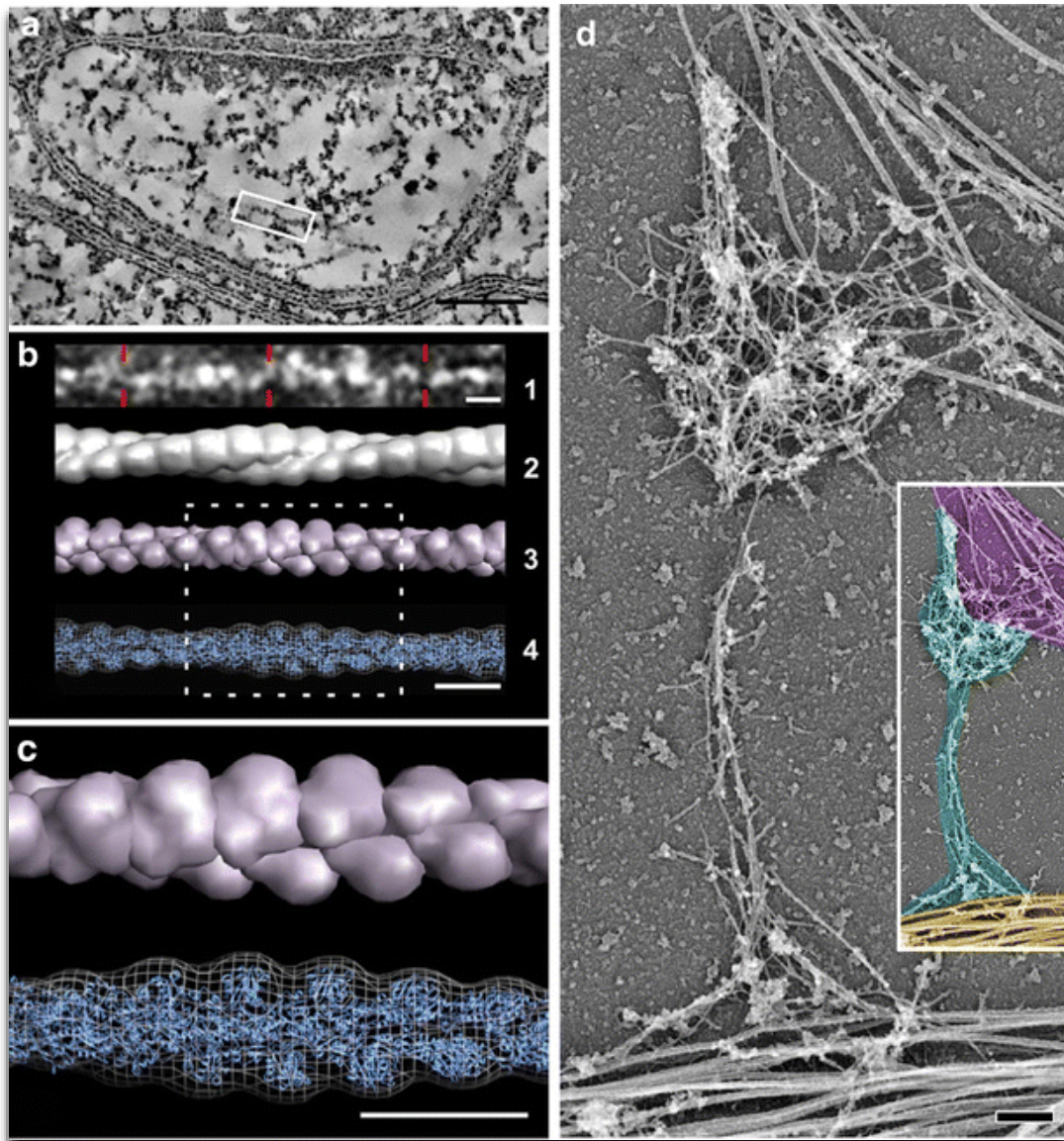
A szinaptikus dendrit-tüskék parányi mérete (0,02-0,03 femtoliter (Harris and Stevens, 1989) nem teszi lehetővé a bennük található aktin-hálózat hagyományos fénymikroszkópos technikákkal való vizsgálatát. A transzmissziós elektronmikroszkópban már láthatóak a szinaptikus partnerek, de a tüskék plazmájában mindössze egy többé-kevésbé heterogén, fonalas szerkezetet mutató aktin hálózat figyelhető meg, amely nem visz közelebb a tüskeváz szerkezetének megértéséhez (1.C. ábra).

Megfelelő technikával azonban meg tudjuk jeleníteni a különböző funkcionális állapotban lévő aktin-doméneket. Ehhez az aktin-váz azon tulajdonságát használjuk fel, miszerint a globuláris (G)-aktin monomerek önállóan nem képesek sem fonalakká polimerizálódni, sem a fonalak bonyolultabb hálózattá alakulni, lévén igen energiaigényes folyamatok és megfelelő biokémiai katalizátorok - enzimek - nélkül nem mennek végbe. Az aktin hálózat szabályozott és dinamikus kialakításáért egész enzimrendszer felelős; ma már sok ilyen, specifikus funkciókkal rendelkező fehérjét ismerünk. Jellemző rájuk, hogy szinte minden sejtben megtalálhatóak, és az aktinhoz hasonlóan az evolúció során sem szerkezetileg, sem funkciójukban nem, vagy csak alig változtak. Például a legtöbb eukarióta sejtben a cofilin nevű enzim a fonalak darabolásáért, depolimerizációjáért felelős, míg az ún. Arp2/3 komplex - amely egy hét alegységből álló multimer enzim – a filamentumok felszínén hoz létre elágazódásokat, majd képes az új filamentum polimerizációjára, nukleációjára. De léteznek a filamentumokat kötegekbe rendező, keresztkötéseket létrehozó, monomereket szállító és fonál végéhez kötő specifikus enzimek is (Racz and Weinberg, 2013).



### Aktin-szabályozó fehérjék és szerepük a plaszticitásban

A neuronális jelátvitelben sarkalatos szerepet játszó tüskeszinapszisok alakját a bennük található dinamikus vázrendszer, az aktin citoskeleton határozza tehát meg. Az aktin egy globuláris monomerekből (G-aktin) enzimatis szabályozófehérjék segítségével fonalakká polimerizálódó (F-aktin) mikrofilamentum, amely képes bonyolult fonalhálózattá alakulni; evolúciósan konzervált módon egyaránt jelen van az egysejtűekben és a legfejlettebb emlősök sejtjeiben is, így az idegsejtben is. Az idegsejtek felszínén található tüskék aktivitás-függő morfológiai változásának alapjául is az aktin-hálózat dinamikus átépülése áll. Ez az ún. aktivitás-függő aktin *reorganizáció* vagy *remodelling* igen komplex kapcsolatra utal az idegi impulzusokat közvetlenül felfogó glutamát receptorok és az aktin-alapú „tüskéváz” között.



3. ábra. Az F-aktin megjelenése a dendrittüskékben, nagyfelbontású EM-technikákkal.

A bal oldali panel patkány neokortexből készült ultravékonyvékony metszet elektron-tomográfiáját mutatja (a tábla (Burette et al., 2012) engedélyével készültek); a jobb oldali panel *in vitro* hippokampális neuronok platina árnyékolt másolatát mutatja (a kép (Korobova and Svitkina, 2010) engedélyével használva). **a** Virtuális szelet (~4 nm vastag) egy tuskéből. Egy hosszú, egyenes fonalat tartalmazó terület (fehér keret által kiemelve) látható a **b**-ben. Ez a filamentum spirális periodicitást mutat, amely megfelel az F-aktin szerkezetének. **b2** Az előző denzitás spirálisan átlagolt felületi ábrázolása. **b3** Egy idealizált aktin filamentum nagyfelbontású elektronmikroszkópos elemzésből nyert atomi modelljének alacsony felbontású ábrázolása. **b4** Ennek az atomi modellnek az illesztése (kék rajzos ábrázolás) a szimmetrizált, extrahált filamentum denzitásra (dróthálós ábrázolás). **c** A **b**-ben látható régió kinagyítása. Méretsávok 100 nm az *a*, 10 nm a *b* és *c* esetében. **d** A túskeváz ábrázolása a membránok eltávolítása után. A filamentumok szerveződése egy gomba alakú túske fejében és nyakában, amely dendrithez (sárga szín, az alján) és a fej mentén futó axonhoz (magenta, a tetején) kapcsolódik 14 napos, *in vitro* (14DIV) neuronból, amelyeket Triton X-100-zal kezeltek a belső struktúrák feltárása érdekében. A dendritörzsben lévő vastag, rostszerű képletek a mikrotubulusok. Az aktin filamentumok (ciánkék szín) a túske fejének és nyakának fő citoskeletális elemei. Méretsáv 200 nm.

A tuskék tehát gazdagok aktinban (Fifkova, 1985, Fifkova and Morales, 1992), egy evolúciósan is konzervált, ~43 kDa molekulatömegű, ATPáz aktivitással rendelkező globuláris fehérjében. Modellrendszerekben végzett kiterjedt munka bizonyítja, hogy az aktin dinamikus, sőt ciklikusan változik az oldható monomer G-aktin és a polimerizált ~8-9 nm átmérőjű F-aktin filamentum-állapot között. Ezek a filamentumok komplex hálózatokká tudnak összeállni, amelyek gyors növekedésen és átrendeződésen mehetnek keresztül, képesek erőt kifejteni a plazmamembránra, ezáltal annak deformációját idézve elő (Jonas and Duschl, 2010, Pollard and Borisy, 2003, Kessels et al., 2011). Az aktin filamentumok "mozgólépcsőzéses (treadmilling)" dinamikát is mutatnak, amelyben a filamentum hossza állandó marad, miközben az aktin monomerek a "szögös (*barbed*)" végén hozzáadódnak, és a "hegyes (*pointed*)" végén disszociálnak. Az aktin kiemelt fontosságú az alapvető sejtfolyamatokban, a sejtpolaritás és az irányított sejtmigráció kialakításától kezdve a sejtszervecskék mozgásán át az exo- és endocitózisig (Anitei and Hoflack, 2012).

Az elektronmikroszkópos képen az aktin túskeváz jellemzően laza filamentumok hálózatoként jelenik meg (**1. C. ábra**) (Fifkova, 1985, Fifkova and Morales, 1992, Markham and Fifkova, 1986). A nagy felbontású technikákat, például az elektron tomográfiát (**3. A-C. ábrák**) és a fémárnyékolást (**3. D. ábra**) alkalmazó tanulmányok fontos aspektusait világították meg eme komplex aktin-hálózatok szerkezetének (Korobova and Svitkina, 2010, Burette et al., 2012), de az aktin filamentumok funkcionális szerveződése a tuskén belül kevésbé tisztázott. *in vitro* idegsejtek vizsgálatával kapott eredmények a túskeváz szerveződésének "duális" modelljéhez vezettek, amely azt feltételezi, hogy az aktin filamentumok egy viszonylag stabil

központi részbe (magba) és egy dinamikusan változó perifériás részbe (hájba) szerveződnek (Smart and Halpain, 2000, Matus, 2005, Rao and Craig, 2000). Az ún. aktin threadmilling-et közvetlenül vizualizálták a tüskén belül szuperfelbontású képalkotással, szintén élő sejteken (Izeddin et al., 2011, Tatavarty et al., 2009, Honkura et al., 2008, Bosch and Hayashi, 2011, Frost et al., 2010b). A filamentumok egy különálló "növekedési pool"-ját is leírták (Honkura et al., 2008), és a posztszinaptikus denzitáson belül a szinaptikus glutamát receptorokkal közvetlenül kölcsönhatásba lépő aktin hálózatot is azonosítottak (Fischer et al., 2000, Kerr and Blanpied, 2012). Az aktin filamentumok közvetlenül érintkeznek a PSD-vel (Burette et al., 2012, Capani et al., 2001, Fifkova and Delay, 1982). Bár az aktinnak többféle funkciója van a PSD-ban, talán a legalapvetőbb szerepe a glutamát receptorok stabilizálásához kapcsolódik (Allison et al., 1998). Az NMDA-receptorok az  $\alpha$ -aktinin nevű adaptorfehérjén keresztül kapcsolódhatnak az aktin filamentumokhoz. Az AMPA-receptorok kapcsolódása az F-aktin filamentumokhoz kevésbé közvetlen, különböző állványfehérjék, köztük a PSD-95 (Pak et al., 2001, Tada and Sheng, 2006), Abp1 (Haeckel et al., 2008), PICK1 (Nakamura et al., 2011) és neurabin (Terry-Lorenzo et al., 2005) révén tartják fent kapcsolatukat a tüskeváz aktinjával.

A dendrittüskék tehát számos speciális feladat ellátását végző funkcionális területtel, ún. mikrodoménnel rendelkeznek. Ilyen például a PSD, amely a serkentő szinapszisok jelátvivő anyagát, a glutamát aminosav érzékelését végző receptorokat és hozzájuk tartozó további jelátvivő és struktúra- ill. állványzat-fehérjéket tartalmazza. A receptorok és sejt felszíni molekulák transzportjáért felelős területek is megtalálhatóak a tüskék felszínén: az ún. endocitotikus és exocitotikus zónák feladata a transzportfolyamatok helyének kijelölése és a szállítási folyamatok irányának meghatározása, a szállító endoszómák létrehozása és dokkolása. Ezért arra voltunk kíváncsiak, vajon a tüskék alakját és bizonyos szempontból annak funkcióját is meghatározó aktin-hálózat rendelkezik-e hasonló „mikrodomén” szerkezettel? Feltételeztük, hogy az idegi aktivitás nem véletlenszerűen polimerizálódó és átalakuló, hanem egy nagy rendezettséget mutató vázrendszerre támaszkodik.

## A tüskeváz szabályozása

Fehérjék bonyolult kaszkádja modulálja az F-aktin dinamikus átalakulását; ez a fehérjehálózat döntő fontosságú az eukarióta sejtek alakjának és mozgékonyságának szabályozásában. A kis GTPázok Rho családja összekapcsolja a plazmamembránon lévő

receptorokat az aktin szabályozó fehérjék mediátoraival; a szinaptikus dendrittüskékben betöltött szerepükről számos elegáns kísérleti eredmény látott napvilágot (Tolias et al., 2011, Murakoshi et al., 2011, Fischer et al., 2000, Carlisle and Kennedy, 2005, Penzes and Rafalovich, 2012)). Ezek és más upstream szabályozó fehérjék az aktinkötő fehérjék (*Actin binding proteins* - ABP-k) funkcionálisan lényeges különböző csoportjain keresztül hatnak az aktinra, amelyek modulálják az aktinhálózatok felépítését és átrendeződését. Számos ABP-t azonosítottak a szinaptikus dendrittüskékben (Racz and Weinberg, 2013). Érdekes módon ezek az ABP-k egy sereg olyan jelátviteli útvonal célpontjai, amelyek a tartós szinaptikus plaszticitási folyamatokban is részt vesznek (Penzes and Cahill, 2012). Továbbá fontos megfigyelés, hogy az aktin remodellinget megzavaró szerek a szinaptikus plaszticitást is károsan befolyásolják (Fukazawa et al., 2003), megerősítve az aktin és a szinaptikus hatékonyság között régóta feltételezett funkcionális kapcsolatot (Fonseca, 2012, Fifkova and Delay, 1982).

## Aktin szabályozó fehérjék

### *Cofilin*

A dendrittüskékben található aktin rendkívül dinamikus, a monomer globuláris G-aktin és polimerizálódott fonalas F-aktin folyamatosan alakul egymásba (Star et al., 2002, Okamoto et al., 2004). Az Aktin-Depolimerizáló Faktor (ADF)/cofilin fehérjecsald alapvetően hozzájárul ehhez a dinamikus aktin -átalakulási folyamathoz azáltal, hogy felgyorsítja a fonálvégi aktin depolimerizációs ráta növelésével ill. a hosszú fonalak darabolásával (Bamburg, 1999, Carlier et al., 1997, Bernstein and Bamburg, 2010). A Cofilin, egy ~20 kDa súlyú fehérje, amely egyszerre két, longitudinálisan asszociált F-aktin alegységhez képes kötődni; gyakran feldúsul olyan szubcelluláris lokációkban, ahol gyors aktin-reorganizációt és motilitást figyeltek meg; például sejt-kultúrában fenntartott sejtek vezető membránéleinél, gyorsmozgású membránterületeken, és az idegsejtek növekedési kúpjánál is (DesMarais et al., 2005, Gungabissoon and Bamburg, 2003). Cofilin nagy mennyiségben fejeződik ki az agyban is (Moriyama et al., 1990). Számos tanulmány, amely a tartós szinaptikus hatékonyságcsökkenés (LTD) és az ezzel együtt járó dendrittüske-sorvadás összefüggéseit vizsgálta rámutatott, hogy a cofilin alapvető szerepet játszik ennek a speciális szinaptikus-motilitásnak a szabályozásában (Calabrese et al., 2014, Rust, 2015, Zhou et al., 2004)

A foszforiláció inaktíválja a cofilint, amelynek aktivitását a (Lin-11/Isl-1/Mec-3)-domain-tartalmú fehérje kináz (LIMK) és a Slingshot foszfatáz közötti kölcsönhatás szabályozza (Meng et al., 2004, Wang et al., 2005). A Cofilint a Rho családba tartozó GTPázok downstream célpontjaként is azonosították (Meyer and Feldman, 2002, Duan et al., 2018), amelyekről ismert, hogy jelentős hatást gyakorolnak a tüskék morfológiájára - részben a LIMK-n keresztül (Gungabissoon and Bamburg, 2003, Vallejo et al., 2021). A LIMK mutációját sejtik Williams-szindróma hátterében, amely mentális retardációval és vizuális-térbeli kognitív deficittel jár (Frangiskakis et al., 1996, Bellugi et al., 1999). Ez a megfigyelés arra utal, hogy a neuronális cofilin diszregulációjának klinikai következményei lehetnek (Ben Zablah et al., 2021).

A cofilint immunoblot segítségével már korábban kimutatták az agyban (Yonezawa et al., 1987, Shaw et al., 2004), de az agyon belüli eloszlásáról keveset tudunk. Farmakológiai kísérletek arra a hipotézisre vezettek, hogy a tüskeszinapszisok központi részében lévő aktin viszonylag stabil, míg a perifériáján vagy "héjában" fekvő aktin rendkívül dinamikus (Halpain, 2000). A túske fejevégi régiójában azonban fokozott motilitást észleltek, amely vizsgálatok nem egyértelműen támasztják alá a "duális-aktin" hipotézist, elsősorban a fénymikroszkópos technikák korlátozott felbontása miatt (Roelandse et al., 2003). Abból kiindulva, hogy a cofilin jelezheti a dinamikus aktin lokalizációját, mi immuncitokémiával kombinált elektronmikroszkópiát használunk annak megállapítására, hogy ez az aktinkötő fehérje koncentráliódik-e a túskehéjban, ahogy azt a "duális-aktin" hipotézis feltételezi. Immuncitokémiával igazoltuk, hogy a cofilin expresszáliódik a dendrittüskékben, és az általunk feltárt cofilin-eloszlás a túske belső szerveződésének újszerű jellemzőit tárták fel.

### *Cortactin a hippokampális dendrittüskékben*

A PSD-ban található receptorok és állványfehérjék sarkalatos szerepe a neuronális jelátvitelben széles körben ismert és elfogadott. Ahhoz, hogy egy posztzinaptikus állványfehérje aktivitás-függő módon képes legyen befolyásolni a túske alakját, valamilyen módon mindenképpen hatással kell hogy legyen a túskevázat alkotó citoskeletális elemekre. Ezért mindenképpen figyelemreméltó, hogy az egyik legintenzívebben kutatott szinaptikus állványfehérje, a Shank kapcsolódhat az aktin-kötő fehérjeként ismert cortactinnal (Naisbitt et al., 1999). A cortactin egy ~80kDa fehérje, amely minden sejtben szerveződésű élőlényben megtalálható, képes az Arp2/3 komplexhez kötődni az N-terminális végével, tartalmaz egy 5-6

tandem ismétlődő aktin kötő domént, egy prolin-gazdag régiót, és egy Src homológia 3 (SH3) domént a C-terminális végén (Wu and Parsons, 1993). Összetett felépítése révén képes az aktin filamentumokhoz kötődni, ezzel párhuzamosan pedig aktiválni az aktin-nukleációban alapvető szerepet játszó Arp2/3 komplexet (May, 2001, Weaver et al., 2001, Daly, 2004, Helgeson and Nolen, 2013). A cortactinról ismert, hogy számos szubcelluláris struktúrában és képletben előfordul, így lamellopódiumokban, filopódiumokban, membránbetűródéseken, és migráló fibroblasztok vezetőélén (*leading edge*), ahol kolokalizál az F-aktinnal és az Arp2/3 komplexszel. Ez az asszociáció lehet az alapja az aktin-alapú motilitásnak (Krueger et al., 2003, Weed et al., 2000, Weed and Parsons, 2001). Számos idegsejt-kultúrában végzett kutatási eredmény utal arra, hogy a cortactin az agyban is hasonló szerepet játszik (Hering and Sheng, 2003, Martinez et al., 2003). A dendrittüskék dinamikus aktivitásfüggő átalakításában felvetődött szerepe ellenére igen keveset tudunk csak a cortactin előfordulásáról és szubcelluláris eloszlásáról az agyban. Ezért immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk, hogy kiderítsük, vajon jelen van-e az előagyi tüskés neuronokban, és ha igen, valóban olyan szinaptikus struktúrákban található, amely alátámasztja a cortactin közvetítő szerepét a szinapszis és az aktin citoskeleton között?

### *Cortactin a kisagyban*

A kisagyi Purkinje-sejtek (*Purkinje cell* - PC) tüskeszinapszisai plasztikusak, de számos fontos tekintetben különböznek az előagyi tüskéktől, és a tüskék plaszticitásának mechanizmusai is különböző az előagy és a kisagy között. Az emlősök szinaptikus plaszticitásának hátterében álló mechanizmusok megértése nagyrészt az előagyi neuronok, -különösen a hippocampusz - vizsgálatán alapul, de okunk van feltételezni, hogy az ebből a kutatásból származó eredmények nem alkalmazhatók közvetlenül a kisagyi serkentő tüske szinapszisokra (Sdrulla and Linden, 2007). A tartós szinaptikus plaszticitás fiziológiai alapjai az előagyi és a kisagyi területeken meglehetősen eltérőek. A tartós szinaptikus hatékonyságnövekedés (LTP), amelyről úgy tartjuk, hogy az előagyban az asszociatív tanulás hátterében áll (Lynch, 2004), NMDA receptor-függő (ld. Bevezető rész is). A PC-k posztzinaptikus denzitásai (PSD) azonban nagyon kevés NMDA receptorral rendelkeznek, azok is főként az ún. kúszó rostok (*climbing fiber* - CF) és a Purkinje sejtek dendrittörzsére közvetlenül érkező axodendritikus CF-PC szinapszisokra korlátozódnak (Piochon et al., 2010, Piochon et al., 2007). Ehelyett a PC tüskékben magas metabotróp glutamát receptor - mGluR1 szintet

detektálhatunk (Ryo et al., 1993). A kisagyi tanulás az moharostokból (mossy fiber; MF) a szemcsesejtek (*granule cell* - GC) axonjainak közevetítésével (*parallel fiber* - PF) a PC-k tüskéire érkező jelek időbeli párosításából és a kapcsolódó CF aktiválásából ered, ami LTD-t eredményez a PF-PC szinapszisban, ami jelentősen különbözik az előagyi szinaptikus plaszticitástól. Érdekes módon a PF-PC szinapszis posztzinaptikusan is képes LTP-t kifejezni, de ennek a kisagyi LTP-nek az indukciója fehérje-foszfatazoktól függ, nem pedig kinázoktól - éppen az előagyi szinapszisokban megfigyelt szinaptikus plaszticitás követelményeinek az ellenkezője (Ito, 1998, Ito et al., 2014, Lee et al., 2005, Jorntell and Hansel, 2006, Belmeguenai and Hansel, 2005, Romano et al., 2018). Mindazonáltal a jelenleg elfogadott nézet szerint az LTD és az LTP egymást kiegészítő szerepet játszik a kisagyi motoros tanulásban.

A szinaptikus hatékonyság e hosszan tartó változásai szorosan kapcsolódnak a tüskék morfológiájának változásaihoz, legalábbis az előagyban (McKinney, 2010). A tüske belsejében kifinomult fehérje gépezet koordinálja az aktin citoskeleton átrendeződését, ami a szinapszis morfológiai "*átalakulásához*" szükséges (Tada and Sheng, 2006, Wheal et al., 1998). Ezen aktinkötő fehérjék térbeli elrendeződésére vonatkozóan egyre több bizonyíték arra utal, hogy a molekuláris kompartmentalizáció strukturális alapot biztosít a „tüskéváz” szabályozásához (Racz and Weinberg, 2013). Az egyik ilyen alapvető szereppel bíró fehérje, a cortactin. A Purkinje-sejtek is expresszálják a cortactint (Decourt et al., 2005). Feltételezhetnénk, hogy a PC-kben a cortactin hasonlóan szerveződik, mint az előagyi tüskékben, de a kisagy és a hippokampusz közötti drámai fejlődési és funkcionális különbségek fényében ez a hipotézis spekulatív. Ezért kvantitatív immunelektronmikroszkópiát végeztünk a PC tüskéken belül a cortactin lokalizálására, azzal a céllal, hogy tisztázzuk az előagy és a kisagy szinaptikus dendrittüskéi közötti funkcionális különbségek lehetséges molekuláris alapját.

### *Az Arp2/3 komplex*

Az aktin sejtváza dinamikus átrendeződését egy biokémiai kaszkádok alkotta enzim-hálózat szabályozza. A filamentumok elágazásához szükséges az úgynevezett aktin-asszociált 2/3 fehérjekomplex (*Actin related protein 2/3 complex* - Arp2/3 komplex) jelenléte (Goley and Welch, 2006, Pollard, 2007). Aktiváció hatására ez az evolúciósan konzervált szupramolekuláris komplex egy, az eredeti („anya”) filamentumról leágazó új („leány”) aktin filamentum növekedését inicializálja. Az Arp2/3 komplex központi szerepet játszik számos, eukarióta

sejtekben végbemenő folyamatban, mint például a sejtváándorlás, az exocitózis és az endocitózis (Bretschneider et al., 2004, Cai et al., 2007, Galletta et al., 2008, Toshima et al., 2005, Zuo et al., 2006). Az elmúlt évtizedekben napvilágot látott eredmények szerint az Arp2/3 központi szerepet játszik a dendrittüskék morfológiájának szabályozásában is (Kim et al., 2006a). Kutatási eredmények egyértelműen arra utalnak, hogy a hippocampális dendrittüskékben nagyfokú szervezettség figyelhető meg (Blanpied et al., 2002, Cooney et al., 2002, Park et al., 2006, Racz et al., 2004, Racz and Weinberg, 2004, Racz and Weinberg, 2006), ami alapján felmerül a kérdés, hogy vajon az Arp2/3 komplex dendrittüskén belüli kompartmentalizációja szerepet játszik-e ennek a szervezettségnek a fenntartásában? Immuncitokémiával kombinált elektronmikroszkópos vizsgálatokkal igazoltuk, hogy az Arp2/3 komplex 2-es alegysége, ami az ARPC-2, az Arp2/3 komplex egyik meghatározó komponense (Gournier et al., 2001, Mullins et al., 1997, Mullins and Pollard, 1999), egy meghatározott régióban koncentrálódik a dendrittüske-fejen belül, amely régió speciális szerepet játszhat az aktin-átrendeződéssel járó plaszticitási folyamatokban.

### *A tüskenyak vázalkotó fehérjéje: a septin*

A dendrittüskék serkentő glutamáterg szinapszisai nem csak endocitózissal, hanem laterális membrándiffúzió révén is kicserélhetik és modulálhatják receptortartalmukat. Számos tanulmány kimutatta, hogy a vékony tüskenyak akadályozza pl. a membránfehérjék és egyéb molekulák hozzáférését a tüskefejhez (Simon et al., 2014).

A molekulák diffúziós változtatása a dendritikus membrán és a serkentő szinapszisok között fontos a szinapszisok összetételének dinamikus, aktivitásfüggő változásához, amely a szinaptikus plaszticitás egyes formáinak hátterében áll. A diffúzió hozzájárul a deszenzitizált receptorok szinaptikus transzmisszió során történő cseréjéhez (Triller and Choquet, 2008, Heine et al., 2008) és a komponensek újraelosztásához a szinapszisok kialakulása (vagy erősödése) és eltűnése (vagy gyengülése) során (Makino and Malinow, 2009, Ashby et al., 2006). Ahogyan az már korábban is ismertetésre került ebben az értekezésben, az érett előagyi neuronokban a legtöbb serkentő szinapszis tüskéken lokalizálódik. Jellemzően a posztzinaptikus denzitást hordozó gömbölyded tüskefejet egy megnyúlt nyak választja el a dendritörzstől (pl.: **1. B.** ill **2. ábra**). Feltételezhető, hogy ez a nyak akadályozza a membránmolekulák áramlását a dendritből a tüskefejbe és fordítva. Azonban, bár úgy tűnik, hogy a nyak



szélessége és hossza szerepet játszik ezen molekuláris „kicserélődés” modulálásában (Svoboda et al., 1996, Noguchi et al., 2005), e korlátozott diffúzió szerkezeti alapja nem teljesen ismert. Nem világos, hogy a tüskenyak geometriája önmagában korlátozza-e a hozzáférést a dendritikus tüskékhez, vagy létezik-e fizikai akadály a molekulák diffúziója előtt?

Ehhez kapcsolódik az a felfedezés, amelynek során egy dendrit elágazási pontokhoz és a tüskenyakakhoz lokalizálódó fehérje-komplexet azonosított neuronokban, amely elengedhetetlen a dendritikus arborizációhoz is (Tada et al., 2007, Xie et al., 2007). Ez a komplex a septin GTPázok családjának legalább három tagjából, nevezetesen a septin5, a septin7 és a septin11 tagjaiból áll (Xie et al., 2007), és közvetlenül a membránokhoz kapcsolódik (Tada et al., 2007). Ismert az emlős septinkomplex kristályszerkezete is (Sirajuddin et al., 2007), amelyben a hetero-hexamer komplexek filamentózus gyűrűkké állnak össze. Az evolúciósan konzervált septinek sok élő sejtben és szervezetben ehhez hasonló szerveződést és szerkezetet mutatnak, például a bimbózó élesztősejtek esetében, ahol a hasadási barázdát körülvevő septin-gyűrű diffúziós gátat képez a két elválasztódó sejtrész között (Takizawa et al., 2000, Barral et al., 2000). Úgy tűnik, hogy ez a fajta septin-függő membrán-asszociált diffúziós szabályozás szinte mindenütt jelen van az élő sejtekben (Caudron and Barral, 2009), ami felveti annak lehetőségét, hogy a septinek a dendritörzset a tuskafejjel összekötő tüskenyak görbületénél is szerepet játszhatnak és akár diffúziós gátat képezhetnek (Barral and Mansuy, 2007). Ezért fény- és elektronmikroszkópos technikával megvizsgáltuk, hogy a tüskékben, ill. a tüskenyak membrángörbületének területén valóban lokalizálható-e septin-komplex.

## A dendrittüske-váz jelentősége neuropszichiátriai kórképekben

### *WAVE-1 és a 3-p deléciós szindróma*

A modellrendszereken végzett kutatások alátámasztják azt a tényt, miszerint az aktin sejtvázat biokémiai kaszkádok bonyolult hálózata dinamikusan szabályozza (Murakoshi and Yasuda, 2012, Haditsch et al., 2009). Ezen kaszkád upstream kulcselemei a kis molekulatömegű GTP-kötő Ras fehérje szupercsalád tagjai, a Rho/Rac fehérjék (Tolias et al., 2011, Brunig et al., 2004, Sanhueza et al., 2011, Ultanir et al., 2007, Heasman and Ridley, 2008, Choi et al., 2005, Etienne-Manneville and Hall, 2002), melyek részt vesznek a neuronok proliferációjában, migrációjában is az agy fejlődése során, valamint elengedhetetlenek a szinaptikus plaszticitási folyamatokhoz a felnőtt agyban (Gonzalez-Billault et al., 2012, Fu and Ip, 2007). Ezen GTPáz fehérjéken keresztül lezajló jelátvitel az aktin sejtvázhoz az állványfehérjék WAVE (Wiscott-Aldrich Syndrome Verprolin homology) családján át közvetít jelet (Takenawa and Suetsugu, 2007, Tahirovic et al., 2010, Soderling et al., 2007, Machesky and Insall, 1998). A WAVE több fehérjekötő domént tartalmaz: amíg az N-terminálison lévő SCAR-homológ domén a Rac jelátvitelt szabályozza (Eden et al., 2002) és a központi, prolinban gazdag régió képes kapcsolódni SH3 - domént tartalmazó (állvány) fehérjékhez, addig a C-terminális Verprolin-Cofilin savas domén kulcsszerepet játszik az Actin Related Protein 2/3 komplex (Arp2/3 komplex) aktiválásában, mely az aktin filamentum nukleációját és elágaztatását végzi (Machesky and Insall, 1998). Így a WAVE egy közös platformot nyújt a sokféle molekula interakciójához, melyek egymással kölcsönhatásba léphetnek, irányítva az aktin sejtváz újraépülését vagy aktivitás függő átrendeződését.

A WAVE izoformák élettani szerepéről keveset tudunk. Ismert, hogy WAVE-1 null egerek életképessége csökkent, fejlődésük minden tekintetben elmarad vad típusú alomtársaiktól és számos viselkedési rendellenességeket mutatnak (Soderling et al., 2003). Ezek a viselkedési hiányosságok, amelyek közé tartozik a rossz egyensúlyérzék, a csökkent koordináció, valamint a tanulás és a memória károsodása, hasonlóak a *3p-deléciós szindrómás* mentális retardációban szenvedő betegek tüneteire. Embernél a *3p-deléciós szindróma* jellemzői közé tartozik az alacsony születési súly, mikrocefália, pszichomotoros és növekedési retardáció, ptózis, telecanthus, szájpadhasadék és mikrogathia (Shuib et al., 2009), amelyek a WAVE-1-hez kapcsolódó WRP fehérje genetikai elváltozásához is kapcsolnak (Endris et al., 2002).

Miközben a WAVE jelátvitelről szóló ismereteink főként modell rendszerekből származnak, egyre több eredmény emeli ki a WAVE-irányította jelátvitel fontosságát neuronokban is (Ceglia et al., 2010, Miki and Takenawa, 2003, Soderling et al., 2007, Soderling et al., 2003, Chen et al., 2018). *In vitro* kísérletek bizonyítják, hogy a WAVE-1 (az egyik legfontosabb izoforma az agyban (Soderling and Scott, 2006)) szükséges a dendrittüskék képződéséhez, a már kialakult dendrittüskék fenntartásához, továbbá az aktivitás-függő újraszerveződésükhöz (Fu and Ip, 2007). Sőt, a WAVE-1 funkciókiesése csökkenti a tüskék számát és a tüske alakjának megváltozását eredményezi a hippocampális idegsejt kultúrákban (Kim et al., 2006b). A WAVE-1 az axonterminálisokban is megtalálható, ahol *in vitro* kísérletek támasztották alá fontos szerepét az idegsejt-nyúlványok növekedésében és az axon filopodium képzésében (Wegner et al., 2008, Stavoe et al., 2012, Spillane et al., 2011, Soderling et al., 2007, Nakamura et al., 2011, Korobova and Svitkina, 2010, Kim et al., 2006b). KO egereken végzett viselkedéstanulmányok és elektrofiziológiai tanulmányok azt erősítették meg, hogy a WAVE-1 fehérje deléciója zavart szinaptikus plaszticitáshoz vezet a hippocampusban és károsítja a hippocampus-függő tanulási- illetve memória folyamatokat (Soderling et al., 2003, Soderling et al., 2007). Azonban az egyelőre még tisztázatlan, hogy a WAVE-1 deléciója érinti-e és ha igen, hogyan a tüske-szinapszisok szerkezetét? Ezért kvantitatív elektronmikroszkópiával arra kerestünk választ, hogy a WAVE-1 génkiütés a hippocampális CA1 régióban milyen változásokat okoz az itt található tüskeszinapszisokban. Azt találtuk, hogy a WAVE-1 fehérje funkciókieséses mutációja módosítja mind az axonterminális, mind a dendrittüskék szerkezeti felépítését.

### *A tüskék szerkezeti változása skizofrénia-modellben*

A dendrittüskék rendellenességei számos neuropszichiátriai rendellenességgel, többek között értelmi fogyatékossgal (*intellectual disability - ID*), skizofréniaival (*SZ*) és autizmus spektrum zavarral (*ASD*) hozhatók összefüggésbe. Több évtizedes kutatómunkák sokaságának ellenére a súlyos pszichiátriai tünetekhez vezető neurális hálózati-zavarok alapmechanizmusai továbbra is kevésbé ismertek. Mindazonáltal a neuropszichiátriai rendellenességek hálózati alapjainak megfejtése nagy lehetőséget rejt magában az ezen állapotok hátterében húzódó szinaptikus patofiziológia különböző megnyilvánulásainak egységes, és szisztematikus megértésére. Ezen túlmenően, ha a súlyos pszichiátriai betegségek gyakran poligenetikus hátterű alapjait a neuronális hálózati kapcsolódás szempontjából fontos molekuláris útvonalakat megváltoztató kockázati allélok kölcsönhatásaként határozzuk meg, az

magyarázhatja, hogy bizonyos kockázati allélok hogyan járulhatnak hozzá több rendellenességhez (Purcell et al., 2014, Lee et al., 2012, Malhotra and Sebat, 2012, Stergiakouli et al., 2012, McCarroll and Hyman, 2013).

A pszichiátriai rendellenességeknek, mint hálózati és jelátviteli-zavaroknak a koncepcionális összekapcsolása számos új megfigyelést eredményezett (Hyman, 2014): az ún. neuropszichiátriai kockázati allélok reprezentáltsága egyértelművé vált számos szinaptikus szabályozási útvonal esetében, amelyekre kifejezetten genetikai kockázati adathalmazok elemzéseiből tettek szert. Az egyik jelentős molekuláris útvonal, amelyet ez a megközelítés kiemelten jellemez, a szinaptikus aktin citoskeleton szabályozása (Fromer et al., 2014, Kirov et al., 2012, Chang et al., 2015, Purcell et al., 2014). A leggyakoribb neuropszichiátriai kockázati gének, mint például a SHANK3, GIT1, DISC1, SRGAP3, OPHN1, LIMK1, NRG1, CYFIP1, SYNGAP1, KALRN és CNKSR2 funkcionálisan olyan jelátviteli események upstream szabályozását irányítják, amelyek közvetlenül vagy közvetve szabályozzák az aktin citoskeleton dinamikáját a dendrittüskékben (Han et al., 2013, Durand et al., 2012, Won et al., 2011, Hayashi-Takagi et al., 2010, Carlson et al., 2011, Govek et al., 2004, Meng et al., 2002, Gu et al., 2005, De Rubeis et al., 2013, Clement et al., 2012, Russell et al., 2014, Vaags et al., 2014). A dendrittüskék morfológiai rendellenességei számos pszichiátriai és neuronális fejlődési rendellenességben szerepet játszanak (Koleske, 2013, Penzes et al., 2011). A tüskén belüli aktin dinamika szorosan összefügg a tüskék morfogenezisével és a szinaptikus transzmisszió hatékonyságával is (Mullins et al., 1997, Kim et al., 2013). Továbbra sem világos azonban, hogy a szinaptikus aktin citoskeletonális útvonal zavarai hogyan kapcsolódnak közvetlenül a szinaptikus patofiziológiákhoz, amelyek az idegi hálózatok zavarait eredményezik (Lima Caldeira et al., 2019).

Egyre több bizonyíték utal arra, hogy kapcsolat van az aktin dinamikus és aktivitásfüggő átalakulását szabályozó (remodelling) útvonalak és a pszichiátriai rendellenességek között. Például az SZ-érzékenységre hajlamosító DISC1 és DTNBP1 gének a Kalirin7-Rac jelátvitelen, illetve az Abi1-WAVE-en keresztül szabályozzák az aktin dinamikáját a tüskékben (Hayashi-Takagi et al., 2010, Ito et al., 2010). Hasonlóképpen, az ASD-re hajlamosító SHANK2 és SHANK3 gének állvány és kapcsoló-fehérjeként működnek az aktinszabályozó molekulák számára, beleértve a Rac és Arp2/3 szabályozó  $\beta$ PIX-et és a cortactint (Hering and Sheng, 2003, Park et al., 2003, Wendholt et al., 2006). A SHANK3 mutációi szintén kóros tüskéváz remodellinggel járnak (Durand et al., 2012). A Rho-családba tartozó GTPázok szabályozóit, köztük az ArhGEF6,

WRP/srGAP3 és OPHN1, valamint a Rho-családba tartozó effektorokat, például a PAK3 és LIMK1, összefüggésbe hozták az ID-vel és az SZ-vel (Frangiskakis et al., 1996, Allen et al., 1998, Endris et al., 2002, Addington and Rapoport, 2009, Piton et al., 2011, Ramakers et al., 2012). Ezek a vizsgálatok együttesen ahhoz a feltételezéshez vezetnek, hogy a diszregulált aktin remodelling számos neurofejlődési és pszichiátriai rendellenesség alapja lehet. Ezt a hipotézist az aktin-remodelling egyik központi elemének, az Arp2/3 komplex feltételes mutagenézisével teszteltük, hogy tisztázzuk a kapcsolatot a *de novo* aktin-polimerizációs útvonalak és a pszichiátriai rendellenességek szempontjából releváns fenotípusok között, elsősorban serkentő idegsejtek szinaptikus tüskéinek vizsgálatával.

Az Arp2/3 komplex funkcionális elvesztése az agykéreg illetve a hippocampusz piramissejtjeiben képes a pszichiátriai rendellenességek szempontjából releváns endofenotípusokkal megegyező szinaptikus és viselkedési fenotípusokat modellezni (Kim et al., 2013). Ahogyan azt már korábban leírtuk, az Arp2/3 komplex közvetlenül serkenti az aktin-polimerizációt a tüskékben a Rac szinaptikus aktiválódását követően, hét alegységből áll (Mullins et al., 1997), köztük a kritikus ArpC3 alegységből, amelyet kísérleteink során kondicionálisan, de célzottan eltávolítottunk (ArpC3<sup>f/f</sup>:CaMKII $\alpha$ -Cre, a továbbiakban: Arp2/3 mutáns egerek). Ennek a molekuláris útvonalnak az agykéregi illetve hippocampális piramissejtekben az ArpC3 deléciójával történő gátlása a dendrittüskék fokozatos elvesztését és viselkedési rendellenességek fokozatos kialakulását eredményezte, beleértve a kognitív hiányosságokat, a szociabilitás hiányosságait, a csökkent szenzomotoros gátlást és a mozgásszervi hiperaktivitást (Kim et al., 2013). Ezáltal ezen Arp2/3 mutáns egerek esetében egy tartós neurális hálózati zavar vált azonosíthatóvá. Kimutattuk továbbá, hogy az Arp2/3 funkció elvesztése, amely tüskevesztést és rendellenes szinaptikus kapcsolatokat okoz, a frontális kéregben a piramissejtek serkenthetőségének autonóm fokozódásához vezet. Ez a rendellenesség a közepagyti tirozin-hidroxiláz (TH)-pozitív neuronokba irányuló távoli projekció révén emelkedett striatális dopamin (DA) és- antipszichotikumokra jól reagáló - pszichomotoros zavarokat eredményez. Ezek az eredmények együttesen azt mutatják, hogy látszólag egymástól független és eltérő patológiák (agykéregi tüskék elvesztése, agykéregi túlzott aktivitás/serkentés és striatális hiperdopaminergia) konvergálhatnak úgy egy komplex hálózati zavaron belül, hogy abnormális viselkedést váltsanak ki.

### *Autizmus spektrum betegség és a dendrittüskék*

Az autizmus spektrum betegség/zavar (*autism spectrum disorder* - ASD) a szociális kommunikációban mutatkozó hiányosságokkal és repetitív vagy (ön)korlátozó viselkedéssel járó, alapvetően mentális elváltozás. Genetikai vizsgálatok kimutatták, hogy az ASD etiológiája nagyon heterogén, akár több száz gént érinthet (O'Roak et al., 2012, Sanders et al., 2012, Chen et al., 2015, Krishnan et al., 2016), amelyek jelentős része ritka recesszív vagy *de novo* domináns mutációként jelenik meg (Geschwind, 2011, Iossifov et al., 2014, Gilman et al., 2011, Leppa et al., 2016). Az ASD egyik leginkább szindrómás formáját a CNTNAP2 gén funkcióvesztéses mutációi okozzák (Strauss et al., 2006), és a CNTNAP2 polimorfizmusait az ASD és más betegségek fokozott kockázatával hozták összefüggésbe (Poot et al., 2010, Scott-Van Zeeland et al., 2010, Arking et al., 2008).

A CNTNAP2 gén a contactin-associated protein-like 2-t (Caspr2) kódolja, amely a neurexin szupercsaládba tartozó fehérje, változatos sejt- és neuronhálózati funkciókkal rendelkezik (Poliak et al., 1999, Poliak et al., 2001, Poliak et al., 2003, Gdalyahu et al., 2015, Varea et al., 2015, Alarcon et al., 2008, Penagarikano et al., 2011, Jurgensen and Castillo, 2015). A CNTNAP2 KO egerek az ASD jellemző viselkedési hiányosságait mutatják, beleértve a szocializációs és kommunikációs zavarokat, a repetitív viselkedést és rohamokat (Penagarikano et al., 2011). A legújabb *in vivo* bizonyítékok arra utalnak, hogy a CNTNAP2-nek szerepe lehet a szinapszisok kialakulásában és stabilizálásában, és a dendrittüskék dinamikája a CNTNAP2 KO egerekben érintett lehet (Gdalyahu et al., 2015). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a CNTNAP2 mutációk a szinaptikus neurotranszmisszió, a funkcionális konnektivitás és a neuronhálózati aktivitás megváltoztatásával összefügghetnek a kóros viselkedéssel és a dendrittüskékben bekövetkező strukturális változásokkal. Azonban a specifikus celluláris és szerkezeti változások, amelyek a CNTNAP2 KO egerekben megváltozott viselkedésének hátterében húzódnak, mindeztidáig tisztázatlanok.

Így megvizsgáltuk a CNTNAP2 deléció dendrittüskéket érintő szerkezeti következményeit az egér mediális prefrontális kéregben (mPFC), egy olyan agyterületen, amely alapvető szerepet játszik a szociális viselkedés kialakításában (Yizhar et al., 2011, Grossmann, 2013) és jelentősen érintett az ASD-ben (Voineagu et al., 2011, Redcay et al., 2013, Selimbeyoglu et al., 2017). Az mPFC sejtek képesek modulálni a szociális viselkedést, fontosak a kortiko-kortikális

kommunikációban, és az autizmussal kapcsolatos génexpresszió kritikus csomópontjának tekintik őket (de la Torre-Ubieta et al., 2016, Selimbeyoglu et al., 2017, Parikshak et al., 2013).

## Táplálékbevitel csökkentés okozta változások a tüske-szinapszisok szerkezetében

Az elhízás és ennek következtében kialakuló betegségek széles körű elterjedése a fejlett világban kiterjedt kutatásokat motivált az olyan agyi régiók azonosítására, ahol a metabolikus jelek módosíthatják az idegi funkciókat (Murray et al., 2014). A táplálékfelvétel csökkentése az élesztőktől az emberig terjedő fajok sokaságánál bizonyítottan meghosszabbítja az élettartamot (Masoro, 2001), és lassítja az életkorral összefüggő betegségek progresszióját (Weindruch and Sohal, 1997). A táplálékcsökkentett (*food-restricted* - FR) étrend szintén késleltetheti a kognitív hanyatlást, és az öregedés során a hippocampusban kialakuló szinaptikus deficitet (Stewart et al., 1989, Idrobo et al., 1987, Hori et al., 1992). Az időszakos koplálás - a táplálkozáskorlátozás széles körben alkalmazott formája - bizonyítottan javítja a tanulást és a memóriát rágcsálókban (Li et al., 2013), és a táplálkozáskorlátozás javítja a tanulási és memóriatesztekben nyújtott teljesítményt (Fontan-Lozano et al., 2007, Adams et al., 2008), míg az elhízás károsítja a CA1 hippocampusz hosszú távú szinaptikus átvitelét (Grillo et al., 2011b, Grillo et al., 2011a). Ugyanakkor kiderült, hogy a táplálék-bevitel korlátozásnak nagyon kevés hatása van a hippocampális neuronok dendritfájának morfológiájára vagy a szinapszisok össz-számára (Andrade et al., 2002). Így továbbra sem tisztázott, hogy a hippocampusz neuropil milyen szerkezeti változásai állhatnak az ilyen táplálkozási intervenciók következtében megfigyelt memóriajavulás hátterében. Ezért a hippocampusz CA1 régióját vizsgáltuk, amely a szinaptikus plaszticitással kapcsolatos vizsgálatok elsődleges fókuszában áll, hogy meghatározzuk, hogyan befolyásolhatja a táplálékkorlátozás a szinaptikus struktúrát. Kvantitatív elektronmikroszkópiával követtük nyomon a CA1 hippocampusz szinaptikus neuropiljének változásait fiatal felnőtt patkányokban, 40%-os táplálékkorlátozási protokollt alkalmazva.



## Célkitűzések

---

Kutatásaim során a serkentő, glutamáterg tüske-szinapszisok ultrastrukturális szerkezeti és molekuláris tulajdonságait és kóros változásait vizsgáltam rágcsálókban. Ezen vizsgálódásaimmal a következő konkrét kérdéseket kívántam megválaszolni (zárójelben az adott kérdéshez kapcsolódó, az értekezésben bemutatott munkáimat tartalmazó publikációk vannak megadva):

1. Van-e specifikus lokáció ill funkcionális domén a posztszinaptikus dendrittüskékben, amely az endocitózisra specializálódott (ún. endocitotikus zóna) és ha igen, milyen viszonya van a szinapszissal? (*Lu et al., 2007, Racz et al., 2004*)
2. Hogyan szerveződnek a szinaptikus plaszticitásban bizonyítottan alapvető szerepet játszó szerkezeti-, ill. vázfehérjék és szabályozó enzimek a tüskék citoplazmájában? Van-e különbség az egyes aktin-szabályozó fehérjék eloszlásában a tüskeplazmán belül? (*Racz and Weinberg, 2004, Racz and Weinberg, 2006, Racz and Weinberg, 2008, Ewers et al., 2014, Racz and Weinberg, 2013, Szabo et al., 2021*)
3. Az aktin-citoszkeleton szabályozásában bekövetkező útvonalhibáknak milyen felismerhető kóros szerkezeti következményei vannak, amelyek a tüskeszinapszisokhoz köthetőek? (*Kim et al., 2015, Hazai et al., 2013, Kim et al., 2013, Lazaro et al., 2019*)
4. Van-e a táplálékbevitelnek és az ezzel összefüggő metabolikus állapotnak hatása a hippokampális tüske-szinapszisok szerkezeti tulajdonságaira? (*Babits et al., 2016*)

Ezek a célok körvonalazzák az elmúlt két évtizedben a kutatómunkám által elért eredmények mögött húzódó konkrét szakmai kérdéseket. Bár technikai megközelítem némileg eltér a kortárs „főáramlattól”, remélem, hogy a jövőben is folytatni tudom ezt a munkát, mivel úgy vélem, hogy a laboratóriumomban végzett munka továbbra is értékes kiegészítő perspektívát nyújt a szinaptikus plaszticitás sok más laboratóriumban végzett, elegáns vizsgálatainak értelmezéséhez.

## Alkalmazott anyagok és módszerek

### Felhasznált állatok és szövettani mintavétel

A bemutatott vizsgálatokat az idegtudományi kísérletek során leggyakrabban felhasznált rágcsálókön, patkányon ill. egereken végeztük. A kísérletek során leggyakrabban ~300 g-os felnőtt, hím, SPF Sprague–Dawley ill. Wistar (CrI:WI BR) patkányokat (Jackson, USA, ill. Toxi-Coop, Budapest), és ~35g-os egereket (C57BL/6J törzs, Janvier Labs, Franciország) használtunk, ha azt alább másként nincs feltüntetve. Az *WAVE-1 KO*, a *ArpC3f/f:SlickV-YFP-CreERT2:Rosa26-lox-stop-lox-tdTomato-fluorescent protein* ill. a *ArpC3f/f:CaMKIIa-Cre* transzgenikus egerek szövetmintái a Duke Egyetem (Durham, USA) Laboratóriumi Állattartó Részlegéről származtak. Minden eljárást a Szent István Egyetem (eng.szám: 22.1/2060/3/2011, MÁB 18/2011) és a Duke Egyetem Intézeti Állategészségügyi Bizottsága (Institutional Animal Care and Use Committees eng.szám: A288-11-11) által jóváhagyott protokoll szerint végeztünk el, a Magyar Állategészségügyi és Állatjóléti Bizottság és az Egyesült Államok Nemzeti Állategészségügyi és Állattartási irányelveinek megfelelően. A *CNTNAP2 KO* egerek és az abból származó szövetminták E. Peles-től származnak (UCLA, USA), és 12 generáción keresztül visszakeresztették a C57BL/6J háttérrel. A tüske-sűrűség elemzéséhez *CNTNAP2* heterozigóta egereket Thy1GFP (Jackson labs x 007788) egerekkel kereszteltünk. A kísérleti egereket heterozigóta keresztezésekből nyertük, és a várt mendeli gyakorisággal születtek; mindkét nemet felhasználtuk. A születési dátumot PO-nál jelöltük ki, és a három kapott genotípust (vad típusú, heterozigóta, homozigóta knock-out) együtt helyeztük el, azonos nemű, ketrecenként három-négy egérrel. Az állatokkal végzett valamennyi eljárást University of California, Los Angeles (UCLA, USA) állatkutatási bizottságának és a Nemzeti Egészségügyi Intézeteknek megfelelően végeztük.

Alomanyagnak a LIGNOCEL S3-4 csíraszegény almot, takarmánynak a ssniff R/M-Z+H 15 mm-es, csíraszegény kenyér és növendék kistrágcsáló tápot alkalmaztunk. Az állatokat 12 órás világos/12 órás sötét ciklusban tartották, és *ad libitum* jutottak táplálékhoz és vízhez. A kísérlet során igyekeztünk minimalizálni a felhasznált állatok számát, illetve az állatokat a lehető legkisebb stressznek, szenvedésnek és nyugtalanító hatásnak kitenni.

Az agy szövettani vizsgálatait megelőzően az állatok Eutanyllal vagy Ketamin/Xylazin (Sigma) keverékkel kerültek altatásra, majd a teljes anaesthesia megállapítása után intrakardiális perfúzióval fixáltuk őket (0.1M, 7.4 pH, 0.1-2%% glutáraldehidet (GA; Electron

Microscopy Sciences, PA, USA) és 4% paraformaldehidet (PFA, Sigma) tartalmazó 0.1M foszfát pufferrel (PB)).

## Sejtkultúrák létrehozása és vizsgálata

A hippokampuszból származó neuronok kultúráit E18 korú Sprague-Dawley patkányokból készítettük. Az időre párosított állatokat kereskedelmi forgalomból szereztük be (Janvier Labs) Érzéstelenítés után nyaki dislokációval áldoztuk fel az állatokat. A sejteket  $100-200 \times 10^3$  sejt/ml sűrűségben polilicinnel előzetesen bevont fedőlapokra ültettük, és szérumentes Neurobasal médiumban (Invitrogen) 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub> mellett 16-18 napig *in vitro* (DIV) tartottuk. Ez idő alatt a tápfolyadék felét hetente cseréltük. A neuronokat a SEPT7-GFP-t kódoló plazmiddal transzfektáltuk (Effectene, Qiagen) a cég protokollját követve. Az oldható GFP-t kódoló plazmidot, a pEGFP-C1-et (Clontech) Amaxa Nucleofector készülékkel (Lonza) vittük be a gyártó által javasolt protokollt követve. Minden élő sejtmikroszkópiát extracelluláris oldatban (ECS, 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 10 mM glükóz) végeztünk, amelyet 0,2% szarvasmarha szérumalbuminnal kiegészítettünk pH 7,4 mellett, és ozmolaritással állítottunk be.

5, 9 és 16 *in vitro* nap (DIV) után az oldható GFP-t expresszáló neuronokat 4%-os paraformaldehiddel és 4%-os szacharózzal fixáltuk PBS-ben szobahőmérsékleten 10 percig, majd háromszor öblítettük PBS-ben, mielőtt 0,1%-os Triton-x 100-zal permeabilizáltuk PBS-ben 5 percig. A PBS-ben történő 3 öblítést követően a neuronokat 60 percig blokkoltuk 1% BSA-t és 0,1% hideg vizes halbőrzselatint (Sigma G7765) tartalmazó blokkoló oldatban PBS-ben 60 percig. Ezután a neuronokat 1:500 blokkoló oldatban hígított primer antitesttel inkubáltuk 60 percig, majd ismét blokkoló oldatban inkubáltuk, mielőtt Alexa 568-cal konjugált (Invitrogen) másodlagos antitesttel (1:1000), blokkoló oldatban hígítva 30 percig jelöltük volna. Ezután a fedőlapokat többször átöblítettük PBS-ben, dH<sub>2</sub>O-ba mártottuk, és Mowiol rögzítőközeggel lefedtük. A neuronokat epifluoreszcens mikroszkóppal (Leica DM5000) vizsgáltuk 63x/1,4 NA objektívvel. A képeket hűtött CCD-kamerával (CoolSNAP HQ2, Photometrix) vettük fel és a MetaMorph képalkotó szoftverrel dolgoztuk fel.

## DNS-konstrukciók

Az LCa clathrin könnyű lánc DsRed fúzióját Jim Keen biztosította, és a leírás szerint használtuk (Gaidarov et al., 1999). A PSD-95-GFP-t David Bredt biztosította. Az EGFP-vel jelölt dynamin-1aa (Homo sapiens), dynamin-2ab (Rattus norvegicus) és dynamin-3aaa (Rattus

norvegicus) Mark McNiventől származott. Minden konstrukciót DNS-szekvenálással és a várt molekulatömegű fehérjék immunoblot kimutatásával igazoltunk HEK 293T sejtekben.

## Primer neurontenyésztés és transzfekciók

Hippokampusz neurontenyészeteket készítettünk E18-as patkányembriókból, és 14-24 napig tartottuk *in vitro*. A neuronokat Lipofectamine 2000 (Invitrogen) segítségével transzfektáltuk a gyártó ajánlásainak megfelelően, azzal a különbséggel, hogy minden egyes DNS-konstrukcióból 0,5-0,7 µg-ot 20 µl Opti-MEM-ben és 0,5 µl Lipofectamine 2000-t 20 µl Opti-MEM-ben összekevertünk és 12 lyukú lemezek fedőlapjaira adtuk.

## Élő sejt felvételek

A transzfekciót követően tizenhat-negyvennyolc órával a fedőlemezeket 37°C-on, képkötő pufferrel (120mM NaCl, 3mM KCl, 2mM CaCl<sub>2</sub>, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM glükóz, 10 mM HEPES és 2% B27, pH 7,35, 250mOsm a tenyésztőközegnek megfelelően) töltött lezárt kamrában (Dagan) vettük fel. A széles látómezejű epifluoreszcens képeket Nikon inverz mikroszkóppal készítettük. A konfokális képeket egy Yokogawa forgó lemezes (spinning-disc) konfokális készülékkel (Solamere Technology Group) készítettük, a gerjesztő hullámhosszakat egy 2,5 W-os KrAr lézer (SpectraPhysics) válogatta ki és zárta le egy akusztó-optikai hangolható szűrőn (Neos Technologies) keresztül, az emissziót pedig egy sávszűrőket (Chroma) tartó szűrőkeréken (Sutter Instruments) keresztül irányítottuk. A képeket 100× 1,4NA Plan Achromat objektívvel vettük fel, és Metamorph (Universal Imaging Corporation) segítségével elemeztük 12 bites hűtött CCD-kamerával (Roper Scientific vagy Hamamatsu Inc.)

## Táplálékbevitel-csökkentési protokoll

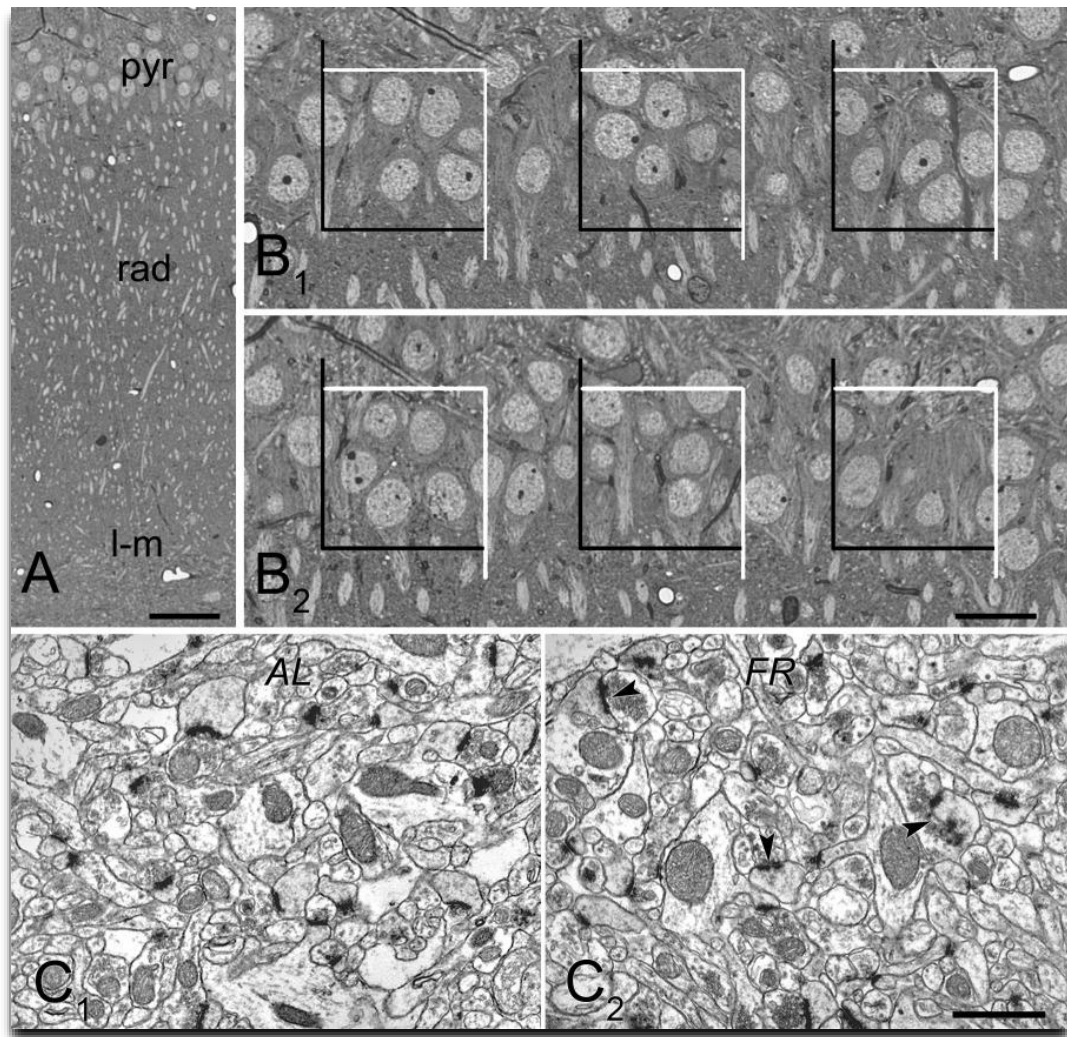
A felnőtt Wistar patkányokat két csoportra osztottuk, mindegyik csoportba hat-hat patkány került. Az első csoportba tartozó állatok kontrollként szolgáltak, standard laboratóriumi körülmények között ad libitum ivóvíz és táplálás mellett, 12/12 órás megvilágítási ciklussal. A második csoportba tartozó állatokat hasonló körülmények között tartottuk, azonban a táplálék mennyiségét a kísérletet megelőző héten napi szinten elfogyasztott mennyiség 60%-ára csökkentettük (40 %-os táplálékmegevonás). Az állatok a sötét megvilágítási ciklus előtt közvetlenül kaptak takarmányt, vízhez pedig szabadon hozzáfértek. Az állatokat hetente

mértük, és a táplálék-csökkentés mellett minden egyéb környezeti paramétert állandó szinten tartottuk.

#### Sztereológiai módszer és lehetséges korlátai

A CA1 hippokampusz stratum pyramidale rétegében lévő neuronok sűrűségét sztereológiai, fénymikroszkópos szinten (Leica DM750, 40x objektív) számszerűsítettük toluidinkékkel festett félvékony metszeteken, a fizikai disszektor módszerrel (Sterio, 1984) (disszektor magassága = 4  $\mu\text{m}$ ; **4. ábra**). Az ismert területű, torzítatlan számlálási képkockákat a piramissejt-rétegen belüli sorozatmetszetek mezőire helyeztük fel. Az első szelvényt tekintettük "referencia" szelvénynek, a másodikat pedig "kereső (*look-up*)" szelvénynek. A számláló egységek neuronmagok voltak, és csak akkor számoltuk őket, ha nem érintkeztek a számláló keret két kizáró vonalával (további magyarázatért lásd az **4. B ábrát**). A kereten belül azon sejtmagok számát vettük figyelembe, amelyek a "referencia" szekció számlálókeretében megjelentek, de a "kereső" szekcióban nem voltak jelen ( $Q^-$ ). A nyilvánvaló gliális jellemzőkkel rendelkező sejteket kizártuk az elemzésből. A vizsgált szövet térfogatát ( $V_d$ ) a következőképpen számoltuk ki:  $V_d = F \cdot t \cdot n$ , ahol  $F$  a torzítatlan számlálási keret,  $t$  a metszet vastagsága (a mikrotóm beállítása alapján) és  $n$  a "referencia" és "kereső" metszetszámok közötti metszetek száma. A neuronális sűrűséget ( $N_d$ ) a következőképpen számoltuk ki:  $N_d = Q^- / V_d$ . Blokkonként hat metszetszámot számszerűsítettünk, és állatonként két blokkot elemeztünk, hogy minden állatban meghatározzuk a neuronális sűrűséget.

Az elektronmikroszkópos vizsgálatot véletlenszerű mintavételezést alkalmazva végeztük „egyes” metszetekből (nem sorozat-metszetekből), hogy optimalizáljuk a gyűjtött minta nagyságát és kimutassuk az FR étrend függvényében a szinaptikus jellemzők változását. Az ezzel a megközelítéssel bevezetett hibák viszonylag szerények (pl. a perforált tüskék számszerű sűrűségét a kontroll állatokban hasonlóan találtuk, mint a korábbi, szintén „egymetszeti” elemzést alkalmazó vizsgálatokban (Calverley and Jones, 1987a, Calverley and Jones, 1987b)). Célunk nem az abszolút értékek sztereológiai szigorú becslése volt; ehelyett azt akartuk megállapítani, hogy vannak-e szignifikáns különbségek a normálisan táplált és az FR állatok között. Mivel minden kísérleti csoport esetében ugyanazt a mintavételi módszert alkalmaztuk, a módszer megfelelő arra, hogy kimutassuk az FR protokollunk által kiváltott lényeges változásokat.



**4. ábra. A hippocampus CA1 régió sztereológiai elemzése.** A: fénymikroszkópos kép a CA1 hippocampus félvékony metszetéről (pyr: stratum pyramidale, rad: stratum radiatum, l-m: stratum lacunosum-moleculare, Méretsáv: 50  $\mu$ m) B: A hippocampus CA1 stratum pyramidale nagy nagyítású felvétele, amelyen a számlálókockák láthatók. A B1 és B2 panelek ugyanazt a CA1 területet mutatják 4  $\mu$ m z-tengely-elválasztással. A kizáró vonalak feketével vannak jelölve. Méretsáv: 20  $\mu$ m. C: AL és FR állatokból származó reprezentatív elektronmikroszkópos felvételek, amelyek a CA1 stratum radiatum neuropil nagy nagyítású nézetét mutatják. A perforált tüske-szinapsziszokat nyílhegyek jelzik. Méretsáv: 1  $\mu$ m.

## Fénymikroszkópos mintafeldolgozás

### Dendrit-morfológia és Scholl analízis

A dendritikus morfológia és komplexitás értékeléséhez a sejteket az esetleges elektrofiziológiai felvételek során 0,2% biocitint tartalmazó, belső pipettaoldat passzív diffúziójával töltöttük fel. A szeleteket 4%-os PFA-oldatba helyeztük át az éjszakai fixáláshoz, 10 percig (3x) mostuk 0,1 M foszfát pufferelt sóoldatban (PBS), 1,5 órán át 0,3% Triton-X-et tartalmazó 10%-os normál kecskeszérummal (NGS) blokkoltuk 0,1 M PBS-ben, és egy éjszakán

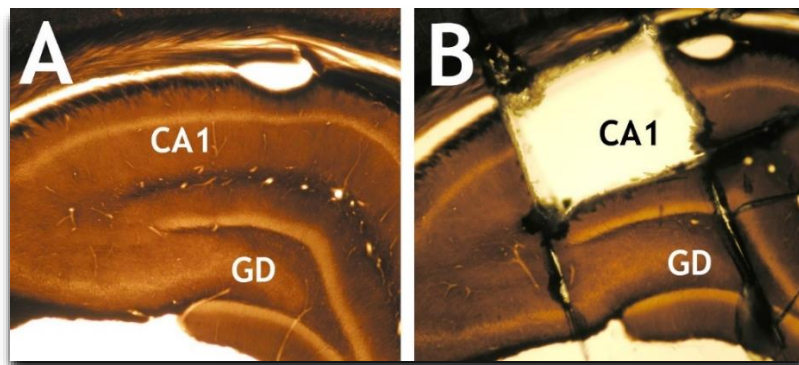
át Alexa 555 vagy Alexa 488 konjugált Streptavidin antitesttel (1:500, Invitrogen) inkubáltuk 0,1 M PBS-ben. A metszeteket végül 3x 10 percig mostuk 0,1M PBS-ben, majd a vizualizációhoz DAPI Fluoromount-G (Invitrogen) segítségével tárgylemezre rögzítettük. A biocitinnel töltött sejtek dendritikus komplexitását LSM 520 konfokális mikroszkópban 20X nagyítással történő képalkotással értékeltük. Optikai metszetekből (1 $\mu$ m) Z stackeket állítottunk össze, és a képeket a Neurolucida 10 (MFB Biosciences) programban dolgoztuk fel a Sholl-elemzéshez.

### Immuncitokémia konfokális mikroszkópos vizsgálathoz

Az alábbi leírás általánosságban mutatja be az egyes célkitűzésekben alkalmazott immuncitokémiai módszereket. Az egyes speciális, ezen általános leírástól lényegesen eltérő lépéseket vagy eljárásokat az adott eredmény tárgyalásánál tüntettem fel. A szabadonúszó 60 $\mu$ m-es vibratóm metszeteket 20%-os normál szarászérummal (NDS; Jackson ImmunoResearch, USA) blokkoltuk 0,1M PBS-ben (pH 7,4), majd 2% NDS-t tartalmazó, az adott kísérletben használt antitestek vagy azok megfelelő kombinációival inkubáltuk egy éjszakán át szobahőmérsékleten. Többszöri mosás után a metszeteket fluorokrómmal konjugált másodlagos antitestekkel inkubáltuk (pl. antinyúl Cy3, antiegér FITC vagy Alexa Fluor488, stb). Az F-aktin vizualizálásához falloidinhoz konjugált Alexa Fluor-488-at (Molecular Probes, USA) használtunk (Allison et al., 1998). A dendritnyúlványok vizualizációjához a lipofil 3,3'-dioctadecyloxa-carbocyanidin-perklorát (DiO; Molecular Probes) festéket használtuk, amely nagy affinitással kötődik a plazmamembránba, és még a legfinomabb neuronális nyúlványokat ill. dendrittüskéket is megjelöli (Burette et al., 2002). Többszöri mosás után a metszeteket üveg tárgylemezre vittük, Vectashield-el (Vector Laboratories, Burlingame, CA) fedtük, és Leica SP2 lézerpasztázó konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. A Plan Apo 63 $\times$  olajimmerziós objektívvel (NA1,4) felvett optikai metszeteket 1024 $\times$ 1024 pixeles formátumban szkenneltük. Az RGB TIFF-ként tárolt képeket digitálisan feldolgoztuk az Adobe Photoshop CS (8.0 verzió; Adobe Systems, USA) programmal. Minden egyes képet vágunk és élesítettünk ill. élesítés nélküli maszkolással; a kontrasztot, a fényerőt, a tónustartományt és a színegyensúlyt szerkesztettük. Minden egyes feldolgozási lépést egységesen alkalmaztunk a teljes képen.

## Elektronmikroszkópos mintafeldolgozás

A fent leírt módon történő perfúziós fixálást követően az agy eltávolításra került, majd vibratómmal (Leica, Németország) ~70 µm vastagságú metszeteket készítettünk, melyeket nátrium-borohidriddel (NaBH<sub>4</sub>, Sigma) kezeltünk a szabad aldehidcsoportok semlegesítése végett, majd ismételt pufferes mosást követően 0,5-1% osmium-tetroxiddal (OsO<sub>4</sub>, Sigma) kezeltük, végül maleát pufferben (pH 6,0) uranil-acetáttal (EMS, USA) kontrasztoltuk metszeteinket. Az így kezelt metszeteket felszálló etanolsor (50-70%-90%-100%) segítségével víztelenítettük, majd epoxy gyantába (Durcupan, Sigma ill. Epon-Spurr, EMS) ágyaztuk, Aclar (EMS) lapok között tárgylemezre helyeztük és 36 órát inkubáltuk 60°C-on, melynek során a műgyanta polimerizálódott. A polimerizált gyantából a kísérlet kívánalmai szerinti, a Bregmához képest megfelelő koordináta-távolságra lévő coronalis metszetekből az agyterületről állatonként azonos területeit sztereomikroszkóp alatt kivágtuk (5. ábra), a kiemelt darabot gyantahengerre ragasztottuk, majd rövid várakozási idő után, 50-70nm vastag elektronmikroszkópos metszeteket készítettük Reichert (Leica) ultramikrotómmal.



**5. ábra** Durcupan műgyantába ágyazott, osmium-tetroxiddal fixált hippocampusz metszetek. Az **A** felvétel egy intakt hippocampusz metszetet mutat, míg a **B** felvételen egy másik metszeten az elektronmikroszkópos vizsgálatra kivágott CA1-es régió helye figyelhető meg (40x nagyítás). GD: gyrus dentatus (GD).

A metszeteket Philips Tecnai vagy Jeol TEM T1011 elektronmikroszkóppal vizsgáltuk 80kV gyorsítófeszültséggel és MegaView 1024x1024 CCD kamerával fotóztuk. A vizsgált mintákban szisztematikusan, de véletlenszerűen kiválasztott területeket fotóztunk azonos nagyítással. Az így elkészített elektronmikroszkópos felvételeken az egyes profilok hosszát, területét, kerületét és bizonyos alaki paramétereit (pl. cirkularitási értékeit ( $\frac{4\pi \cdot \text{terület}}{\text{kerület}^2}$ )) az NIH ImageJ software-el vizsgáltuk (Schneider et al., 2012).



### Immunoperoxidáz festés elektronmikroszkópos vizsgálatra

Az immunoperoxidáz festéshez a szabadonúszó metszeteket 30 percig 1% nátrium-borohidridben PB-ben kezeltük, hogy a szabad aldehidcsoportokat kioltsuk. A metszeteket 30 percig 20%-os NDS-ben inkubáltuk a nem specifikus kötődés elnyomása érdekében, majd 12 órán át következett a primer antiszérumban való inkubálás, 2%-os NDS mellett. A metszeteket biotinilált szekundér antiszérummal (általában Jackson) inkubáltuk 2 órán keresztül, majd extravidin-peroxidázban (1:5000, Sigma, St. Louis, MO, USA) 1 órán keresztül; az immunpozitív struktúrákat 3,3'-diaminobenzidine-tetrahidrokloriddal (DAB) tettük láthatóvá. A metszeteket a fent leírt módon dolgoztuk fel a kontrollkísérletekben, kihagyva az inkubációs oldatból az elsődleges ellenanyagot; a kontrollmetszetekben nem észleltünk immunfestődést. Ez a lépés a szekunder antitestek specificitását hivatott ellenőrizni. Néhány immunoperoxidázzal festett metszetet fénymikroszkópiához használtunk; ezeket zselatinnal bevont üveglemezekre vittük fel, etanolsorban dehidratáltuk, xilollal derítettük, és D.P.X. lefedőanyaggal (Sigma) fedőlemezzel fedtük.

### Immunarany jelölés elektronmikroszkópos vizsgálatra

A beágyazás előtti immunarany jelöléshez (*preembedding jelölés*) a metszeteket az immunoperoxidáz festéshez hasonlóan dolgoztuk fel az Extravidin-fázisig (már ez utóbbit is kihagyva). A PBS-ben történő öblítést követően a metszeteket 1,4 nm-es aranyrészecskékhez (1:80, Nanoprobes Inc., USA) kapcsolt sztreptavidinben inkubáltuk 3 órán keresztül szobahőmérsékleten, majd PBS-ben öblítettük. A metszeteket 0,1 M nátrium-acetátban mostuk (a foszfát- és kloridionok eltávolítása érdekében), majd ezüsttel intenzifikáltuk az IntenSE M kit (Amersham Pharmacia) segítségével.

Az elektronmikroszkópiához szükséges metszeteket ez esetben 0,5%-os ozmium-tetroxid oldat 0,1M PB-ben 35-45 percig posztfixáltuk, majd 1%-os uranil-acetáttal 1 órán át *en bloc* festettük. A metszeteket felszálló etanol-sorban és propilén-oxidban történő dehidratálás után Epon/Spurr vagy Durcupan gyantával (EMS, USA ill. Sigma) infiltráltuk, és tárgylemezekre, Aclar lapok (EMS) közé fektettük. Hetven nanométeres metszeteket vágunk, 300 mesh-es rézrácsra (gridre) húztuk fel, Sato-féle ólommal (EMS) kontrasztosítottuk, majd elektronmikroszkópban vizsgáltuk.

A beágyazás utáni immunarany vizsgálatok során (*posztembedding jelölés*) a metszeteket ozmiummentes beágyazásra dolgoztuk fel. Vékony (~90nm) metszeteket vágunk és

gyűjtöttünk rácsos nikkell gridekre, majd a korábban leírtak szerint dolgoztuk fel az immunarany jelöléshez (Phend et al., 1995). Amikor kontrollként kihagytuk az elsődleges antiszérumot, gyakorlatilag nem lehetett arany szemcséket kimutatni a metszeten; amikor normál szérummal helyettesítettük az immunszérumot, a metszeten elszórtan elhelyezkedő ritka aranyrészecskék nem mutattak felismerhető kapcsolatot a szinapsziszokkal.

#### Az immunarany jelölés kvantitatív elemzése

Elektronmikroszkópos felvételeket készítettünk véletlenszerűen kiválasztott területekről, a CA1 stratum radiatum proximális és középső régióra összpontosítva, a sejtrétegtől ~250 µm-es átlagos távolságra. A különböző szubcelluláris kompartmentekben az immunarany relatív sűrűségének meghatározásához azonosítottuk az axonvégződéseket, a dendrit-törzseket, a tüskéket és a piramissejtmagokat; a (cito)plazmájukban lévő aranyrészecskéket megszámláltuk, és megmértük a területeket. Az elemzésbe jelölt és nem jelölt profilokat is bevontunk. A háttér meghatározásához a piramissejtmagok feletti jelölést számoltuk ki (mivel a magok nem festődtek általában az adott markerre a fénymikroszkópos anyagban, de volt kivétel is (pl. cofilin). A profilok membránkerületei perimétereit és a profilok területét az ImageJ szoftver 1.29-es verziójú area calculator plug-injének (National Institutes of Health, Bethesda, MD) segítségével mértük. Ez a plug-in méri a területet, a teljes területet és az átlagos területet (további információkért lásd: <http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/area.html>). A szomatikus, dendritikus és tüske citoplazmára vonatkozó szemcse-sűrűségeket kiszámítottuk és összehasonlítottuk a nem specifikus jelöléssel, kétoldalas t-teszt segítségével.

A kontroll és éheztetett állatokból származó adatokat Student t-teszttel hasonlítottuk össze; ahol ezt alkalmaztuk, ott adataink minden esetben normál eloszlást mutattak. Wilcoxon-féle rangösszeg próbát alkalmaztunk, hogy megállapítsuk a *wt* és *KO* adatsorok közötti lehetséges szignifikáns különbséget, mivel ez egy nem parametrikus teszt, tehát nem előfeltétele a csoportonkénti normális eloszlás. Az *ad libitum* etetett ill. az éheztetett állatokból származó adatok csoporton belül, egymáshoz képest nem mutattak nyilvánvaló különbséget, ezért az egy csoportba tartozó állatokból származó adatokat összesítettük és így végeztük a statisztikai analízist.

## A vizsgálatokhoz felhasznált főbb antitestek

Az antitest-specifitás igazolására Western blot analízist végeztünk, amennyiben nem egy már jól ismert és karakterizált antitestet használtunk. Röviden, a fehérjéket SDS-PAGE (10%) segítségével elválasztottuk, Immobilon-P polivinilidén-difluorid membránokra vittük át, és 5% zsírtmentes oldott tejporral (Carnation) blokkoltuk mintapufferben (20 mm Tris, 137 mm NaCl, pH 7,6 és 0,1% Tween 20). Az elsődleges antitestet 1:200 arányban hígítottuk a blokkoló oldatban. Az immunkomplexeket ECL immunodetektáló kit (Amersham Biosciences, USA) segítségével vizualizáltuk; a sávokat az Eastman Kodak (USA) képalkotó állomásával rögzítettük, a molekulatömegek meghatározásához ProSieve széles tartományú markereket használtunk.

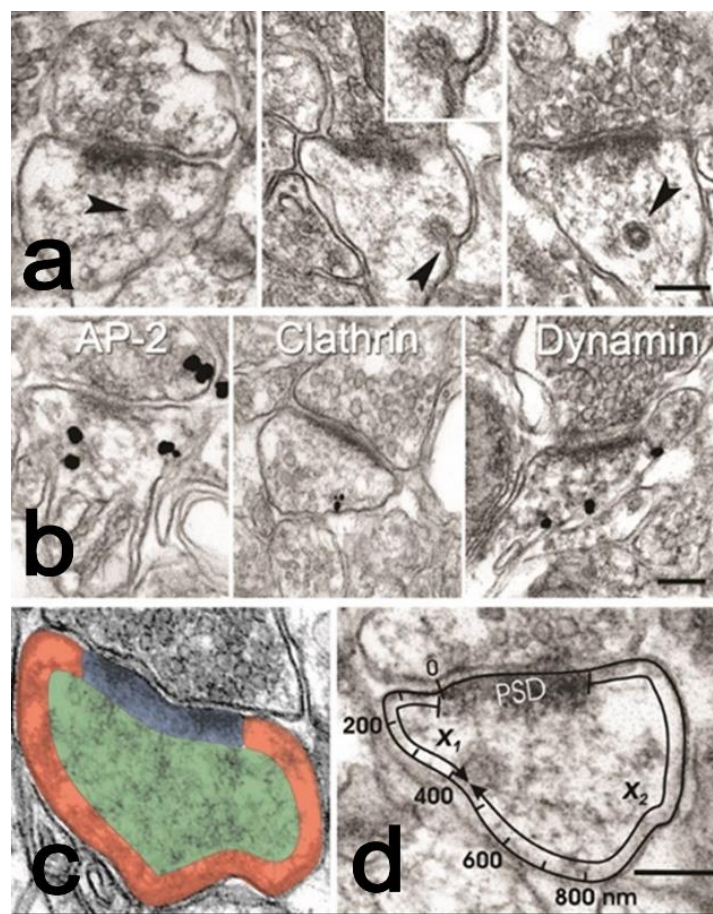
Antitest	gyártó/forrás	Egyéb adat
Rabbit Anti <b>pan-Dyn3</b>	(Mark McNiven laborjából, ill. BD Transduction Lab	1:400
Mouse anti- <b>clathrin heavy chain</b>	Sigma	1:100
Rabbit anti <b>AP-2 subunit <math>\alpha</math>-adaptin</b>	BD Transduction Lab	1:100
Rabbit anti- <b>cortactin</b>	Santa Cruz Biotechnology	1:50
mouse anti- <b>synaptophysin</b>	Sigma	(clone SVP38, ascites fluid, 1:1000;
guinea pig anti- <b>vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT-1)</b>	Chemicon	1:2000;
mouse anti- <b><math>\alpha</math>-actinin</b>	Sigma	(clone EA-53, ascites fluid, 1:500;).
rabbit anti- <b>cofilin</b>	Cytoskeleton, Denver, CO, USA	ACFL02, 0.5 $\mu$ g/m
anti-Human <b>Septin7</b>	IBL International GmbH	1:300; JP18991

A grafikonok létrehozásához és a statisztikák kiszámításához a Microsoft Excel, a Kaleidagraph (Synergy Software, Reading, PA), a CricketGraph (Computer Associates, Islandia, NY) és a Data Desk (Data Descriptions, Ithaca, NY) programokat használtuk. Az alkalmazott statisztikai módszereket és szignifikancia szinteket az eredmények bemutatásánál tüntettem fel.

## Eredmények

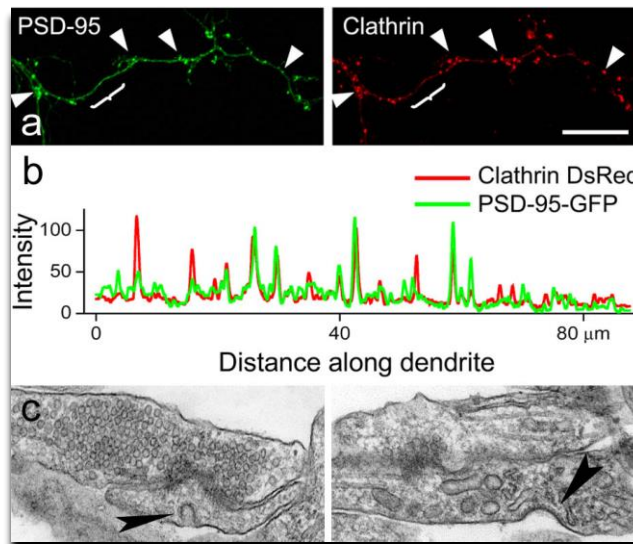
### Endocitótikus zóna a tüskeszinapszisokban

Annak kiderítésére, hogy az endocitótikus molekulák hogyan rendeződnek doménekbe, felnőtt patkány hippocampusz CA1 régióját vizsgáltuk elektronmikroszkópban, elsősorban a stratum radiatum rétegre koncentráltunk, hiszen itt egy viszonylag homogén dendrittüske populáció található, amelyek a CA3 piramisisejtek glutamáterg axonvégződéseit fogadják. Burkos gödrök (*coated pits*) és vezikulák változatos állapotban voltak megfigyelhetők a dendrittüskékben (6. A ábra).



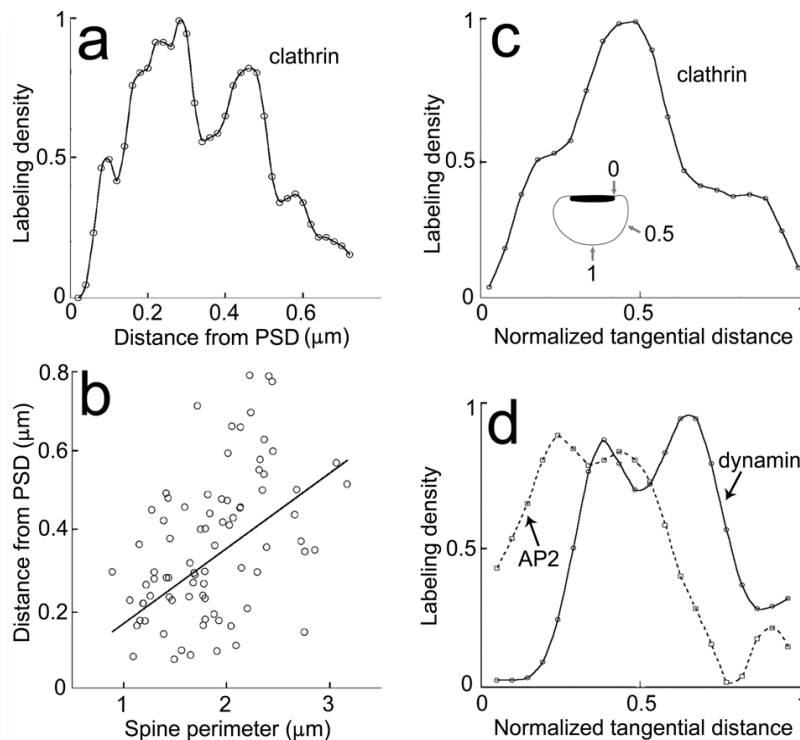
6. ábra Elektronmikroszkópos felvételek, felnőtt patkány CA1 hippocampuszából. a. Endocitózis a tüskékben. A nyílhegyek a burkos gödörre (balra), a vezikulák leválására (középen) és a már levált burkos vezikulára mutatnak (jobbra). b. Ezüsttel intenzifikált immunarany jelölés az endocitótikus fehérjékre. A nem-szinaptikus membrán még azokban a tüskékben is jelölődött, amelyekben nem voltak azonosítható burkos struktúrák. c. Mikroszkópos felvétel színekódolással, amely a tüske "magját" (zöld), a nem-szinaptikus "héjat" (piros) és a PSD régió (kék) jelöli. d. A távolságokat az egyes szemcsék középpontjától a PSD közelebbi ( $x_1$ ) és távolabbi ( $x_2$ ) szélei között mértük meg a plazmamembrán mentén. Méretsávok, 200 nm.

Ezek kevésbé gyakoriak, mint pl. fejlődő agyban, vagy *in vitro* sejt kultúrában tartott idegsejtek esetében, azonban leggyakrabban a PSD-től laterálisan helyezkedtek el (7. ábra). Ilyen, pusztán morfológia alapú megfigyelés csak a már összeszerelődött burokfehérjéből elkészült és láthatóvá vált vezikulák analízisére szorítkozhat. Ezért, hogy a még nem kialakult burok-fehérjék elhelyezkedését is meghatározzuk, pre-embedding immunarany reakciót végeztünk, melynek során clathrint,  $\alpha$ -adaptint (AP-2 egyik alegysége) és dynamin-t mutattunk ki. A látható burkos vezikulák általában jelölődnek ilyen módszerrel, azonban a jelölés túlnyomó része nem vezikulákkal vagy gödrökkel asszociálódott. Hogy meghatározzuk az említett fehérjék membránhoz viszonyított pozícióját, megmértük az ezeket reprezentáló arany szemcsék radiális távolságát, és összehasonlítottuk a tüskemembránhoz közeli perifériás („tüske-kérgi”) részben ( $\leq 60$ nm távolság a membrántól) és a tüske belsejében ( $> 60$ nm a membrántól) található jelölést (6. c ábra.)



7. ábra. Clathrinburkos gödrök *in vitro* hippocampális neuronok poszt-szinaptikus régióiban. **a.** Konfokális kép egy hippocampális neuronról, amely **clathrin-DsRed** és **PSD-95-GFP** ko-transzfektált. A PSD-95 gyakran csoportosult olyan pontokba, amelyek valószínűleg szinapsziszokat jelentenek (nyílhegyek); ezekben a régiókban a clathrin pontok is jellemzően megfigyelhetők. A PSD-95 pontok nélküli dendritszakaszok általában nem tartalmaztak clathrin pontokat. **b.** Az (a) kép vonalelemzése, amely az átlagos intenzitást mutatja a dendrit középpontja mentén húzott 8 pixel széles vonal mentén. **c.** Burkos gödrök (nyílhegyek) elektronmikroszkópos képe, ugyanezen kultúrákból származó neuronok tüskéiben és dendritjeiben. A bevonatos gödrök jellemzően a PSD-től távolabb helyezkednek el.

A clathrin és dynamin jelölés denzitása közel kétszer akkora volt a membrán-közeli, mint a citoplazmatikus központi részben (clathrin: kéreg,  $17,6 \pm 1,1$  szemcse/ $\mu\text{m}^2$ , központ,  $10,9 \pm 1,4$  szemcse/ $\mu\text{m}^2$ ; dynamin: kéreg,  $19,9 \pm 2,1$  szemcse/ $\mu\text{m}^2$ , központ,  $11,5 \pm 1,0$  szemcse/ $\mu\text{m}^2$ ;  $P < 0,002$ ), míg az AP-2 adaptor fehérje egyenletesen oszlott meg a tüskeplazmában (kéreg,  $19,0 \pm 2,6$  szemcse/ $\mu\text{m}^2$ ; központ,  $20,0 \pm 3,2$  szemcse/ $\mu\text{m}^2$ ,  $P > 0,5$ ). Ebből a megoszlásból megállapítható, hogy a clathrin és a dynamin a plazmamembránhoz közel koncentráliódik, látható vezikulák és gödrök távollétében is, amely gyorsan felhasználható, membránhoz közeli endocitotikus „fehérje-pool” jelenlétére utal.



**8. ábra.** Az immunarany jelölés kvantitatív elemzése. (a) A clathrin jelölés sűrűsége a tüske "hájában" (maximális sűrűség 1,0), a PSD szélétől mért érintőleges távolság függvényében ábrázolva. (b) A szórásdiagram korrelációt mutat a clathrin PSD-től való távolsága és a tüske pereme között ( $r = 0,50$ ;  $P < 0,001$ ). (c) A clathrin sűrűség, ábrázolva az érintőleges távolsággal szemben, normalizálva a tüske méretével (lásd inzert). (d) A dynamin és az AP-2 normalizált érintőleges eloszlása.

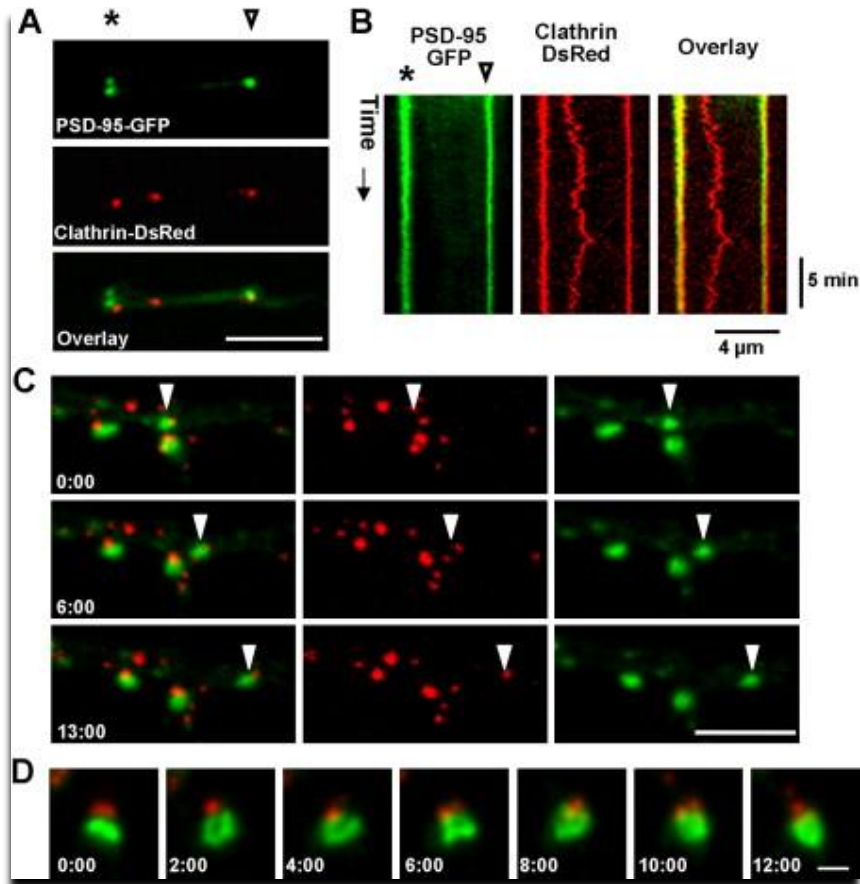
A fehérjék tangenciális („érintőleges”) eloszlását is megvizsgáltuk: az egyes, a tüske perifériás területén található arany szemcsék távolságát megmértük a membrán mentén a PSD-hoz viszonyítva (6. d ábra). Kvantitatív analízissel azt találtuk, hogy clathrin csak ritkán fordul elő a szinapszishoz közel (8. a ábra), de a PSD szélétől számított 150-500nm távolságban jelentősen megnőtt a koncentrációja (átlagos távolság,  $340 \pm 15\text{nm}$ ). Nagyon erős pozitív

korrelációt találtunk a tangenciális távolság és a túske-profil teljes kerülete között (**8. b ábra**), ami arra utal, hogy a túske méret befolyásolja a clathrin pozícióját. Hogy ezt kompenzáljuk, normalizáltuk az egyes szemcsék helyzetét úgy, hogy az a szemcse, amely pontosan a PSD szélén helyezkedett el 0 értéket kapott, míg a PSD két szélétől a membrán mentén mérve egyenlő távolságra elhelyezkedő clathrin fehérjét kódoló szemcse 1.0 értéket kapott (**8. c ábra**). A normalizált adatokat megvizsgálva azt találtuk, hogy a clathrin legmagasabb koncentrációt  $0.48 \pm 0.02$  normalizált távolságra éri el ( $n=134$  szemcse), közel félúton a PSD széle és a legtávolabbi tangenciális membránpozíció között (**8. c ábra**). Ehhez hasonlóan a dynamin is a PSD-től távol koncentrált. Érdekes módon, az AP-2 adaptor fehérje szignifikánsan közelebb koncentrált a PSD-hoz ( $0,41 \pm 0,02$ ;  $n=135$ ), mint a clathrin, ugyanakkor a dynamin volt az a fehérje, amelyik a legtávolabbi helyezkedett el ( $0,56 \pm 0,02$ ;  $n=130$ ). Kontrollként megvizsgáltuk az ismert periszinaptikus lokalizációval rendelkező EAAC1 glutamát transzporter elhelyezkedését, amely valóban a PSD-hoz közel,  $0.15$  normalizált tangenciális érték közelében mutatta a legmagasabb koncentrációt. Továbbá véletlenszerűen az egyes túskekre vetített pontok helyzetét is analizáltuk, hogy megbizonyosodjunk arról, hogy minden kísérletes adatsor szignifikánsan különbözik ettől a hipotetikus és véletlenszerű eloszlástól (Kolmogorov-Smirnov teszt,  $P < 0,01$ ).

### A clathrin és a PSD viszonya

Annak érdekében, hogy megfigyelhessük a clathrinban gazdag területek állandóságát és mobilitását a PSD-hoz közeli területeken konfokális *'time-lapse imaging'* módszerével vizsgáltunk dendriteket. 17 napos, *in vitro* (17DIV) hippokampális idegsejteket vizsgáltunk, melyek PSD-95-GFP ill. clathrin-Ds-Red fehérjéket is kifejeztek (**9. A. ábra**). A clathrin szinte minden esetben pontszerűen volt detektálható mind a dendrit törzsekben, mind pedig a különálló PSD-ok közelében, amelyek PSD-95-GFP pontként voltak felismerhetőek. A clathrin pontok viselkedését és mozgását kymograph-analízissel követtük, amely lehetőséget ad arra, hogy egy dendritben megfigyelt terület fluoreszcens intenzitását egy adott időintervallumon keresztül vonalszerűen leképezhessük. A PSD-95 pontok közelében megfigyelhető clathrin területek kymographjai szinte mindig vertikális sávokból álltak a megfigyelés teljes időtartamában, ami arra utal, hogy a PSD-95-GFP pontok és a clathrin szoros asszociációban maradnak egymással és mobilitásuk egymáshoz képest rendkívül korlátozott (**9. B. ábra**). Ezzel

szemben azok a clathrin pontok, amelyek a PSD-től távolabb helyezkedtek el jelentős mobilitást mutattak (9. B. ábra). Esetenként megfigyeltünk mobilis PSD-95 pontokat is, amelyek a dendrit mentén haladtak átlagosan 0,2 $\mu$ m/min. sebességgel. Meglepő módon a mobilis PSD-95 pontokkal konzisztensen együtt mozgott a hozzájuk társult clathrin-Ds-Red pont (9. C. ábra).



9. ábra. Az endocitótikus zóna stabilan a PSD közelében helyezkedik el. (A) PSD-95-GFP-t és clathrin-DsRed-et koexpresszáló hippocampális neuron (17 DIV) dendritága. Méretsáv: 4  $\mu$ m. A csillag és a nyílhegy a (B) kymográfiai elemzéshez használt dendrit mentén lévő pontokat jelöli. (B) A fluoreszcencia intenzitásának kymográf-elemzése a dendritikus ág mentén (vízszintes) az idő függvényében (függőleges) egy 14 másodpercenként felvett képsorozat során. A csillag és a nyílhegy a dendrit mentén lévő pontokat jelöli, amelyek megfelelnek az (A) pontban szereplő pozícióknak. (C) A PSD-95 alkalmankénti mobilis klaszteréhez (nyílhegy, zöld) továbbra is társul egy clathrin pont (piros). A struktúra átlagosan 0,20  $\mu$ m/perc sebességgel mozgott. Méretsáv: 5  $\mu$ m. (D) A clathrin (piros) a PSD (zöld) közelében marad, még akkor is, ha az méret- és morfológiai változásokon megy keresztül. Az idő perc:másodpercben van feltüntetve. Skála: 1  $\mu$ m.

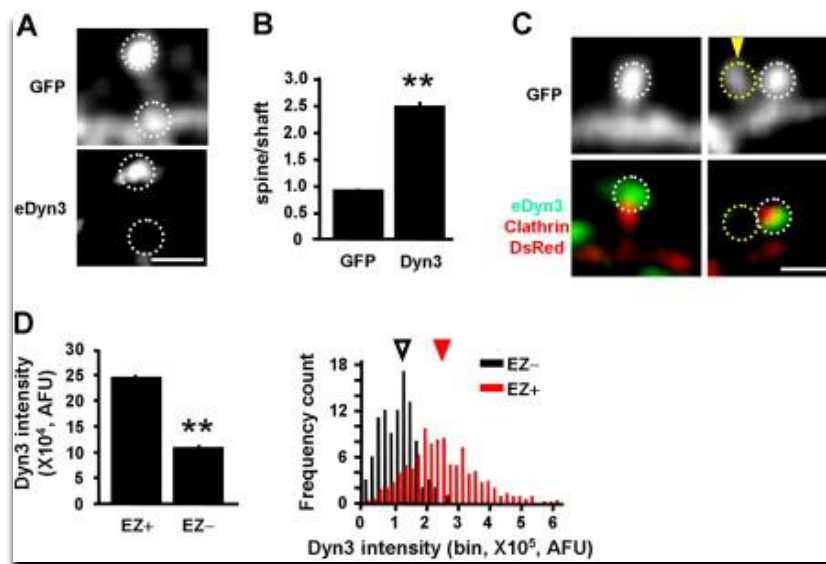
Ráadásul számos esetben megfigyelhető volt a PSD-k időbeni morfológiai (alak és méretbeli) változása, ennek ellenére a clathrin pontok fizikai közelségben maradtak velük (9. D. ábra). Ezek alapján kijelenthetjük, hogy a szinapszisoktól távolabb elhelyezkedő burkos



vezikuláktól eltérően, a PSD-hoz közeli clathrin pool stabil és tartósan a szinapszis közelségében tartózkodik.

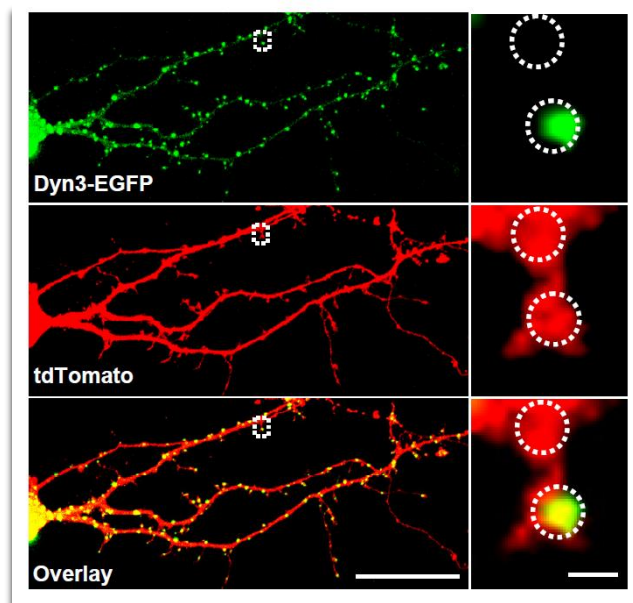
## A dynamin-3 laterálisan lokalizálódik a tüskék membrán-doménjében

Ahhoz, hogy egy molekula a PSD-t és az EZ-t össze tudja kapcsolni, rendelkezni kell olyan tulajdonságokkal, amelyek mind a posztzinaptikus állványfehérjékkel, mind pedig az endocitotikus apparátus szervezőfehérjékkel való kapcsolódásra képessé teszi. Korábbi kutatásokból ismert, hogy az érett hippokampális neuronok 10-15%-a nem rendelkezik EZ-val (Blanpied et al., 2002). Ezt kihasználva kerestünk olyan PSD és EZ állványfehérjéket, amelyek tüskékben való jelenléte korrelált az EZ jelenlétével.



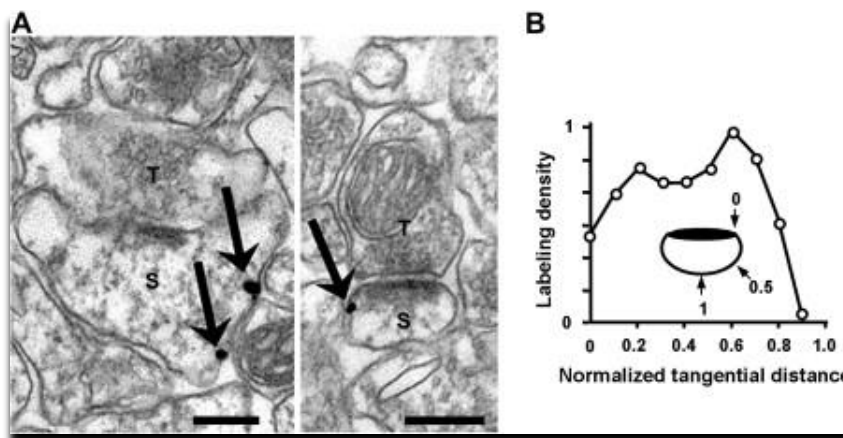
10. ábra. A dynamin-3 a dendrittüskékben koncentrálik és korrelál az endocitotikus zóna jelenlétével. **A.** Konfokális felvétel az endogén dynamin-3 (eDyn3) festődéséről egy GFP-t expresszáló hippokampális neuronban (34 DIV). Fehér szaggatott körök jelzik a tüske és a tengely intenzitásának mérésére kiválasztott régiókat. Méretség: 2µm. **B.** A tüskék dúsulásának számszerűsítése. Az adatok a tüske/tengely fluoreszcencia-intenzitás arányok átlag±SEM értékeit mutatják. n=8 neuron, 270 tüske, illetve \*\*P<0,001 a GFP-hez képest, t-teszt. **C.** Konfokális képek az endogén **dynamin-3** (eDyn3) festődéséről GFP-t és **clathrin-DsRedet** expresszáló hippokampális neuronokban. A dynamin-3-at nem tartalmazó tüskékből hiányzik a clathrin is (sárga szaggatott kör, nyílhegy). Méretség: 2µm. **D.** A dynamin-3 (Dyn3) mennyiségi meghatározása az endocitotikus zónát tartalmazó (EZ+) vagy nem tartalmazó (EZ-) tüskékben. A Dyn3 integrált intenzitását a szaggatott körökben mértük. Balra, a dynamin-3 fluoreszcencia intenzitás átlag±SEM. EZ+, 557 tüske, EZ-, 98 tüske; n=9 neuron; \*\*P<0,001 az EZ+ tüskékhez képest, t-teszt. Jobbra, az EZ- és EZ+ tüskék dynamin-3 fluoreszcencia-intenzitásának hisztogram-elemzése. A nyílhegyek a medián értékeket jelzik. (AFU, arbitrary fluorescence unit - fluoreszcenciaegységek.)

Ezek közül a dynamin-3-at, a nagy GTPáz fehérjecsalád egy tagját választottuk, számos okból kifolyólag: először is a dynamin-3-ról ismert, hogy posztszinaptikus kompartmentben található, és egyik splice-variánsa a tüskék alakját szabályozza (Gray et al., 2003, Gray et al., 2005a). Másodsor, a dynamin-3 a posztszinaptikus Homer-1 adaptorhoz képes kapcsolódni (Gray et al., 2003), valamint homológ, sőt oligomerizálódni is képes a család másik két tagjával a dynamin-1-gyel és -2-vel, amelyek az endocitótikus gépezet jól ismert tagjai (Praefcke and McMahon, 2004, Kruchten and McNiven, 2006). Végezetül ismert, hogy a dynamin-3 elsősorban az agyban fejeződik ki és az idegrendszer fejlődése során a szinapszisok kialakulásának időszakában különösen fontos szerepet játszik (Gray et al., 2003, Gray et al., 2005a). A korábban már ismert eredményekkel (Gray et al., 2003) egybehangzóan azt találtuk, hogy *in vitro* sejt kultúrában jelentős a hippocampális neuronok dendrittüskéiben a dynamin-3 koncentráció (**10. A. ábra**), és részben átfed a PSD-95-tel a két molekula immunfestődési mintázata. Hogy ezt a 'tüskedúsultságot' számszerűsíteni is tudjuk, megmértük a fluoreszcens intenzitást a túske fejben és a dendrit törzsben, és azt találtuk, hogy a dynamin-3 túske/dendrit törzs aránya 2.8-szor magasabb volt a GFP-nél (**10. A. ábra**, n=8 neuron, 270 túske,  $p > 0.001$ ). Arról is meg akartunk bizonyosodni, hogy ez a dynamin-3 feldúsulás posztszinaptikus tüskékben található, és nem esetlegesen preszinaptikus fehérjéket azonosítunk tévesen. Ezért Dyn3-EGFP-t posztszinaptikusan kifejező sejteket is megvizsgáltunk, és azt találtuk, hogy a Dyn3-EGFP erőteljesen és elsősorban tüskékben lokalizálódik (**11. ábra**).



**11. ábra. A Dynamin-3 tüske célzásának molekuláris meghatározói.** A posztzinaptikusan expresszált GFP-Dyn3 (zöld) tüske lokalizációja egy hippokampális neuronban (DIV 14-20), amely tdTomato-t expresszál sejtkitöltésként. A jobb oldali panelek a szaggatott fehér dobozokban lévő régióknak felelnek meg. Méretség: 30  $\mu\text{m}$  és 1  $\mu\text{m}$ . A jobb oldali panelek fehér szaggatott körei a tüske- és tengely-intenzitásméréshez kiválasztott régiókat jelölik.

Mivel a tüskék 10-15%-a nem tartalmaz EZ-t, kíváncsiak voltunk arra, hogy a dynamin-3 jelenléte korrelál-e az EZ jelenlétével a tüskékben. Ehhez GFP-t és Clathrin- DsRed-et egyszerre kifejező sejteket fixáltunk és dynamin-3 immuncitokémiai jelölést hajtottunk végre; ezt követően az integrált fluoreszcens intenzitást megmértük azokban a tüskékben, amelyekben volt (EZ+) ill. azokban, amelyekben nem volt clathrin DsRed (EZ-). Már szemrevételezéssel is jól megfigyelhető volt, hogy azokból a tüskékből, amelyekből hiányzott a dynamin-3 jel, a clathrin pontok is hiányoztak (**10. C. ábra**). Kvantitatív analízis után azonban számszerűsítettük is ezen benyomásunkat: amely tüskékben jelen volt az endocitotikus clathrin fehérje (EZ+) azok közel 2,5-ször magasabb koncentrációban tartalmaztak dynamin-3-at, mint azok a tüskék, amelyekben nem volt jelen EZ (**10. D. ábra**). Tehát a dynamin-3 jelenléte erőteljesen korrelál a tüskékben található EZ jelenlétével.



**12. ábra. A Dynamin-3 a tükmembrán PSD-től laterálisan helyeződik.** (A) felnőtt patkány CA1 hippocampus elektronmikroszkópos felvételein, a dinamin-3 immunarany jelölését nyilak jelzik. A Dynamin-3 a tüske oldalsó membránjainak doménjeire lokalizálódik. S, tüske; T, preszinaptikus terminál. Méretség: 200 nm. (B) A tükmembránhoz lokalizált dinamin-3 immunarany szemcsék denzitásának elemzése a tükemérettel normalizált tangenciális távolság függvényében ábrázolva.

A dynamin-3 precíz szubcelluláris lokalizációját meghatározandó, felnőtt patkányok hippocampusának CA1 stratum radiátumában immunarany jelölést alkalmaztunk. Korábbi tanulmányoknak megfelelően, a dynamin-3-at kódoló aranyszemcsék aszimmetrikus szinapszisok posztzinaptikus kompartmentjeiben volt detektálható (**12. A. ábra**). A

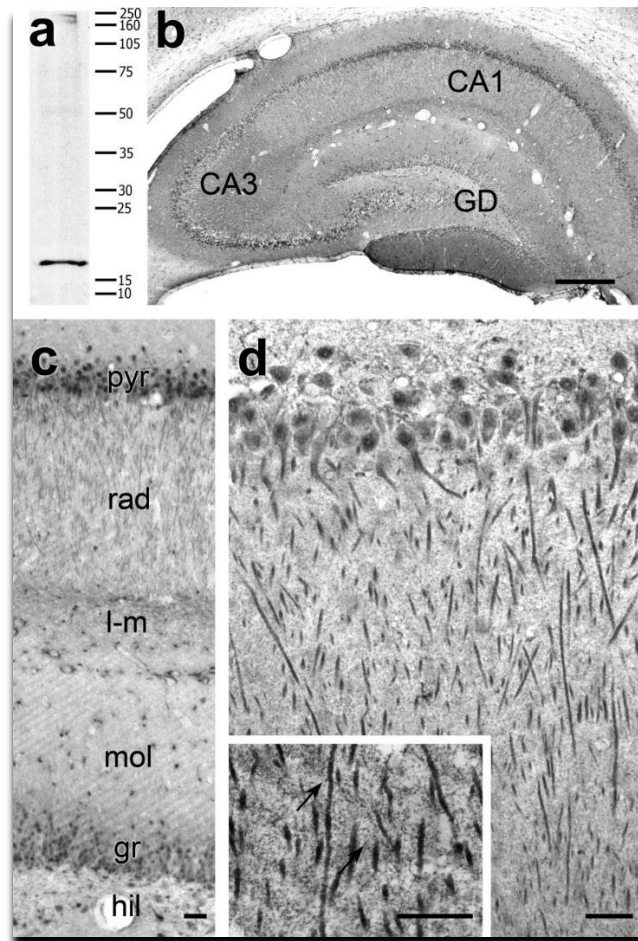
dendrittüskékben a dynamin-3 ritkán fordult elő közvetlenül a PSD-ban, de gyakori volt, hogy a PSD-tól ill. annak szélétől laterálisan elhelyezkedő membrán doménekben jelentek meg az aranyszemcsék. Hogy kvantifikáljuk a dynamin-3 elhelyezkedését ezen a laterális membránszakaszon, megmértük a szemcsék helyzetét a PSD szélétől a membrán mentén a már korábban ismertetett módszerrel (Racz and Weinberg, 2004). Az szemcsék 'nyers' távolságának összesítésekor azt találtuk, hogy a dynamin-3  $324 \pm 32$  nm átlagos távolságra található a PSD-tól. Azonban a különböző méretű tüskék miatt normalizálni szükséges az adatokat olyan módon, hogy a 0 érték a PSD szélének, míg az 1,0 érték a PSD két szélétől egyenlő távolságot jelent. Így a különböző méretű tüskékből nyert távolságadatokat nem torzítják a kapott eredményeket. Azt találtuk, hogy a dynamin-3 pont a PSD széle és a legtávolabbi tangenciális pont között félúton lokalizálódik (normalizált tangenciális távolság  $0,51 \pm 0,03$ , **12. B. ábra**). Tehát a dynamin-3 megfelelő szubcelluláris elhelyezkedéssel rendelkezik ahhoz, hogy a PSD-t és az EZ-t összekapcsolja.

## Aktin-szabályozó fehérjék szerveződése a tüskékben

### Cofilin

#### Fénymikroszkópia

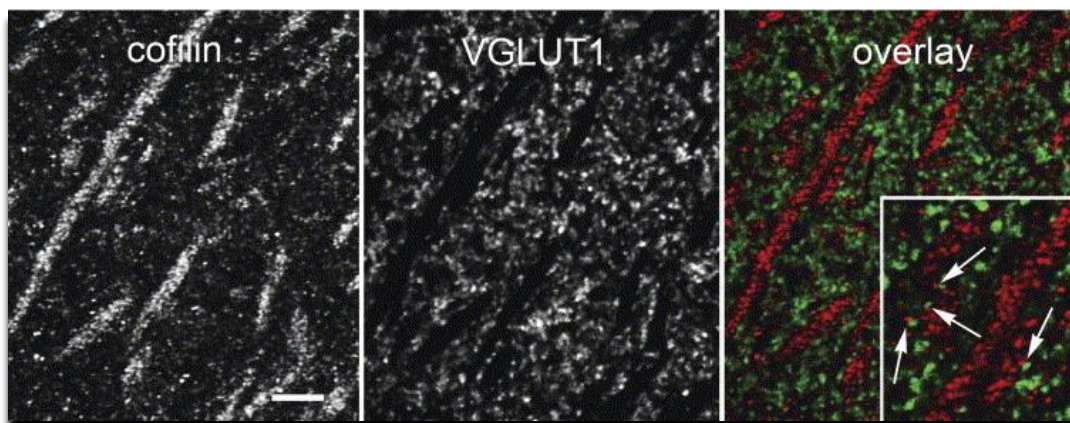
Western blot analízissel értékeltük az anti-cofilin antitest specifitását, megerősítve, hogy az antitest egyetlen ~20 kDa-nál megjelenő sávot ismer fel a hippocampális szövetből származó mintákból (13. a. ábra).



**13. ábra. Immunoperoxidáz festés cofilinre.** (a) A poliklonális nyúl anti-cofilin antitest egyetlen sávot mutatott ki (~20 kDa-nál) a patkány hippocampusz homogenátumának immunoblotjaiban. (b) Mikroszkópos felvétel, amely a hippocampális formáció festődését mutatja. (c) Nagyobb nagyítású felvételen a festődés lamináris mintázata látható (*gr*, szemcsesejt réteg; *hil*, hilus; *l-m*, stratum lacunosum-moleculare; *mol*, a gyrus dentatus molekuláris rétege; *pyr*, piramisréteg; *rad*, stratum radiatum). (d) Festett sejttestek, sejtmagok és apikális dendritok a CA1 régióban. Képbetét: a stratum radiatum nagy nagyítású nézete a dendritok közvetlen szomszédságában immunpozitív pontokat mutat (nyilak); ezek a neuropilben lévő pontok dendrit-tüskéknek felelhetnek meg. Méretsávok = 5 mm a; b, 500  $\mu$ m; c, d, 50  $\mu$ m; betét, 25  $\mu$ m.

Ezzel az antitesttel az immunfestés kiterjedt volt az agy egész szürkeállományában. A festődés a számos tüskés neuront tartalmazó területeken intenzív volt, és különösen szembetűnő volt a kisagyban, a szaglógumóban, a striatumban és a hippocampusban. A kisagyban tapasztalt immunfestődés hasonlított a korábban Lena és munkatársai által az ADF-ről szóló tanulmányban közöltekhez, akik a Purkinje-sejtek dendritjeiben, dendritikus tüskéiben és posztzinaptikus denzitásaiban találtak festődést (Lena et al., 1991). A hippocampuson belül a neuropil festődése intenzív volt a gyrus dentatus molekuláris rétegében, valamint az Ammon-szarv stratum radiatumában és stratum lacunosum moleculare-jában (**13. b.-c. ábra**). A CA1-ben a cofilin immunfestés a piramissejtek sejt-testjeire és dendritjeire koncentrált. A sejtmagok is megfestődtek (ahogy az várható volt, mivel a cofilin nukleáris lokalizációs szekvenciát tartalmaz, és foszforiláció-függő módon jut a sejtmagba (Abe et al., 1993, Nebl et al., 1996). Nagy nagyítással számos intenzíven festett pont volt látható, mind a dendritekhez kapcsolódóan (**13. d. ábra**), mind a neuropilben elszórtan, ami arra utal, hogy a cofilin szinapszisok kialakításában vesz részt.

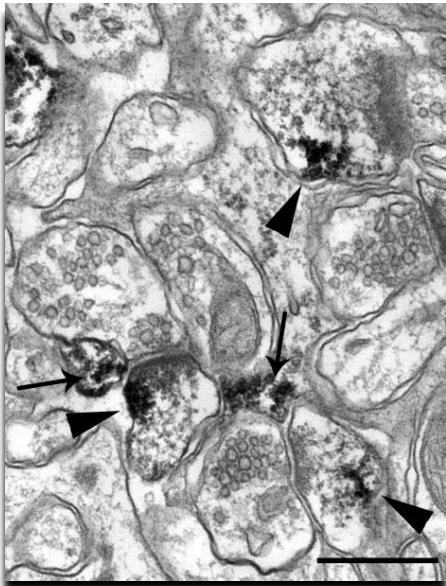
E festődés helyének tisztázása érdekében nagyfelbontású konfokális mikroszkópiát végeztünk, a CA1 stratum radiatumára összpontosítva. A cofilin pontok gyakran társultak a VGLUT1-re immunpozitív pontokhoz (**14. ábra**). A két marker pontszerűen megjelenő struktúrái jellemzően egymás mellett helyezkedtek el, csak kis átfedéssel, ami felveti annak lehetőségét, hogy a cofilin a posztzinaptikus struktúrákban koncentrálnak.



**14. ábra.** A cofilin eloszlása a CA1 radiatum stratumában. A preszinaptikus VGLUT1 (zöld) és a cofilin (piros) immunopozitív pontok (nyilak, ld. fehér négyzet) egymáshoz való kapcsolódása (de át nem fedése, kolokalizációja) arra utal, hogy a cofilin a posztzinaptikus helyekre lokalizálódhat. Méretség: 5 µm, a négyzetben lévő részletre pedig 2 µm.

### *Elektronmikroszkópia*

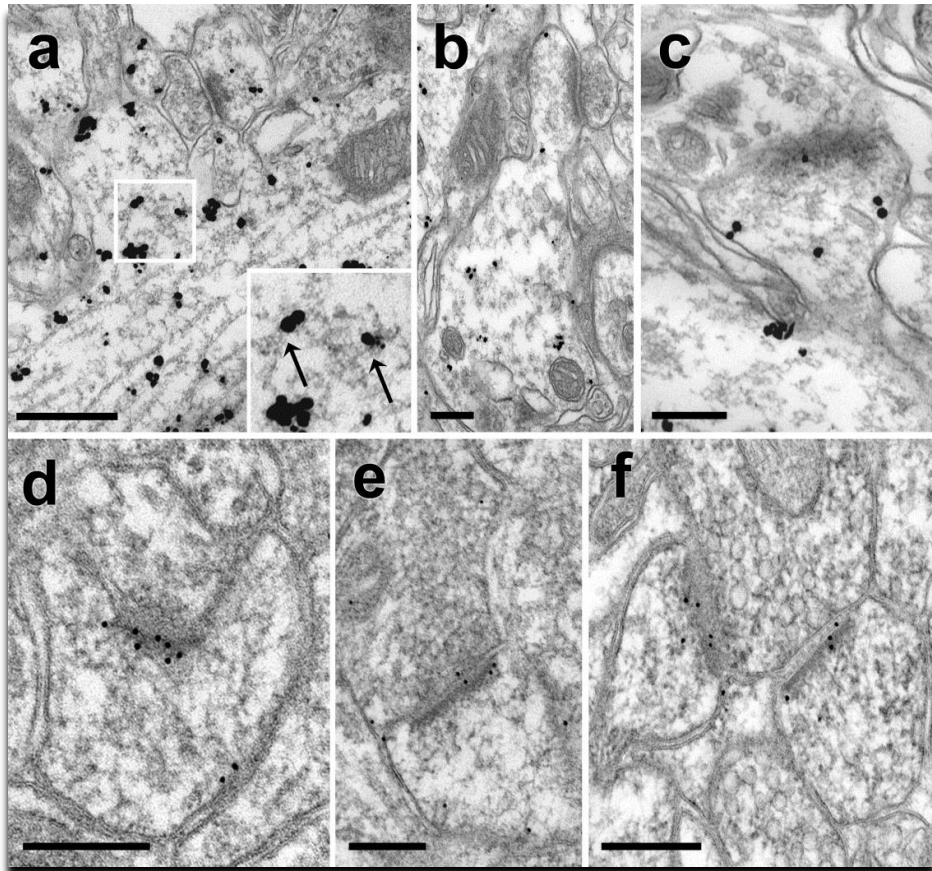
A cofilin szubcelluláris szerveződésének pontosabb megértése érdekében immunjelöléssel kombinált elektronmikroszkópiát végeztünk. A legtöbb dendrittörzsben az immunperoxidáz reakciótermék foltszerűen jelent meg, gyakran mikrotubulusokhoz társulva. Reakciótermék volt látható a kis periszinaptikus, valószínűleg gliális eredetű profilokban (**15. ábra**, nyilak), de ritkán volt kimutatható axonokban és axonvégződéseken. A festődés a tüskékben volt a legszembetűnőbb; a reakciótermék időnként kitöltötte a tüskéket, de leggyakrabban a plazmamembrán alatti foltokra korlátozódott, a tüske citoplazmájának többi részét nem jelölte (**15. ábra**, nyílhegyek). A reakciótermék általában hiányzott a PSD-ből. Így az immunperoxidáz elektronmikroszkópia megerősíti fénymikroszkópos megfigyelésünket, miszerint a cofilin a dendriteken és a dendrittüskéken belül található.



**15. ábra.** Elektronmikroszkópos felvétel a CA1-ben lévő cofilin immunperoxidáz festését mutatja. A nyílhegyek a tüskéken belüli régiókra mutatnak, amelyek immunfestést tartalmaznak, közvetlenül a plazmamembrán alatt. A nyilak a cofilin immunfestődést tartalmazó, valószínűsíthetően periszinaptikus asztrocita végtalpakra mutatnak. Méretsávok: 200 nm.

Ezek az adatok arra utalnak, hogy a cofilin a tüskékben közvetlenül a nem szinaptikus plazmamembrán alatt koncentrálódik. Azonban, bár az enzimatisz amplifikáció rendkívül érzékenyvé teszi az immunperoxidáz jelölési módszert, a DAB-reakció terméke elvándorolhat az enzimatisz helyről. Az antigén pontosabb lokalizálása érdekében immunarany jelölést végeztünk, az optimális érzékenység érdekében beágyazás előtti módszereket alkalmazva. Az 1,4 nm-es (kolloidális) arannyal történő jelölés után az ezüst intenzifikálás számos szemcsét mutatott ki a dendritekben, amelyek általában mikrotubulusokhoz kapcsolódtak. A dendrit-törzsekben az aranyjelölés az F-aktinra emlékeztető vékony, filamentózus struktúrákhoz is

társult (16. a. ábra). A tüskékben szemcsék voltak láthatók, általában a plazmamembrán közelében koncentrálódva (16. b.-c. ábra).



**16. ábra.** Immunarany jelölés a cofilinre a CA1 stratum radiatumban. (a,b) Az elektronmikroszkópos felvételeken immunpozitív dendritok láthatók. Az A-ban az apikális dendritben látható ezüsttel intenzifikált arany szemcsék többsége mikrotubulusokhoz kapcsolódik. Az arany szemcsék más filamentózus elektronrendeződéshez, feltehetően F-aktinhoz is társulnak (lásd a nyilakat a betétben). (c) Az ezüsttel intenzifikált arany szemcsék az immunjelölt tüskékben közvetlenül a plazmamembrán alatt koncentrálódnak. Egy arany szemcsé látható a PSD felett (4%-os PFA-val fixált anyagból). (d-f) Beágyazás utáni (posztembedding) immunarany jelölés. Az arany szemcsék a PSD felett és a tüske citoplazmájában, a plazmamembrán közelében helyezkednek el. Méretsávok: a: 500 nm b-f: 200 nm.

Erősen fixált anyagban a PSD fölött ritkán volt megfigyelhető jelölés. A beágyazás előtti technikák azonban a PSD-on belüli fehérjék kimutatásában nem mindig képesek felismerni az antigént, mivel az antitestek korlátozottan férnek hozzá a poszt-szinaptikus specializáció sűrű fehérjemátrixához (Lorincz et al., 2002, Racz and Weinberg, 2004). Ezzel összhangban a PSD citoplazmatikus szegélyéhez kapcsolódó ezüst/arany szemcsék láthatóak voltak ugyan a glutáraldehid nélkül preparált anyagban, de a gyenge szerkezeti megőrzés megnehezítette a pontosabb meghatározást (16. c. ábra). Ennek a nehézségnek a leküzdésére a beágyazás utáni immunarany jelölést végeztünk. A citoplazmán belüli jelölés mintázata hasonló volt a beágyazás



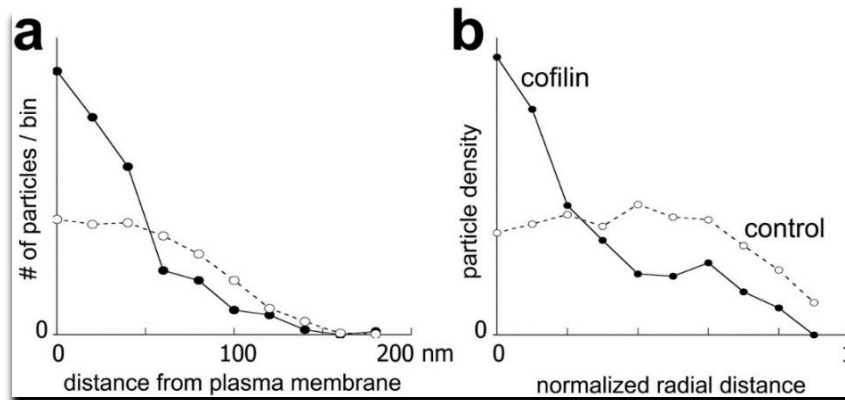
előtti jelölésnél látottakhoz, de a beágyazás utáni jelölés a PSD felett is bőséges cofilin jelölést mutatott (**16. d.-f. ábra**). A véletlenszerű mintában a tüskék több mint 80%-a mutatott immunarany jelölést, ami arra utal, hogy a legtöbb tüskében jelen van a cofilin. Érdekes módon még a citoplazmájukban immunarany részecskéket nem tartalmazó tüskék is gyakran tartalmaztak jelölést a PSD-ban (**16. f. ábra**). Ezek az eredmények azt sugallják, hogy az preembedding technikával nem jelölt tüskék mégis tartalmazhatnak cofilint, de a PSD egy, az antitestek által nehezen hozzáférhető részére korlátozódva.

### *A tüskék immunarany jelölésének kvantitatív elemzése*

Tudni akartuk, hogy a cofilin egyenletesen oszlik-e el, vagy inkább a tüskén belüli specifikus területekre korlátozódik. Ezért az immunarany-jelölt anyagot elemeztünk, megmérve a cofilint kódoló részecskék távolságát a tüske plazmamembránjától. Ehhez az elemzéshez csak a tüske citoplazmájában, de nem a PSD-ben fekvő részecskéket vettük figyelembe. A beágyazás előtti immunarany jelölés elemzése azt mutatta, hogy a cofilin a plazmamembránhoz közel koncentrálódott (átlagos távolság  $57 \pm 3$  nm,  $n=182$  aranyzemcse), és ritkán volt megtalálható a tüske "magjában"; a beágyazás utáni immunarany anyag hasonló eloszlási mintázatot mutatott ( $39 \pm 2$  nm;  $n=171$  aranyzemcse). Feltételezzük, hogy az átlagos távolság  $\sim 18$  nm-es különbsége módszertani különbségeket tükröz: a posztembedding az antigén pozíciójának közel torzítatlan becslését biztosítja, míg az ezüst intenzifikációt a lipidmembránok korlátozzák, és ezért hajlamos túlbecsülni a plazmamembrántól való távolságot. Mindkét immunarany módszer azonban ugyanarra az alapvető következtetésre vezetett, hogy a cofilin a plazmamembrán közelében koncentrálódik, elkerülve a tüske központi részét (magját).

A további elemzést a kevésbé érzékeny, de torzításmentesebb posztembedding módszer adataira korlátoztuk. Az aranyzemcsék száma meredeken csökkent  $\sim 60$  nm-re a membrántól (fekete körök, **17. a. ábra**). Azonban csökkenés volt tapasztalható még azokban a kontroll anyagokban is, amelyekben az elsődleges antitestet normál szérummal helyettesítettük (fehér körök, **17. a. ábra**), és gyakorlatilag nem volt megfigyelhető jelölés sem a kísérleti, sem a kontroll anyagokban a membrántól 150 nm-nél távolabb. Mivel a legtöbb általunk vizsgált tüskeprofil területe  $0,02$ - $0,2 \mu\text{m}^2$  közötti tartományban volt, a jelölés látszólagos csökkenésének legalább egy része egyszerűen abból adódik, hogy kevés tüskének volt  $>150$  nm-es sugara; így (például)

az **17. a. ábra** bal felén látható adatokat sokkal több tuskéból gyűjtöttük, mint a grafikon jobb felén látható adatokat.

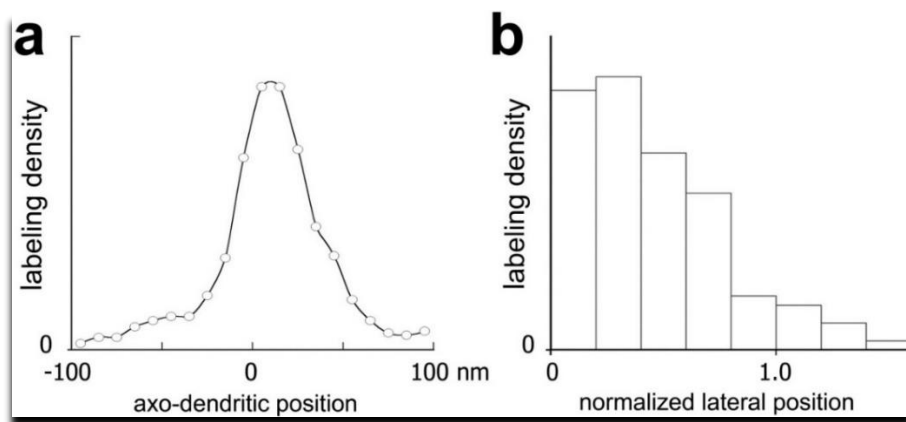


**17. ábra. Az immunarany jelölés kvantitatív elemzése. (a)** Az aranyrészecskék távolsága a plazmamembrántól a túske citoplazmájában. A cofilint kódoló részecskék (fekete körök, n=171 arany szemcse 70 tuskéből) közelebb koncentrálnak a membránhoz, mint a kontroll részecskék (fehér körök, n=32 túske). **(b)** Az antigéneloszlás értelmezhetőbb képének biztosítása érdekében a tuskék arany szemcséinek radiális eloszlását normalizáltuk (0 megfelel a membránon fekvő részecskének, 1 pedig a túskefej geometriai közepén fekvő részecskének), és súlyoztuk (hogyan kompenzáljuk a középponthez közel fekvő részecskék területének csökkenését), így becslést kaptunk az arany szemcsesűrűségekre. A cofilin szignifikánsan a membránhoz közelebb koncentrálnak, összehasonlítva a kontroll részecskék viszonylag egyenletes eloszlásával ( $P < 0,001$ , két oldalú Mann-Whitney U-teszt). Az adatokat mindkét grafikonon hárompontos futó súlyozott átlaggal simítottuk.

Ennek korrigálására kiszámítottunk egy "normalizált" pozíciót minden egyes arany szemcse esetében, úgy, hogy a 0 érték a plazmamembránon lévő részecskének, az 1,0 pedig a túske közepén lévő részecskének felel meg, függetlenül a túske méretétől. Továbbá a túske középpontjához közeli távolságtartományok sokkal kevesebb citoplazmatikus területet tartalmaznak, mint a plazmamembránhoz közeli tartományok. Így a plazmamembránhoz közeli részecskék száma még egyenletes eloszlású véletlen pontok esetén is magasabb lesz, mint a túske középpontjában. A túske középpontjához közeli bin-ek területének e csökkenését ellensúlyozandó, kiszámítottuk a normalizált jelölési sűrűséget, elosztva az egyes bin-ekben lévő szemcsék számát a bin-ek normalizált sugarával. E korrekciók után a cofilint kódoló részecskék továbbra is a plazmamembrántól  $< 0,2$  normalizált egységre lévő „héj” területén koncentrálnak (**17. b ábra**), szignifikánsan közelebb a membránhoz, mint a kontroll anyagból származó arany részecskék ( $P < 0,001$ ).

Annak érdekében, hogy jobban megértsük a cofilin szerveződését a PSD közelében, megvizsgáltuk a szinaptikus specializáció laterális határain belül elhelyezkedő arany szemcsék axodendritikus eloszlását (n=225 arany szemcse). Ezek az adatok azt mutatták, hogy a cofilin a

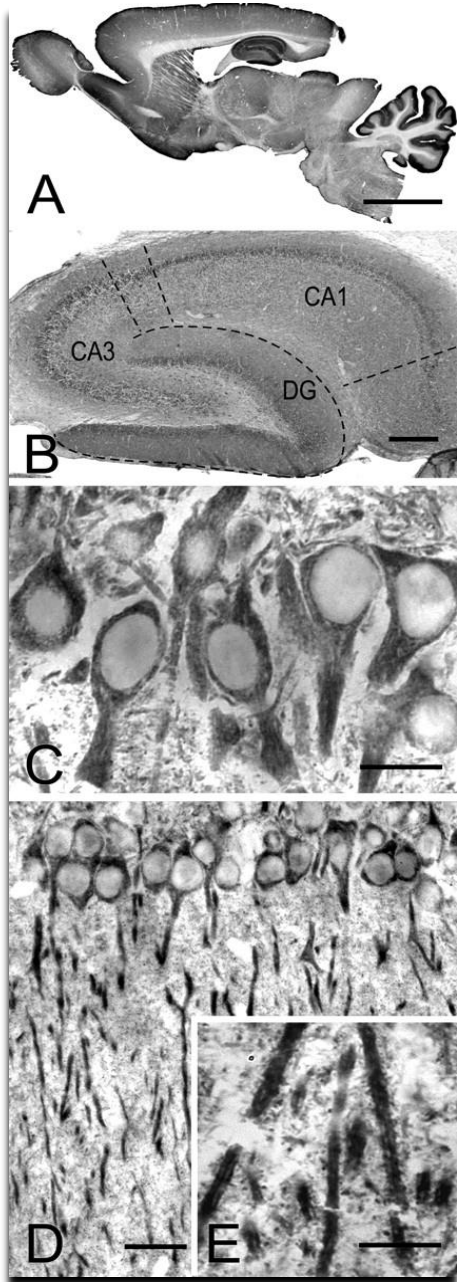
PSD-n belül koncentrálódik, a plazmamembrántól átlagosan  $10 \pm 2$  nm-es citoplazma felé eső távolságban helyezkedik el (**18. a. ábra**). Elszórtan aranyrészecskéket láttunk a preszinaptikus axonterminálison belül is - bár nem zárhatjuk ki, hogy ez a ritka jelölés csak technikai melléktermék. Annak megállapítására, hogy a cofilin egyenletesen oszlik-e el tangenciálisan PSD mentén, vagy specifikus alrégiókban koncentrálódik, elemeztük a posztszinaptikus plazmamembránhoz közel fekvő aranyrészecskék normalizált laterális helyzetét. A **18. b. ábra** dokumentálja, hogy a cofilin a szinapszis központi felében koncentrálódik, és laterálisan csökken a PSD szélei közelében, ez az eloszlás hasonló az NMDA-receptorok esetében leírtakhoz (Kharazia and Weinberg, 1997, Racca et al., 2000).



**18. ábra. A cofilin-eloszlása a PSD-ban. a.** A cofilin axodendritikus helyzete a posztszinaptikus membránhoz viszonyítva. Csak a szinaptikus specializáció laterális szélein  $\leq 25$  nm-en túli régióban fekvő részecskéket vettük itt figyelembe ( $n=225$  arany szemcse 107 tüskéből). Az immunarany részecskék a PSD-n belül koncentrálódnak. A jelölési sűrűség normalizált egységekben van megadva; a 0 sűrűség megfelel az abszcisszának. **b.** A részecskék tangenciális eloszlása a szinapszis mentén. A cofilin a PSD középpontjában koncentrálódik (0), a széléhez közel gyorsan csökken (1,0).

## Cortactin szerveződése a hippocampális piramisisejtekben

Cortactin immunfestés a szürkeállományban mindenütt megfigyelhető volt az agyban, a fehérállomány jellemzően festetlen maradt. Az immunreakció különösen prominens volt azokon az agyterületeken, ahol dendrittüskékkel rendelkező sejtek nagyszámban előfordulnak (pl.: kisagykéreg, bulbus olfactorius, striatum, neocortex és hippocampusz – **19. A. ábra**). A hippocampuszon belül az immunfestés intenzív volt az Ammon szarv neuropiljében és a gyrus dentatus molekuláris rétegében (**19. B. ábra**).

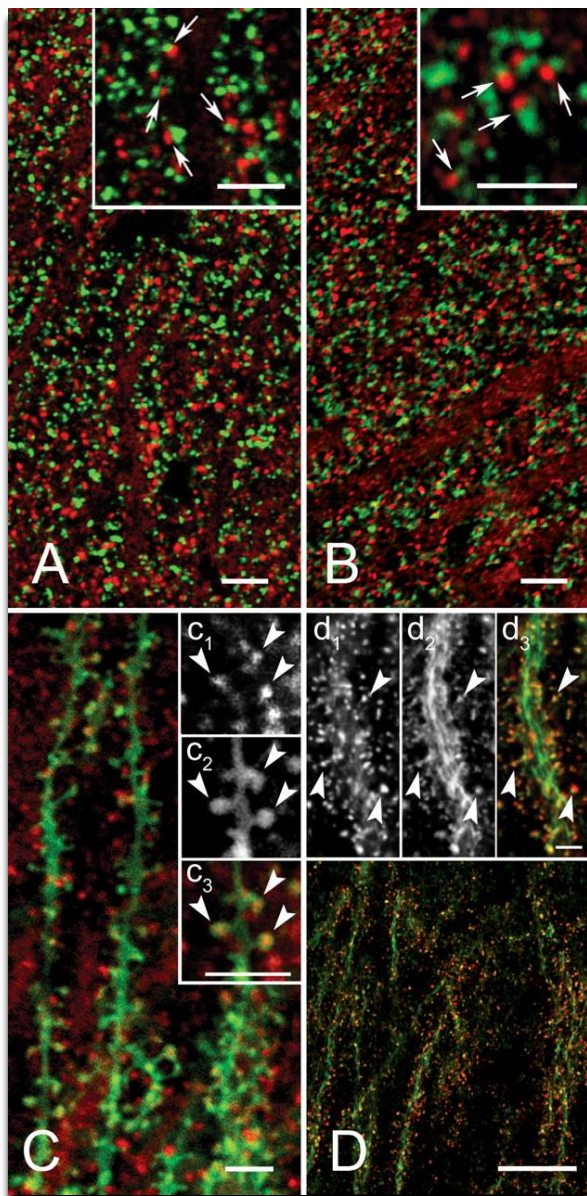


**19. ábra. Cortactin immunoperoxidáz festés. A.** Kisnagyítású felvétel a patkány parasagittális agymetszetéről. **B.** A hippocampuszt bemutató mikroszkópos felvétel. A festődés szembeűnő a gyrus dentatus (DG) molekuláris rétegében és a CA1 neuropiljében (a szaggatott vonalak a hippocampális formáció fő régióinak határait jelölik). **C,D.** A hippocampusz CA1-régiója, a piramisisejtek festett sejttestjeit és apikális dendritjeit mutatja. A C-ben látható részlet foltos festődést mutat a szomatodendritikus kompartmentben, immunnegatív magokat körülvéve. **E.** A stratum radiatum nagy nagyítású nézete intenzíven megjelölt dendriteket mutat; a neuropilben lévő pontszerű képletek dendrit-tüskéknek felelhetnek meg. Méretségvok: A, 5 mm; B, 500  $\mu\text{m}$ ; C, E, 25  $\mu\text{m}$ ; D, 50  $\mu\text{m}$ .

További kutatásainkat elsősorban a hippokampusz CA1-es régiójának tüskés piramis-sejtjeire fókuszáltuk; az immunfestés jelen volt a sejttestekben, dendritekben – azonban nem jelölődtek a sejtmagok. Az immuncsapadék apró, szemcsés-foltos megjelenést mutatott a sejttestekben (**19. C. ábra**). Nyilvánvaló gliális festődést nem tapasztaltunk. A proximális dendritek jelentős mennyiségű immuncsapadékot tartalmaztak, amelyek gyakran fonalas struktúrákhoz asszociálódtak (**19. C.-D. ábra**). Nagy-nagyítású képeken megfigyelhetővé váltak a stratum radiatumban pontszerűen jelölődött struktúrák is, (**19. E. ábra**), amely arra utal, hogy a cortactin jelen lehet szinapszisokban is.

A cortactin neuropilbeni szerveződését feltárandó, további nagyfelbontású, konfokális lézer-scanning mikroszkópos vizsgálatokat végeztünk cortactin ill. preszinaptikus markerek kombinációjával, kettősjelölt agymetszeteken. A cortactin jelölődése a stratum radiatumban szinte mindig pontszerű volt. Ezek a cortactin pontok gyakran voltak synaptophysin-immunjelölt pontok közvetlen közelében. A cortactin pontok gyakran tartalmaztak apró, sávszerű átfedéseket ezekkel a synaptophysin pontokkal (**20. A. ábra**, nyilak), de csak ritkán volt jelentős, vagy teljes átfedés közöttük, amely arra enged következtetni, hogy a cortactin postszinaptikusan helyezkedik el. Hasonló mintázatot kaptunk abban az esetben, ha a glutamáterg terminálisok specifikus markerével, a vezikuláris glutamát-transzporter-1-es típusával (VGLUT1) kombináltuk az immunfestést (Fremeau et al., 2001) (**20. B. ábra**).

Ezek az eredmények mindenképpen abba az irányba mutatnak, hogy a cortactin egyértelműen posztzinaptikusan fordul elő, mégpedig dendrittüskékben. Hogy erről fénymikroszkópos szinten is megbizonyosodhassunk egy ún. lipofil festéket, DiO-t használtunk, hogy a piramissejtek apikális dendritjeinek membránját megjelöljük. Ez a kísérlet végül egyértelműen megerősítette, hogy a cortactin valóban dendrittüskékben koncentrálódik a felnőtt agyban. (**20. C. ábra**, nyilak). Mivel a cortactin rendelkezik egy f-aktin-kötő doménnel, kíváncsiak voltunk, hogy kolokalizál-e az aktinnal különböző szubcelluláris kompartmentekben? Ezért fluoreszcens phalloidinnel jelöltük meg a dendritekben található aktin-filamentumokat, és masszív kolokalizációt találtunk, különösen a dendrittüskékben (**20. D. ábra**) Ezek a fénymikroszkópos adatok azt mutatják, hogy a cortactin nagy mennyiségben fejeződik ki posztzinaptikusan tüskés neuronokban és jellemzően aktinnal közösen dendrittüskékben koncentrálódik.

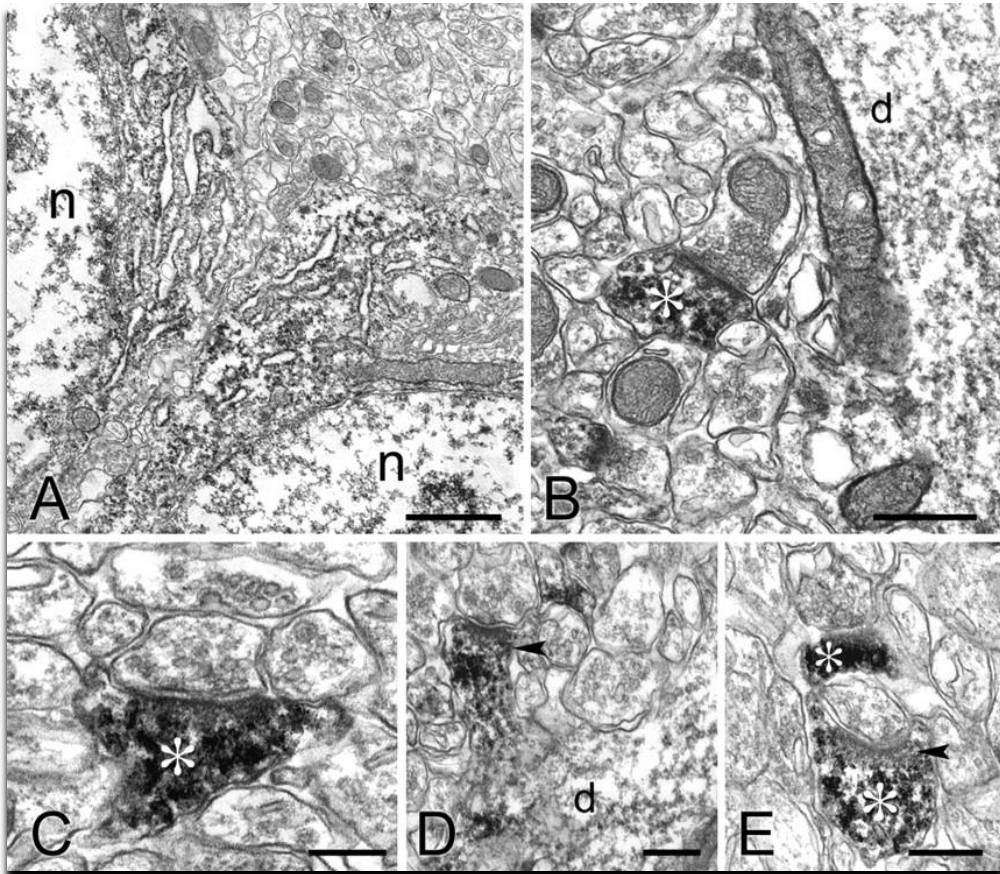


20. A cortactin szubcelluláris eloszlása a CA1 radiatum rétegében. **A.** A konfokális mikroszkópia a **cortactint** (piros) és a preszinaptikus markert, a **synaptophysint** (zöld) mutatja. A két markerre immunopozitív pontok (nyilak a betétben) egymáshoz való kapcsolódása arra utal, hogy a cortactin posztzinaptikus lehet. **B.** Kettős immunfluoreszcencia a cortactinnal (piros) és a VGLUT1-gyel (zöld). A pontszerű appozíció mintázata arra utal, hogy a cortactin glutamaterg szinapszisokhoz kapcsolódik. **C.** Cortactin immunfestést végeztünk a **lipofil DiO** festékkel (zöld) kezelt anyagon, amely a szétszórt piramis sejtek plazmamembránját festi meg. Inzert, Cortactin ponttác (c<sub>1</sub>) láthatók a DiO-val festett (c<sub>2</sub>) tüskéken belül (összeolvadás; c<sub>3</sub>, nyílhegyek). **D.** Kettős fluoreszcencia **cortactinnal** (piros) és **falloidinnal** (zöld). Az eredmények arra utalnak, hogy a cortactin aktinban is gazdag profilokat lokalizál. Kiemelt terület: Nyílhegyek, amelyek mind a cortactin-pozitív (d<sub>1</sub>), mind a falloidin-pozitív (d<sub>2</sub>) tüskékre mutatnak. Méretség: A-C, 5µm; D, 20µm; betétek, 5µm.

### *Elektronmikroszkópia*

A cortactin szubcelluláris organizációjának még precízebb megértéséhez immunjelöléssel kombinált elektronmikroszkópos vizsgálatokat végeztünk. A CA1 piramis sejtek perikaryonjában az immunperoxidáz csapadék elsősorban durvafelszíni endoplazmatikus retikulum közelében volt észlelhető. (21. A. ábra). A legtöbb dendritörzs tartalmazott immuncsapadékot, de a jelölődés a tüskékben sokkal nagyobb denzitást mutatott. (21. B.-C. ábra, csillagok). Az immuncsapadék gyakran kitöltötte a tüskéket, azonban néhány esetben a PSD-ből és annak közvetlen környezetéből hiányzott (21. D.-E. ábra). Nem találtunk immuncsapadékot axonokban és axonterminálisokban, amely alátámasztja fénymikroszkópos megfigyeléseinket, miszerint a cortactin alapvetően posztzinaptikusan – elsősorban tüskeszinapszisokban - fordul

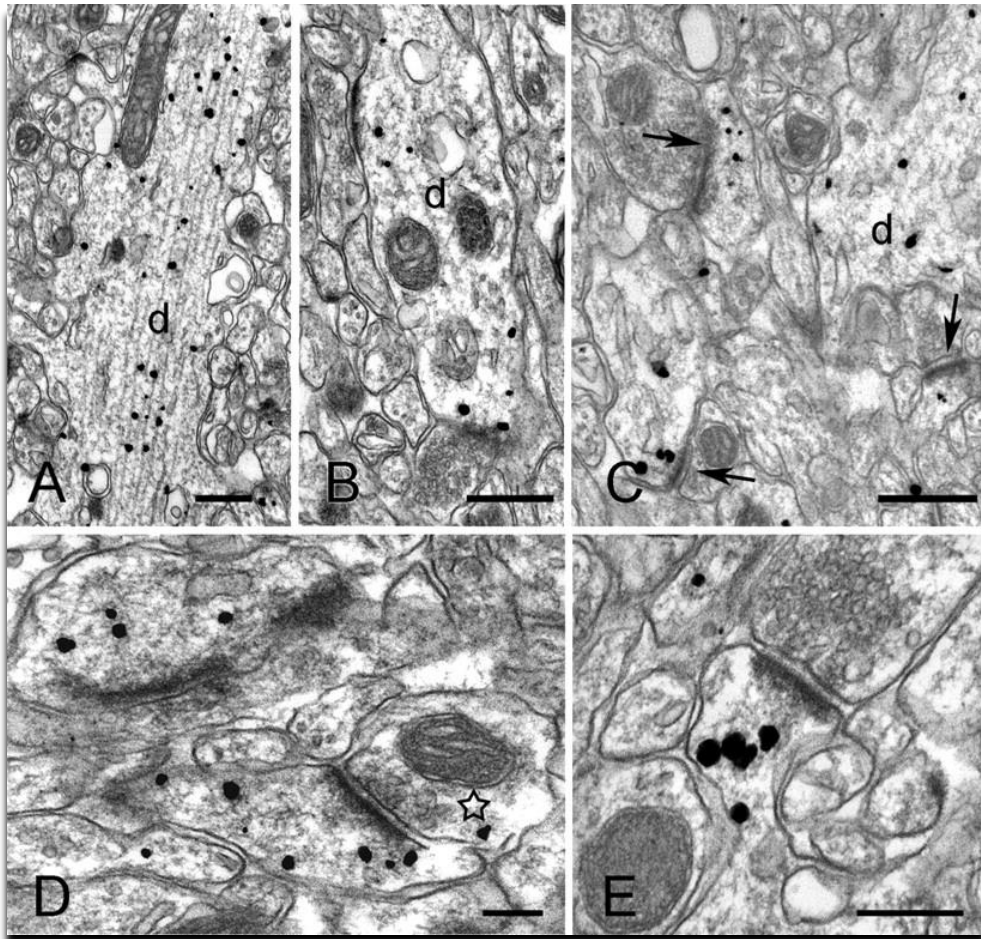
elő. Valószínűsíthető tehát, hogy a cortactin a szinapsztól távol helyezkedik el. Azonban az immunperoxidáz technika nem teszi lehetővé ennek a kérdésnek a kritikus vizsgálatát, mivel az immuncsapadék elmozdulhat az enzimatis működés helyéről, kitöltheti akár a jelölt teljes profilt, ami lehetetlenné teszi az antigén pontos lokalizációját. Hogy ezt a problémát megoldjuk, preembedding immunarany jelölést ezüst-intenzifikálással kombináltunk, a cortactin precízebb, kvantifikálható eloszlásának felfedése érdekében.



21. ábra. Elektronmikroszkópos felvételek, amelyek a CA1-ben lévő cortactin immunoperoxidázzal történő jelölését mutatják. A. A reakciótermék két piramisisejt sejttestében látható, az endoplazmatikus retikulumhoz asszociálva, de a Golgi komplexet elkerülve. n, nucleus - sejtmag. B-E. A reakciótermék felhalmozódik a tüskékben (csillagok) és a dendritekben (d), de a preszinaptikus terminálisokban nem. A D és E nyílhegyek az immunfestett tüskék azon régiójára mutatnak, közvetlenül a PSD alatt, ahol nincs immunfestés. Méretsávok: A, 1 $\mu$ m; B, 0,5  $\mu$ m; C-E, 0,25 $\mu$ m.

Az így feldolgozott metszetek CA1 régió stratum radiatumának nagy dendritjeiben számos cortactin-t kódoló arany/ezüst szemcse volt megfigyelhető (22. A. ábra). A legtöbb szemcse ezekben a dendritekben mikrotubulusokkal asszociálódott, feltételezhetően a szinapszisok és a sejttest közötti transzport-poolt képviselve. Nem minden szemcse

kapcsolódott láthatóan a mikrotubulusokhoz: feltételezhetően az ilyen szemcsék a dendritekben található aktin-filamentumokhoz kapcsolódó cortactin molekulákat jelölték – amelyek már fénymikroszkópos szinten is láthatóak voltak a phalloidin/cortactin kettősjelölt anyagon (20. D. ábra). Számos esetben láttunk (feltehetően gátló interneuronokhoz tartozó) dendrittörzseken aszimmetrikus szinapszisokat, melyek közelében is koncentráálódtak cortactint kódoló szemcsék (22. B. ábra).



22. ábra. Beágyazás előtti cortactin immunarany jelölés a CA1 radiatum rétegében. A.-B. Az elektronmikroszkópos felvételeken immunpozitív dendritek láthatók (d). Az A-ban látható apikális dendritben ezüst-intenzifikált arany szemcsék többsége mikrotubulusokhoz kapcsolódik. Egy -feltételezhetően- interneuron dendritjében (B) az arany részecskék az aszimmetrikus szinaptikus appozíciók közelében koncentráálódnak. C. A szinaptikus neuropil kisnagyítású nézete. A nyilak három immunjelzett tuskére mutatnak; d egy immunpozitív dendrit tengelyt jelöl. D.-E. nagy nagyítású felvételek, amelyeken immunpozitív tuskék láthatók. Az arany szemcsék mélyen benyúlnak a túske magjába (a csillag D-ben az arany részecskével rendelkező axonvégződést jelzi). Méretség: A-C, 0,5  $\mu\text{m}$ ; D, E, 0,2  $\mu\text{m}$ .



Az immunfluoreszcens és elektronmikroszkópos immunperoxidáz kísérletek már jelezték, hogy axonok- ill. axonterminálisok nem tartalmaznak cortactint; ugyanakkor immunarany-jelölést alkalmazva néhány szemcse előfordult axonterminálisokban is (22. D. ábra, csillag).

Annak érdekében, hogy megállapítható legyen ezen jelölődés specifikus vagy nem-specifikus volta, kvantitatív módszerekkel megvizsgáltuk az immunarany jelölődés denzitását az egyes szubcelluláris kompartmentekben. A nonspecifikus jelölés küszöbértéke a piramis-sejtek sejtmagjai segítségével került megállapításra, mivel ezek immunfluoreszcens jelölések esetében mindig konzisztensen immunonegatívak

Denzitás (szemcse/ $\mu\text{m}^2$ )	
sejtmag	0,66±0,05 (n=11)
axon-terminális	1,13±0,45 (n=30)
dendrit-törzs	5,25±0,50 (n=14) *
dendrit-tüske	9,92±1,25 (n=44) *

*I. táblázat.* Véletlenszerűen kiválasztott profilokat, amelyek axonvégződésenként, dendritörzsként vagy tüskékként azonosíthatók, vontuk be az elemzésbe, függetlenül attól, hogy immunopozitívak voltak-e. Az összes adatot a CA1 stratum radiatumtól gyűjtöttük, a Bregmától caudalisan ~4,0mm-rel. A háttér megbecsüléséhez a piramis rétegből származó sejtmag profilokat is megvizsgáltuk. Csak a dendritörzsek és tüskék mutattak szignifikáns különbséget a sejtmagban detektált háttérhez képest. \* P <0,001; t-teszt (átlag±SE; n=profilok száma).

maradtak. Az axonterminálisokban talált szemcse-denzitás nem volt szignifikánsan eltérő a sejtmagokban talált nem-specifikus jelöléstől (P>0,3; I. táblázat). Ezzel szemben a dendritörzsek és dendrittüskék szignifikánsan magasabb koncentrációban tartalmazták a cortactint kódoló szemcséket (P<0,001). A jelölés mértéke és specifikussága különösen feltűnő volt a dendrittüskékben. A szemcsék általában nem fordultak elő a PSD közvetlen közelében (22. C. ábra, nyilak). A tüskékben az aranyszemcsék gyakran az itt előforduló elektrondenz filamentum-szerű anyaghoz kapcsolódott, amely arra utal, hogy a cortactin és az itt található citoszkeleton szoros kapcsolatban van (22. D-E. ábra). Számos esetben figyeltünk meg szemcsével jelölt burkos vezikulákat dendritörzsekben és tüskékben, jóllehet ezek a struktúrák meglehetősen ritkán fordultak elő.

*In vitro* hippokampális sejttenyészetekben megfigyelték, hogy a cortactin hatást gyakorol a tüskék méretére – nevezetesen nagyobb tüskékben több cortactin fordul elő. Kíváncsiak voltunk tehát arra, hogy *in vivo* agyban is megfigyelhető-e ilyen korreláció. 236 véletlenszerűen kiválasztott jelölt tüskeprofil megvizsgálva csak gyenge negatív korrelációt találtunk a profilméret és a jelölés denzitása között (r=-0,11). Fontos megjegyezni, hogy a kisméretű profilokból történő mintavétel velejárója a véletlen sztochasztikus zaj, amely feltehetően hozzájárul a korreláció alulbecsléséhez. Hogy csökkentsük a zaj hatását megvizsgáltuk a korrelációt azután is, hogy az adatokat 5, 10, ill. 20 binés egységekbe csoportosítottuk. Ekkor is

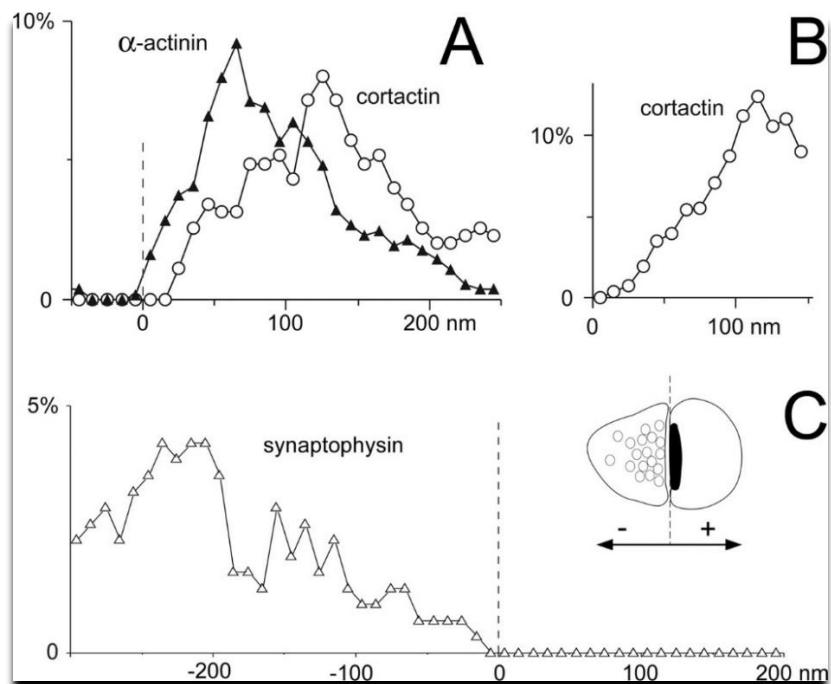
csak -0.43 és -0.50 közötti  $r$  értékeket kaptunk. A sejt kultúrákon végzett vizsgálatok azt sugallhatják, hogy a cortactin a tüskeszinapszisok fejlődéséhez szükséges, ezért feltételeztük, hogy a posztnatális fejlődés során találunk korrelációt a tüskék mérete és a cortactin mennyisége között. Ennek megfelelően fiatal, 14 (n=106 tüskeprofil) ill. 21 napos (n=102 tüskeprofil) patkányok hippokampuszából származó immunjelölt mintákat is megvizsgáltunk, és a felnőtt állatoknál már megfigyelt gyenge negatív korrelációt találtuk ( $r=-0,18$  ill.  $r=-0,04$ ).

### *A cortactin eloszlása a tüskeplazmában*

A cortactin elhelyezkedését a tüskeplazmában az arany szemcsék helyzetének kvantitatív vizsgálatával végeztük. Először is az egyes szemcsék távolságát a posztszinaptikus membrán külső, szinapszis felé eső felszínétől, axodendritikus tengely mentén felvettük, ahogyan azt korábban már leírtuk (Valtschanoff and Weinberg, 2001). Ahogyan azt a DAB-jelölés során már megfigyeltük, (**21. D.-E. ábra**), a cortactint kódoló arany szemcsék a PSD-től távol helyezkedtek el a tüske citoplazmatikus központjában, a posztszinaptikus membrántól mintegy 100-150 nm átlagos távolságban (**23. A ábra**, o). Ezt az eredményt azonban óvatosan kell kezelni, mivel a preembedding aranyjelölés nem tudja teljes biztonsággal a PSD fehérjemátrixában elhelyezkedő antigéneket detektálni, ahogyan azt már a cofilin esetében is említettük (Lorincz et al., 2002). Annál is inkább, mivel egyes biokémiai tanulmányok találtak cortactint a PSD-ban (Peng et al., 2004, Husi and Grant, 2001), míg mások nem (Walikonis et al., 2000, Yoshimura et al., 2004).

Hogy megbizonyosodjunk arról, hogy nem technikai okok vezettek a cortactin detektálásának hiányához a PSD-ban, ugyanezzel a preembedding technikával  $\alpha$ -actinin-t jelöltünk, amelyről már korábbi posztembedding jelölések egyértelműen kimutatták, hogy a PSD-ban elhelyezkedő aktin kötő fehérje (Wyszynski et al., 1998). Azt találtuk, hogy az  $\alpha$ -actinin-t kódoló arany szemcsék 50-70nm távolságban találhatóak a posztszinaptikus membrántól, szignifikánsan közelebb a szinapszishoz, mint a cortactin ( $p<0,001$ ; **23. A ábra**,  $\blacktriangle$ ). Az adatokat tovább vizsgálva azt találtuk, hogy az  $\alpha$ -actinin-t kódoló szemcsék 9%-a (17 a 188-ból) a posztszinaptikus membrántól  $\leq 30$  nm-e helyezkedett el (egyértelműen a PSD mátrixában), ugyanakkor egyik cortactin-t kódoló szemcse sem volt megtalálható ebben a régióban (0 a 122-ből). Ezért tehát valószínűtlen, hogy módszertani vagy technikai limitációk vezettek ahhoz, hogy nem detektáltunk cortactint a PSD-ban. Ugyanakkor az arany szemcsék  $\sim 10\%$ -a  $< 60$  nm-es

távolságon belül volt észlelhető, amely elegendően közel van a szinaptikus membránhoz ahhoz, hogy a PSD-ban található fehérjékhez kötődjön, különösen az olyan fehérjékhez, mint a Shank, amely a mélyebb PSD rétegekben található (Valtschanoff and Weinberg, 2001). További kontrollként egy preszinaptikus marker, a synaptophysin eloszlását is megvizsgáltuk a kérdéses szinapszisokban (23. C. ábra,  $\Delta$ ), és megállapítottuk, hogy az kizárólag preszinaptikusan fordul elő, főleg >100 nm található a szinaptikus membrántól. Tehát adataink azt mutatják, hogy a jelentősebb mennyiségű cortactin található a tüskék központi részében, de egy kisebb mennyiség a PSD belső „rojtzatához” is kapcsolódik.

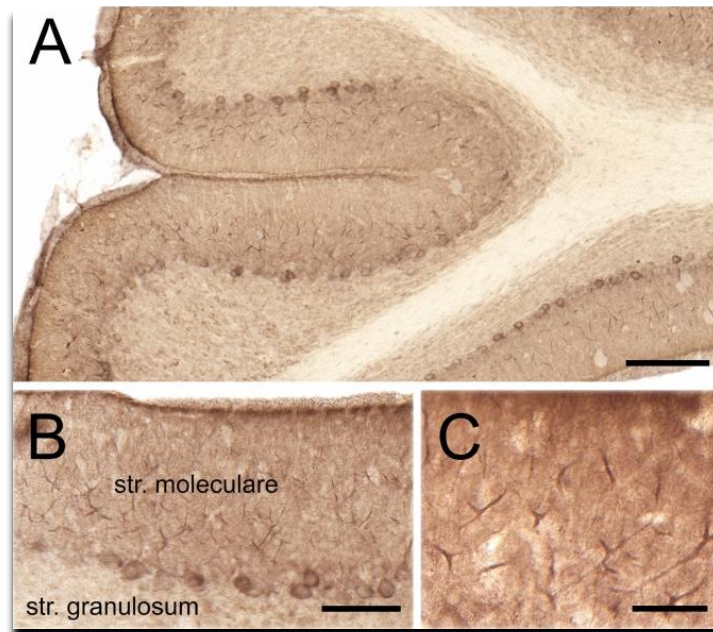


**23. ábra. A cortactin,  $\alpha$ -aktinin és synaptophysin axodendritikus eloszlása szinaptikus profilokban. A,** Az ábra a cortactint ( $\circ$ ) és az  $\alpha$ -aktinint ( $\blacktriangle$ ) kódoló aranyrészecskék axodendritikus eloszlását mutatja a tüske citoplazmájában. Az x-tengely értékei az aranyarany szemcse középpontjától a szinaptikus membránig terjedő távolságot jelölik az axodendritikus tengely mentén (a negatív értékek a szinaptikus részen vagy a preszinaptikus terminálisban lévő aranyrészecskéket jelölik; lásd a C inzertet). Az y-tengely értékei az egyes binokban megszámlált részecskék teljes számának százalékos arányát jelentik. A cortactin szignifikánsan távolabb fekszik a PSD-től, mint az  $\alpha$ -aktinin. **B,** A cortactint kódoló szemcsék távolsága a tüske plazmamembránjától; a cortactin a tüske magjában koncentrálódik. Csak a tüskén belül elhelyezkedő részecskéket vettük figyelembe; a grafikon 150 nm-ig mutatja az adatokat, hogy a kis tüskékből származó adatokat is be lehessen vonni. A jelölési sűrűséget úgy súlyoztuk, hogy a citoplazmában mélyen fekvő részecskék esetében kompenzáljuk a terület csökkenését. **C,** A grafikon azt mutatja, hogy a synaptophysint ( $\Delta$ ) kódoló aranyrészecskék a preszinaptikus terminálisra korlátozódnak. A szaggatott vonal a poszt-szinaptikus membránt jelöli, amely A-ban és C-ben 0-nak felel meg (a magyarázatot lásd az inzertben). A CA1 stratum radiatum-ban lévő, egyértelmű szinapszist mutató és legalább egy aranyrészecskét tartalmazó tüskékről és terminálisokról véletlenszerű felvételeket készítettünk. Az adatok 65 profilból származnak az  $\alpha$ -aktinin, 55 a cortactin és 55 a synaptophysin esetében. A bin szélessége 10 nm volt az A és B esetében és 20 nm a C esetében. Az adatokat hárompontos súlyozott futó átlaggal simítottuk.

A fenti módon vizsgált adatokból viszont még nem következik, hogy a cortactin ugyan a PSD-től távol, de a dendrittüske membránjához közel fordul elő. Hogy megbizonyosodjunk erről, lemértük a cortactin-t kódoló szemcsék távolságát a nem szinaptikus membránhoz is (**23. B. ábra**), és azt találtuk, hogy a membrán 30nm-es sávjában egyáltalán nem található cortactin, ugyanakkor 100-150nm távolságban magas koncentrációban van jelen, amely megerősíti azt a tényt, hogy elsősorban a tüskeplazma geometriai középpontjában koncentrálódik a fehérje.

### Cortactin a kisagyi Purkinje sejtekben

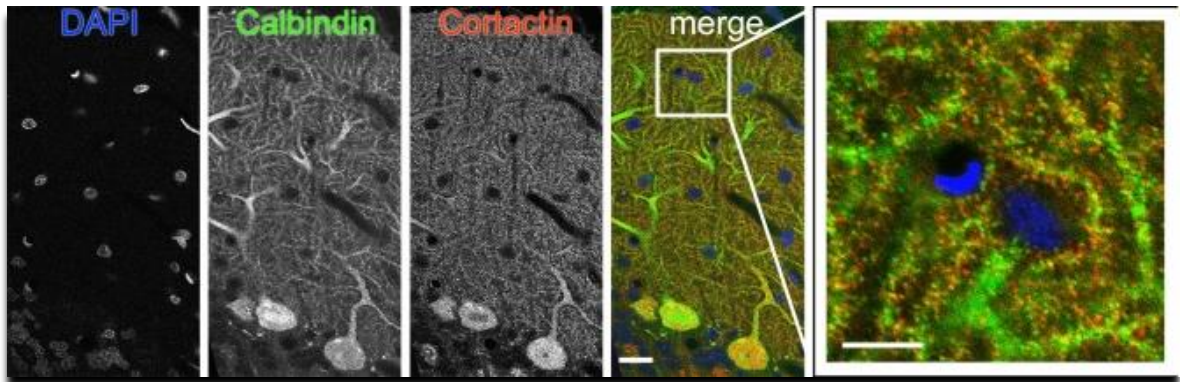
A cortactin immunfestés kiterjedt és jól látható volt a kisagykéreg szürkeállományában, a fehérállományt nem érintette. A kisagykéregben a festődés intenzív volt a str. moleculare (külső réteg) területén, ahol a PC-k dendritjei arborizálnak (**24. A-C. ábra**).



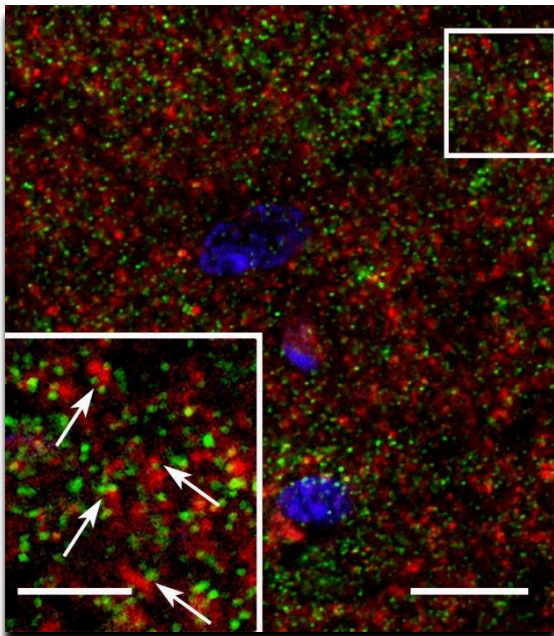
**24. ábra.** A cortactin immunoperoxidáz festése a kisagyban. (A) Kisagykéreg kis nagyítású nézete. (B) A kéreg három rétege látható: belső réteg: str. granulosum, középen Purkinje-sejtes réteg, külső réteg: str. moleculare. Purkinje-sejttestek láthatók a str. granulosum és a str. moleculare határán. (C) A festődés szembetűnő a PC-k dendritikus arborizációján belül a str. moleculare-ban. Méretségvonalak: (A): 200  $\mu$ m, (B): 100  $\mu$ m, (C): 50  $\mu$ m.

Annak ellenőrzésére, hogy a Purkinje-neuronok valóban expresszálnak cortactint, nagy felbontású lézerpasztázó konfokális mikroszkópiát végeztünk a PC-specifikus calbindin markerrel jelölt kisagyi metszeteken (**25. ábra**). Megerősítettük, hogy a PC-k valóban kifejezik a

cortactint a dendritjeikben, és a dendrittörzsekhez ill. elágazásaikhoz szorosan kapcsolódó pontszerű képletekben, ami arra utal, hogy a tüskék cortactinban gazdagodnak.



25. ábra. A cortactin kolokalizálódik calbindinnel a Purkinje sejtekben. A konfokális mikroszkópia a sejtmagokat (DAPI, kék), a PC-specifikus kalcium-kötő fehérjét, a calbindint (Alexa-488, zöld) és a cortactint (Cy3, piros) mutatja. A két marker szinte teljesen kolokalizálódik a kisagy molekuláris rétegében. Az inzert a fehér téglalap által körülvett régió nagyított képe. Méretség: 20  $\mu\text{m}$ ; 10  $\mu\text{m}$  a betét esetében.

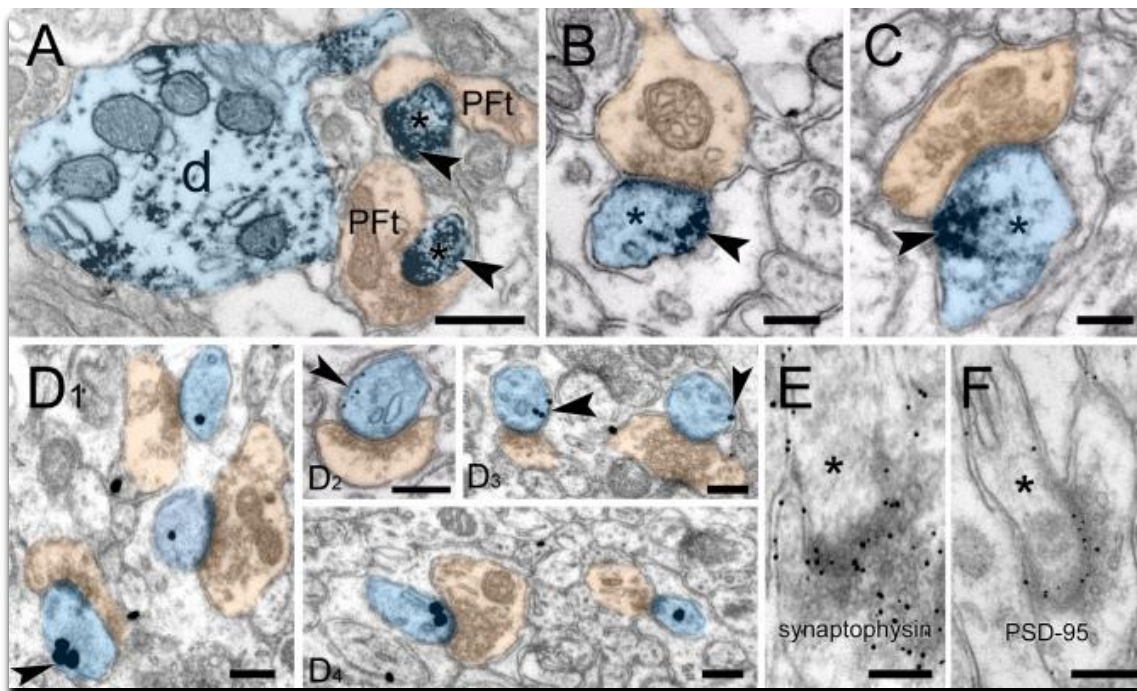


26. ábra. A cortactin szubcelluláris eloszlása a kisagykéreg külső molekuláris rétegében. A konfokális mikroszkópia a cortactint (Cy3, piros) és a preszinaptikus markert, a synaptophysint (Alexa-488, zöld) mutatja; a sejtmagok (DAPI) kékkel vannak jelölve. A cortactinra és a synaptophysinre immunpozitív pontok (nyilak a betétben) egymáshoz való viszonya arra utal, hogy a cortactin nagy valószínűséggel a posztzinaptikus struktúrákban lokalizálódik. A betét a fehér téglalap által körülvett régió nagyított képe. Méretség: 10  $\mu\text{m}$  (5  $\mu\text{m}$  a nagyított területen).

Annak megállapítására, hogy a cortactin elsősorban a posztzinaptikus dendrittüskékhez lokalizálódik-e, további konfokális mikroszkópiát végeztünk a kisagy metszeteiken, amelyeket cortactinnal és a preszinaptikus marker, a synaptophysinnel jelöltünk kettősen. A cortactin pontszerű festődést mutatott a str. moleculare-ban és ezek a pontok gyakran társultak synaptophysin pontokkal (26. ábra). Ritkán volt átfedés a cortactinra festett pontok és a synaptophysinra festett pontok között, ami arra utal, hogy a cortactin a kisagy PC-kben

posztzinaptikusan koncentráldik. Összességében fénymikroszkópos adataink azt mutatják, hogy a cortactin magas szinten expresszálódik a kisagykéreg str. molecularéjában, ahol valószínűleg a dendrittüskékben koncentráldik.

A cortactin szubcelluláris kompartmentalizációjába való betekintés érdekében immunjelöléssel kombinált elektronmikroszkópiát alkalmaztunk. Először immunperoxidáz jelölést végeztünk, hogy lássuk, vajon a PC tüskék jelölődnek-e. Bár néhány axonvégződés, és gliás végtalp is immunpozitív volt, a reakciótermék nagy része a tüskékben volt megtalálható, ahol foltokba szerveződött (27. A-C. ábra, nyilak). A reakciótermék gyakran a PC-tüskék szubmembrán területeire korlátozódott, és általában gyenge volt, vagy hiányzott a tüskeplazma központi részéből. A reakciótermék ritkán volt kimutatható az axonvégzésekben. Így immunperoxidázos jelölésünk megerősítette, hogy a cortactin jellemzően a posztzinaptikus PC tüskékben koncentráldik.



27. ábra. A cortactin immun-elektronmikroszkópos vizsgálata a disztális PC-ágak tüskéiben. (A-C) Robusztus jelölés (DAB-reakció, sötét csapadék) Purkinje-sejtek (kék) dendritjeiben (d), és tüskéiben (\*) (a parallel rostok axonvégzódései (PFT) narancssárga színben lettek kiemelve). A nyílhegyek az immunperoxidáz reakciótermék felhalmozódott, jól körülírható területeire mutatnak a szubmembrán régiókban. (D<sub>1-4</sub>) A cortactint kódoló immunarany jelölés. PC-k dendrittüskéi (kék szín); a tüskék perifériáján szinaptikus membránokhoz, nem szinaptikus membránokhoz és szubmembrán tüskeplazmához kapcsolódó cortactint kódoló immunarany szemcsék láthatók (nyílhegyek). (E, F) A synaptophysint (E) kódoló immunarany szemcsék a preszinaptikus terminálisokat jelölve láthatók. Ezzel szemben a PSD-95 (F) jelölés a PC tüskék posztzinaptikus denzitásaira korlátozódik. Méretség: (A): 500 nm, (B-F): 250 nm.

A peroxidáz jelölés nem teszi lehetővé a pontos lokalizációt, mivel a reakciótermék elvándorolhat az enzimátikus helyről, gyakran kitölti az adott profilt, ami megnehezíti az antigén helyének pontos kvantitatív vizsgálatát. A peroxidáz jelölés ezen korlátainak megkerülése érdekében a beágyazás előtti immunarany jelölést, majd ezüst intenzifikálást végeztünk, hogy a cortactin térbeli lokalizációja számszerűsíthető legyen (**27. ábra**). Hogy megbizonyosodjunk arról, hogy az immunarany jelölés valóban túlnyomórészt a tüskékben halmozódik fel, ahogy azt immunfluoreszcens, illetve immunperoxidáz kísérleteinkben láttuk, először megmértük az aranyrészecskék sűrűségét a különböző szubcelluláris kompartmentekben. A nonspecifikus háttérjelölést a Purkinje-sejtek sejtmagjai feletti aranyarany szemcse-sűrűség mérésével becsültük meg, mivel ezek nem festődtek fénymikroszkópos technikával (**24. B. ábra**). Az axonvégződés feletti jelölés nem különbözött szignifikánsan a sejtmagok esetében talált háttér jelöléstől, azonban a szemcsesűrűség jelentősen megemelkedett a dendritekben és a tüskékben (~ 7-szer, illetve ~ 25-ször nagyobb volt a háttérnél; **2. táblázat**).

	Denzitás (arany szemcse/ $\mu\text{m}^2$ )
Purkinje sejtmag	0.44±0.04 (n=16)
Axon terminális (asszimmetrikus)	1.22±0.28 (n=99)
Purkinje sejt dendritág	3.4±0.85 (n=15) **
Purkinje sejt tüske	12.28±1.09 (n=170) ***

**2. táblázat** A véletlenszerűen kiválasztott profilokat a fenti kategóriákba soroltuk, függetlenül az immunarany-tartalomtól. A nem specifikus/háttérjelölés értékeléséhez Purkinje sejtmagokat (a Purkinje sejtrétegből) is vizsgáltunk. A PC-k tüskéi és dendritágai robusztusan szignifikáns különbséget mutattak a sejtmagi háttértől ( $P < 0,001$ , illetve  $P < 0,01$ ), míg az axonterminálisokban feltűnően kevesebb arany szemcse volt, azonban ez nem különbözött szignifikánsan a háttértől ( $P = 0,8$ ). ( $\pm$  értékek SE; egyirányú ANOVA *poszthoc* Tukey-tesztekkel).

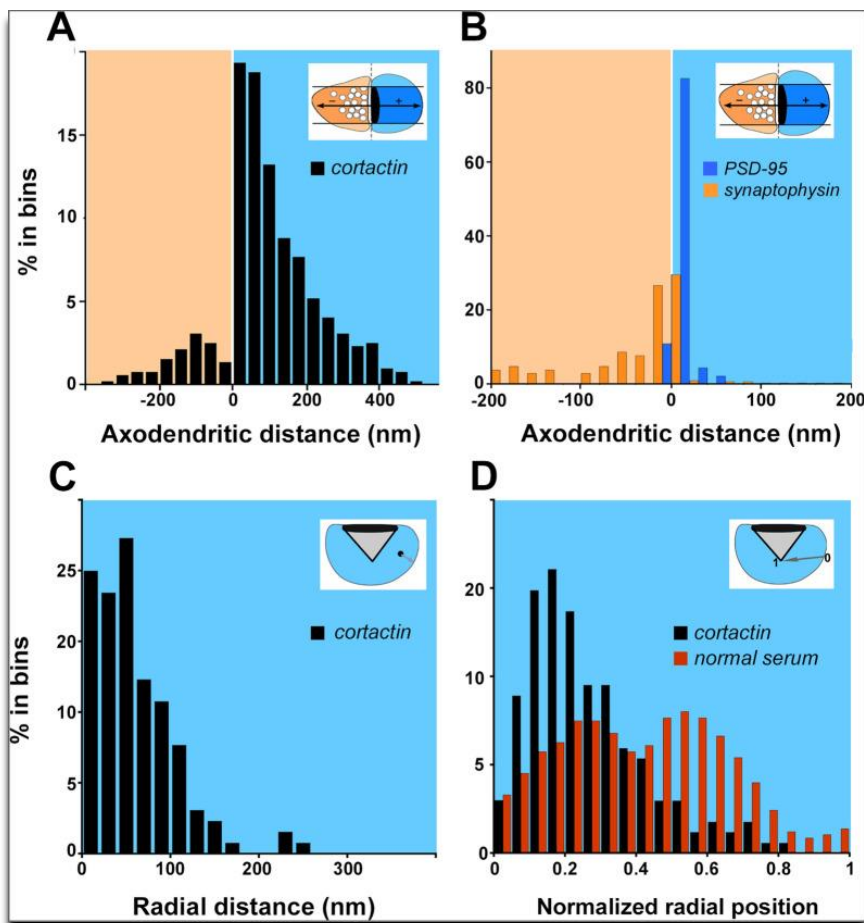
A PC tüskék erősen jelölődtek immunarannyal (**27. D<sub>1-4</sub> ábra**, csillagok). A tüskékben a cortactint kódoló szemcsék gyakran a tüske membránján vagy annak közelében helyezkedtek el, beleértve a poszt-szinaptikus denzitást is. A cortactin eloszlásának felméréséhez megmértük a cortactint kódoló aranyrészecskék távolságát az axo-dendritikus tengely mentén (**28. ábra**). Az axo-dendritikus tengely mentén mért értékek a szinaptikus réshez viszonyított pozíciót jelzik. Az axo-dendritikus tengely merőleges a szinaptikus rés tengelyére; az axo-dendritikus tengely mentén mért negatív értékek preszinaptikus eloszlást, míg a pozitív értékek poszt-szinaptikus eloszlást jeleznek (a kis pozitív értékek PSD-lokalizációra utalnak; lásd **28. B. ábra**, PSD-95). A cortactin jelölés átlagosan 78±11 nm-re volt a PSD-től (n=278 aranyarany szemcse). A cortactin

jelölés a szinaptikus membrántól 150 nm-re gyorsan csökkent, ami a túske centrális területén a fehérje hiányát bizonyítja. Emellett megmértük az átlagos PSD vastagságot is az elemzett túskepopulációban ( $38 \pm 1,5$  nm,  $n=102$  túske). Azt találtuk, hogy a cortactin a PSD-n belül vagy annak közvetlen közelében koncentrálódik az axodendritikus tengely mentén, és némileg a túskeplazmába is benyúlik. Összehasonlítottuk a cortactin axodendritikus eloszlását a synaptophysin (preszinaptikus marker, **27. E. ábra**) és a PSD-95 (posztzinaptikus marker, **27. F. ábra**) eloszlásával, megerősítve, hogy a cortactin eloszlása jelentősen eltér ( $-41 \pm 8$  nm a synaptophysin és  $6 \pm 1,5$  nm a PSD-95 esetében ( $n=110$  aranyszemcse mindkét fehérje esetében); **28. B. ábra**).

Ezután a PSD által meghatározott szinaptikus membránterületen kívüli szemcsék helyzetét vizsgáltuk. A nem szinaptikus túske membránhoz viszonyított radiális szemcsetávolságok mérésével feltárhatjuk, hogy a cortactin korlátozódik-e vagy felhalmozódik-e valamelyik túskeplazma tartományban. Ebben az esetben nem vettük figyelembe a PSD oldalsó szélei és a túske geometriai középpontja által meghatározott ék-alakú területen fekvő szemcséket, hogy elkerüljük a szinaptikus cortactin-pool miatti torzítást (lásd a szürke árnyékolt területet az **28.C. ábra** inzertjében). Azt találtuk, hogy ezek a szemcsék átlagosan  $55 \pm 3$  nm-re voltak a nem szinaptikus membrántól, és gyakorlatilag hiányoztak a túske központi magjából („core”) a membrántól 200 nm-en túl (**28. C. ábra**,  $n=130$  arany aranyszemcse). A túskeprofilok területe  $0,01-0,2 \mu\text{m}^2$  és átmérője 300-600 nm között volt (**2. táblázat**). A jelölés látszólagos csökkenésének egy része egyszerűen abból adódik, hogy sok túske-profilnak 200 nm-nél kisebb volt a sugara. Ennek korrigálására kiszámítottunk egy normalizált pozíciót, ahol a 0 a plazmamembránon lévő részecskének, az 1,0 pedig a túske geometriai középpontjában lévő szemcsének felel meg (lásd az **28. D ábra** betétjét). Ez a normalizálás lehetővé tette, hogy a túske méretétől független eloszlást ábrázoljunk. Ugyanis a túske középpontjához közeli távolságtartományok sokkal kevesebb citoplazmatikus területet tartalmaznak, mint a membránhoz közeli tartományok. Ezért a membránhoz közeli aranyszemcsék száma még egyenletes eloszlású véletlen pontok esetén is magasabb lesz, mint a túske közepén. A túske középpontjához közeli bin-ek területének e csökkenését kompenzálандó, kiszámítottuk a normalizált jelölési sűrűséget úgy, hogy az egyes bin-ekben lévő aranyszemcsék számát elosztottuk a bin-ek normalizált sugarával. E korrekciók után továbbra is a perifériás, membrán közeli (kérgi) régiójában, a membrántól  $\sim 0,2$  normalizált egységnyi távolságra lévő, a cortactint kódoló részecskék magas koncentrációját találtuk (átlag  $0,26 \pm 0,01$  normalizált egység), míg



azokból a metszetekből származó arany szemcsék esetén, ahol az elsődleges antitestet normál nyúlszérummal helyettesítettük, hozzávetőlegesen egyenletesen oszlottak el a túske sugárirányú tengelye mentén (átlag  $0,41 \pm 0,01$  normalizált egység;  $P < 0,001$ , Student's t-teszt; 28. D. ábra).

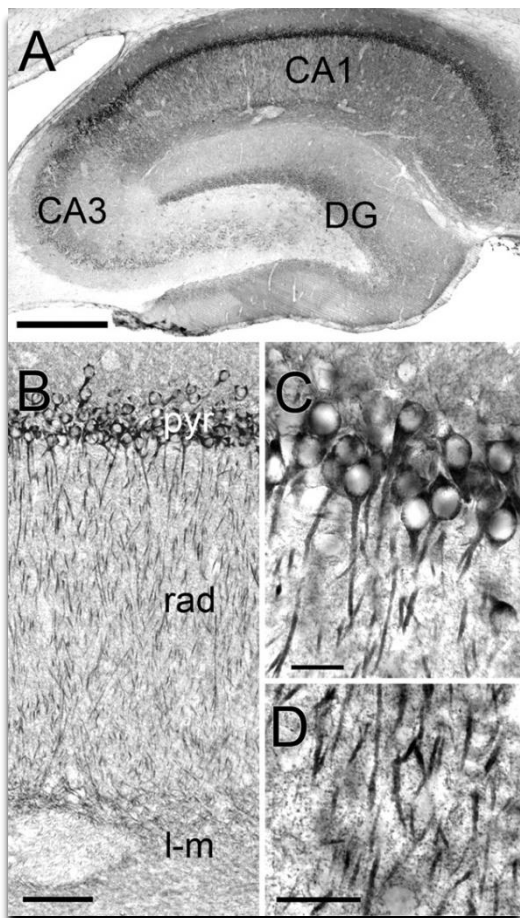


28. ábra. A cortactin és pre- ill. posztszinaptikus markerek eloszlása a PC-PF szinapszisokban. (A) A cortactint kódoló arany szemcsék axo-dendritikus eloszlását bemutató grafikon. A cortactin felhalmozódott a szinapszisban, a PSD citoplazmatikus peremébe nyúlva. (A magyarázatot lásd a betétekben: a narancssárga árnyékolt terület a preszinaptikus, míg a kék a posztszinaptikus) (B) A synaptophysint és PSD-95 állványfehérjét kódoló arany szemcsék axo-dendritikus eloszlása; a synaptophysin preszinaptikusan koncentrálik, míg a PSD-95 erősen a posztszinapszisa korlátozódik. (A magyarázatot lásd az inserteken) (C) A cortactint kódoló részecskék radiális eloszlása. A cortactint kódoló arany részecskék radiális távolságát a túskefejpofilok legközelebbi membránjától a grafikonon arányok formájában ábrázoltuk. A legtöbb cortactin arany szemcsé a nem szinaptikus membrán közvetlen közelében volt megtalálható. (D) A cortactin normalizált eloszlása azt mutatja, hogy a cortactin a túske méretétől függetlenül a szubmembrán tartományra korlátozódik, míg a normál nyúlszérumot kontrollként tartalmazó mintákból származó részecskék egyenletesebben oszlottak el a túskeplazmán belül. Az adatok 195 profilból származnak a cortactin, 45 a synaptophysin és 45 a PSD-95 esetében. A bin szélessége 35 nm volt az (A), 20 nm a (B, C) és 0,05 normalizált egység a (D) esetében. A D-ben az adatokat hárompontos súlyozott futó átlaggal simítottuk.

Fontos megjegyezni, hogy a PC tüskékben a cortactin eloszlása - ahol a tüske héjában halmozódik fel - eltér a hippokampális tüskékben korábban leírt eloszlásától, ott ugyanis pont a tüskék „citoplazmatikus magjában” található (ld. előző fejezet). Összességében a cortactin a PC tüskék inkább egy szubmembrán doménjében koncentrálódik.

### Az Arp2/3 szerveződése a tüskékben

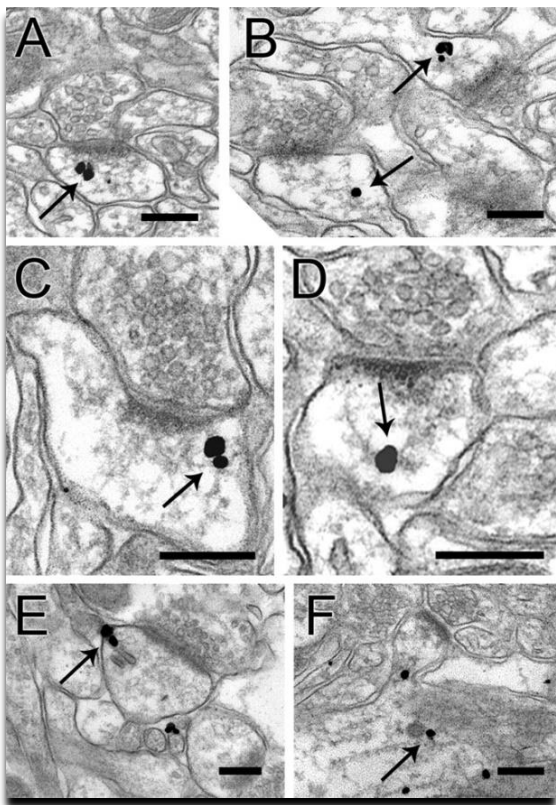
Arp2/3 immunfestést az agy szürkeállományában szinte mindenütt detektáltunk. Azon agyterületeken, ahol ismert, hogy sok tüskés neuron található jellemzően prominens volt az immunjelölődés, és a hippokampális CA1 régióban különösen erőteljes volt a festődés. (29. A. ábra). Az immunfestődés ezen az agyterületen elsősorban sejttestekben és dendritekben jelent meg, a sejtmagban nem volt jelen (29. B., C. ábra). Számos intenzíven jelölt pontszerű képletet tudtunk megfigyelni nagy nagyítással a neuropilben, ami felveti annak lehetőségét, hogy tüskékben is jelen van az ARPC-2 fehérje. (29. D. ábra).



29. ábra. Az ARPC-2 immunperoxidáz festése a hippokampusban. A. Alacsony nagyítású nézet; a festődés a CA1-ben a legerősebb. B. Nagyobb nagyítású nézetben rétegeket követő festődés látható. pyr, piramisréteg; rad, stratum radiatum; l-m, stratum lacunosum-moleculare. C. A CA1 piramisesejt-rétege. A festődés a sejttestet és az apikális dendriteket kiemeli, de a sejtmagokat elkerüli. D. nagy nagyításban immunpozitív pontok láthatók a stratum radiatum neuropilében, amelyek valószínűleg dendrit-tüskéknek felelnek meg. Méretsávok: A: 1 mm; B: 250  $\mu$ m; C,D: 50  $\mu$ m.

A fehérje precízebb szubcelluláris lokalizációjának érdekében preembedding immunarany jelölést használtunk. 1,4nm-es, ezüst intenzifikált szemcséket detektáltunk az elektronmikroszkópban a CA1 dendritjeiben, tüskéiben és axonterminálisaiban. A szemcsék a tüskékben gyakran előfordultak, de láthatólag a membrántól távolabb helyezkedtek el (30. A–D. ábra). A szemcsék a dendritekben és tüskékben jellemzően fonalas struktúrákhoz kötődtek, amelyek valószínűleg f-aktin szálak voltak (~5-6nm -es fonalak), különösen elágazódási helyeken voltak gyakran megfigyelhetőek (30. C.-D. ábra). Szintén előfordultak a szemcsék vezikuláris struktúrákhoz kapcsolódva, a túskeplazmában, vagy a dendrittörzsekben, a túskenyakakhoz közeli területeken. (30. E.-F. ábra).

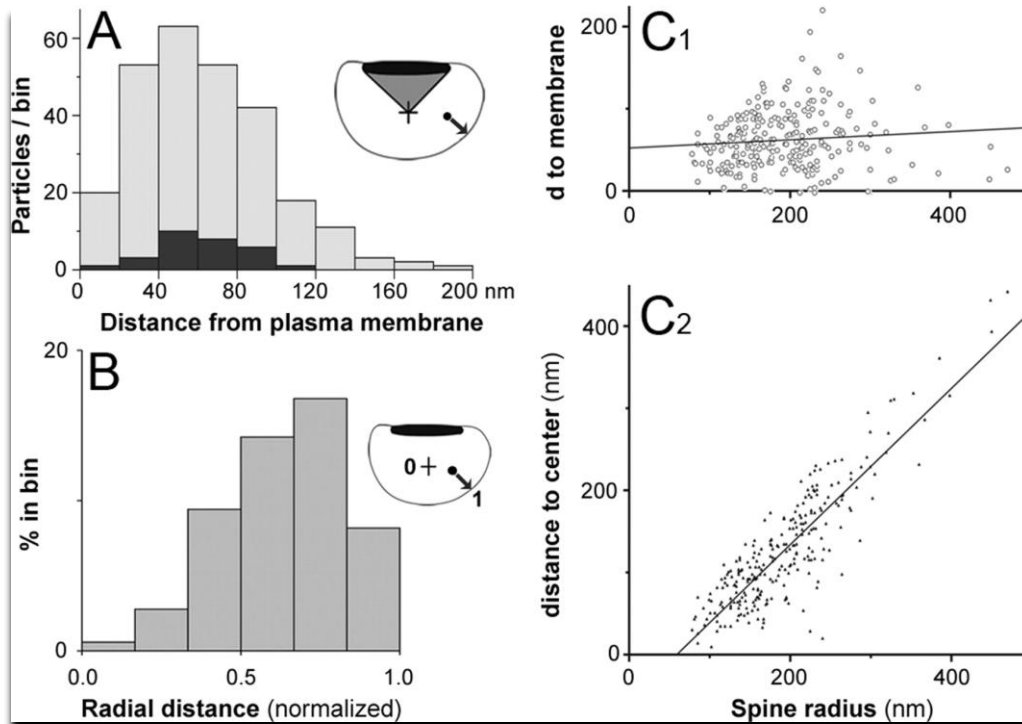
Annak megállapítás érdekében, hogy vajon az Arp2/3 komplex specifikus túske-területekre/doménekre koncentrálódik-e, ez esetben is elvégeztük az aranyszemcsék kvantitatív analízisét.



**30. ábra.** Beágyazás előtti immunarany jelölés a dendrittüskékben. **A,B.** Immunarany szemcsék (nyilak) a túske citoplazmájában, jellemzően a membrántól távolabb találhatóak. **C,D.** Az ARPC-2-t kódoló részecskék gyakran kapcsolódtak vékony filamentumokhoz, az elágazási pontok közelében (nyilak). **E.** Valószínűleg endoszómához kapcsolódó jelölés egy túskeprofilban. **F.** Fonalas struktúrákhoz és egy burkos vezikulához (nyíl) kapcsolódó aranyszemcsék egy dendrittörzsön belül. Egy másik aranyszemcsé látható az ebből a dendritből kiinduló túske nyakában lévő vezikulához kapcsolódva. Méretsávok, 250 nm.

Mivel a szinapszis területe jelentősen eltérhet a túskeplazma többi területétől, összehasonlítottuk azokat a szemcséket, amelyek a PSD két laterális szélé és a túske geometriai középpontja közé estek, azokkal az ARPC-2-t kódoló szemcsékkal, amelyek ezen a területen kívül estek (31. A. ábra). Mivel nem találtunk jelentős különbséget a két szemcsepopuláció

között, ezért a további vizsgálatokhoz már nem tekintettük rájuk külön szemcsepopulációként, és együtt vizsgáltuk őket. Az ARPC-2-t kódoló szemcsék a tüske plazmamembránjától távol helyezkedett el, de a tüskék geometriai középpontjában sem fordultak elő nagy gyakorisággal, 20 and 100 nm-re a plazmamembrántól érte el a legmagasabb koncentrációt (átlagosan  $63,3 \pm 2,1$  nm a membrántól;  $n=263$  szemcse - **31. A. ábra**). Ezek az adatok azt sejtetik, hogy az Arp2/3 komplex a plazmamembrán és a tüske középpontja közötti héjszerű alakzatban koncentrálnak.

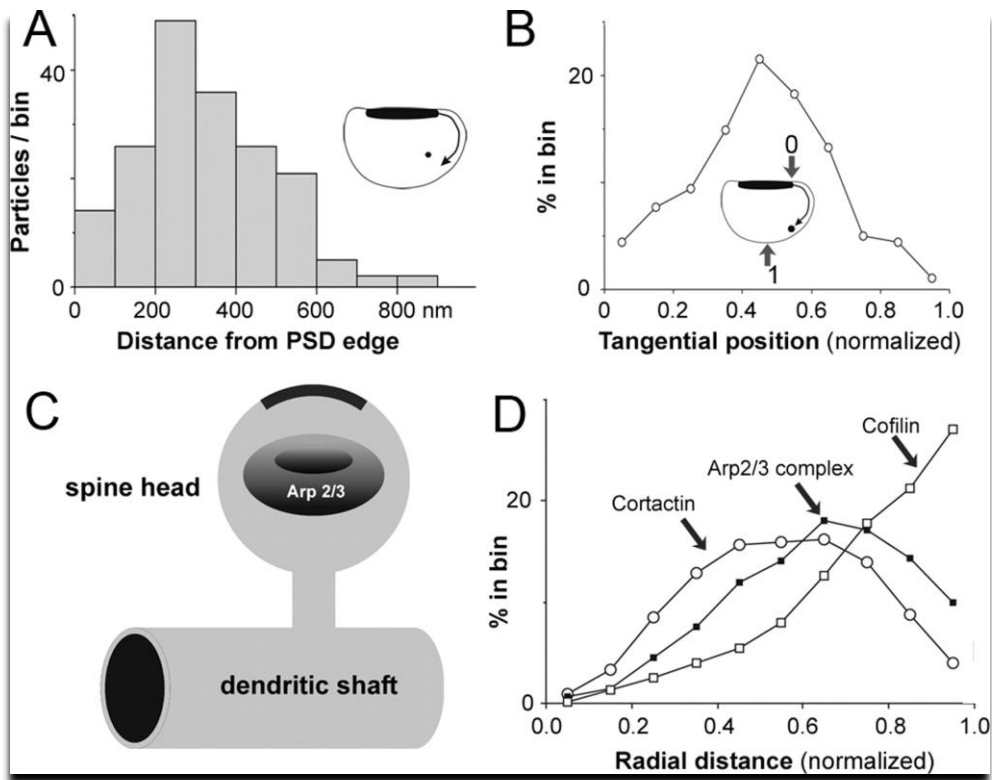


**31. ábra. Az aranyjelölés radiális szerveződése.** **A.** A hisztogram a tüske-membránhoz viszonyított jelölést mutatja; a PSD közvetlen környezetéből származó adatok (ld. beszúrt ábra) feketével vannak jelölve. A membrántól 20-100 nm-re koncentrálnak az immunarany szemcsék. **B.** A hisztogram a normalizált pozíciók eloszlását mutatja (0 a tüske középpontjában lévő szemcsének felel meg; 1,0 pedig a plazmamembránon lévő szemcsének). A részecskék 0,4 és 0,8 normalizált radiális egység között koncentrálnak a tüskefejen (lásd a mellékelt képet; a fekete pont az arany szemcsét, a nyíl pedig a szemcse és a membrán közötti távolságot jelöli). **C<sub>1</sub>.** Szórásdiagram: a tüskefej sugara nincs összefüggésben a plazmamembrántól való távolsággal; a vonal a legkisebb négyzetek lineáris regressziós illesztését mutatja ( $r = 0,09$ ). **C<sub>2</sub>.** Ezzel szemben figyeljük meg a tüskék sugara és a tüske középpontjától való távolság közötti szembetűnő kapcsolatot ( $r=0,87$ ).

Szemcsék csak ritkán fordultak elő 100 nm-nél nagyobb távolságra a membrántól (**31. A. ábra**). Fontos megjegyezni, hogy az adatok különböző átmérőjű tüske-profilokból származtak (80–470 nm; medián, 177 nm). Annak érdekében, hogy az adatokat hatékonyabban tudjuk értelmezni, normalizáltuk az egyes szemcsék helyzetét (pozícióját). A jelölés így is egy radiális zónába koncentrálnak a membránhoz közel, de a központi résztől is távolabb (**31. B. ábra**).

Ezután a szemcsék távolságát a membrántól ill. a tüske középpontjától vizsgáltuk meg, a teljes átmérőhöz viszonyítva (**31. C. ábra**). Nem találtunk kapcsolatot a tüske mérete és a membrántól való távolsága között. ( $r^2 < 0,01$ ), de nagyon szoros kapcsolat volt a tüske mérete (átmérője) és a középponttól való szemcsetávolság között. ( $r^2 > 0,76$ ;  $P < 0,001$ ). Ebből arra következtetünk, hogy az antigén a membrántól többé-kevésbé állandó távolságra fordul elő, a tüskemérettől függetlenül.

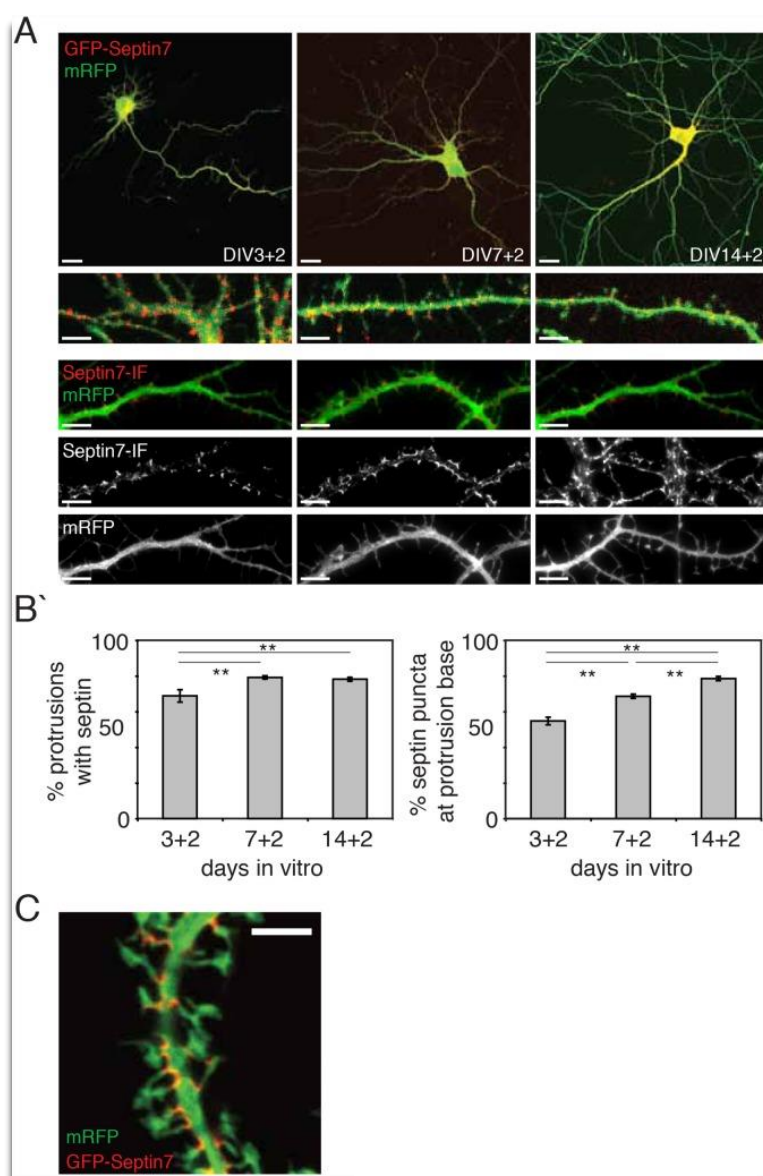
Végül arra voltunk kíváncsiak, hogyan koncentrálódik a tüskeplazmán belül az Arp2/3 komplex a PSD-hoz viszonyítva, a membrán mentén. Kevés szemcsét találtunk a PSD széleihez közel, ugyanakkor a szemcsék koncentrációja 200-400nm távolságra volt a legnagyobb a PSD-től távolodva a membrán vonalát követve (**32. A. ábra**). Mivel ez a tangenciális távolság korrelált a tüskék méretével, úgy normalizáltuk a tüskék helyzetét, hogy a 0 érték a PSD szélét jelentette, míg az 1,0-es érték a PSD két szélétől egyenlő távolságra elhelyezkedő szemcse helyzetét jelölte a membrán mentén (**32. B ábra**). Ebbe a vizsgálatba csak azokat a szemcséket vontuk be, amelyek esetében a normalizált radiális távolság nagyobb volt, mint 0,4 (**31. B ábra**), mivel a valós tangenciális távolsága a tüskeplazma közepén lévő szemcsének nehezen meghatározható. Az adatok vizsgálata azt mutatta, hogy az ARPC-2  $\sim 0,4-0,6$  normalizált tangenciális távolságra koncentrálódott a PSD széleitől (**32. B ábra**) (átlag,  $0,44 \pm 0,02$ ;  $n=189$  szemcse). Arra következtethetünk a fenti vizsgálatból, hogy az Arp2/3 komplex térben egy lyukas „fánkszerű” zónában koncentrálódik, amelyik a membrántól és a tüske középpontjától éppúgy távol helyezkedik el, mint a PSD széleitől és a tüske nyakától (**32. C. ábra**).



32. ábra. Aktin-szabályozó fehérjék szerveződése a dendrittűskében. **A.** Az ARPC-2 tangenciális eloszlása (lásd a sematikus magyarázó diagrammot). Az ARPC-2 a szinapszis közelében ritkán volt jelen, a PSD-től 200-400 nm-re volt a csúcspontja. **B.** Normalizált aranszemcsepozíciók: A 0 megfelel a PSD szélének, az 1,0 pedig a PSD mindkét szélétől egyenlő távolságra lévő pontnak (lásd a sematikus magyarázó diagrammot). A részecskék ~0,4-0,6 egység távolságra koncentrálnak a PSD-től. **C.** Az Arp2/3 komplexben gazdag domén sematikus ábrázolása. **D.** A cofilin (fehér négyzetek), az Arp2/3 komplex (fekete négyzetek) és a cortactin (fehér körök) tűskéken belüli térbeli eloszlását bemutató grafikon. A cofilin a plazmamembránhoz legközelebb koncentrálnak [posztembedding immunarany adatok Rácz és Weinberg (2006) munkájából], az Arp2/3 egy köztes pozícióban, a *cortactin* pedig a membrántól legtávolabb helyezkedik el [preembedding, (Rácz és Weinberg, 2004)].

## Septin szerveződése a tüskenyakban

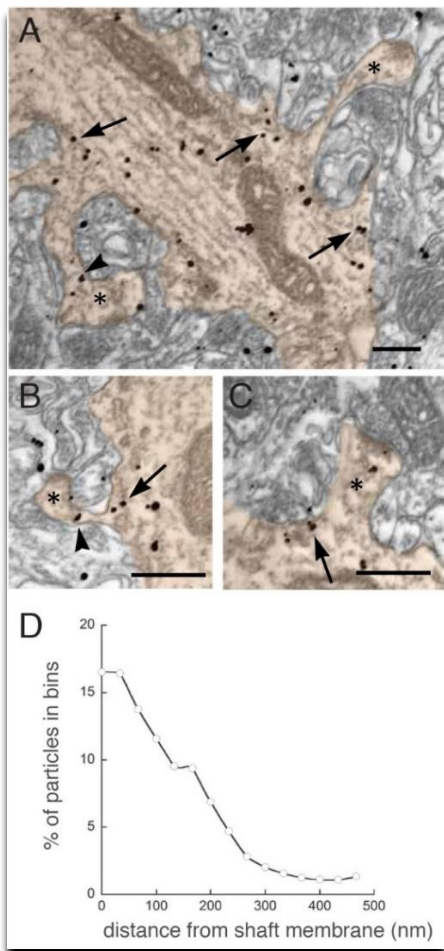
A Sept7-tartalmú komplexek a dendrit-elágazási pontokon, valamint a dendritikus filopódiumok és tüskék nyakán lokalizálódnak. Hogy tovább vizsgáljuk ennek a mintázatnak a kialakulását a neuronok morfológiai fejlődése során, Sept7-GFP-t expresszáltunk tenyésztett neuronokban különböző időpontokban (33. A. ábra). A Sept7-GFP expressziója diszkrét foltok jellegzetes mintázatát eredményezte, amelyek ugyanazt az eloszlást mutatták, mint az endogén Sept7 immunfluoreszcens festése (33. A. ábra, alsó sor), ami arra utal, hogy a Sept7-GFP lokalizálódik és különálló struktúrákba áll össze, amelyek nem különböztethetők meg az endogén Sept7-től.



**33. ábra. Membránhoz rendeződő, stabil Sept-pozitív struktúra a tüskenyakhoz lokalizálódik. (A) Sept7-GFP-t és mRFP-t két napig (+2) expresszálok, különböző *in vitro* napokon (DIV) fixált primer hippocampális neuronok fluoreszcens képei. Méretség: 20 $\mu$ m. Alatta: nagyított régiók a Sept7-GFP (első sor) és az immunfestett endogén Sept7 (második sor) lokalizációjának bemutatására, illetve ezek alul egycsatornás képként is láthatóak, hogy kiemeljük a septinek diszkrét lokalizációját a nyúlványok tövében. Méretség: 5 $\mu$ m. (B) Az (A) pontban bemutatott kísérletek számszerűsítése. Idővel egyre több nyúlvány visel Sept7-GFP-t a nyaki területeken (balra), és a Sept7-GFP foltok nagyobb valószínűséggel lokalizálódnak a protruzió nyakán (jobbra; átlag $\pm$ SEM; \*\*P<0,01; n=30 neuron; legalább 3 független kísérlet. (C) Konfokális felvételek fixált hippocampális neuronokról (DIV 21), 2 hetes Sept7-GFP (piros) és mRFP (zöld) expresszió után. A Sept7-GFP festődés a tüskenyakokhoz igazodó, ívszerű struktúrákban koncentrálódik. A jobb láthatóság miatt az fluorokrómok színeit utólag felcseréltük.**

A neuronális fejlődés követése során, a Sept7-GFP pozitív foltok lokalizációjának számszerűsítésekor azt találtuk, hogy idővel egyre több dendritből kiinduló nyúlványon található Sept7-GFP festődés a nyaki területen. A Sept7-pozitív nyúlványok aránya 65%-ról 80%-ra emelkedett (3+2 DIV vs. 14+2 DIV) (**33. B. ábra**). Ugyanezen időszak alatt a Sept7-GFP egyre nyilvánvalóbban lokalizálódott a nyúlványok nyakán, míg végül a 14+2 DIV időpontban a Sept7-GFP foltok több mint 80%-a a nyúlványok nyakán lokalizálódott (**33. B. ábra**). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a specifikus lokalizáció a tüskenyakon a Sept7 működésének egy fontos lokalizációját tükrözi.

Az érett tüskenyakak Sept7 szerkezetének részletes vizsgálatához 2-3 hétig hagytuk, hogy a neuronok Sept7-GFP-t expresszáljanak, és konfokális mikroszkópiával elemeztük a lokalizációját. Azt találtuk, hogy a tüskenyak Sept7-GFP ívszerű struktúrákat alkotott a plazmamembrán mentén (**33. C. ábra**). Arra a következtetésre jutottunk, hogy a Sept7 vékony, elnyújtott komplexeket képez a plazmamembrán alatt a dendrit-tüskék nyakainál.



**34. ábra. A Sept7 elektronmikroszkópos vizsgálata a hippocampusban. (A-C)** A CA1 stratum radiatum neuropiljét bemutató elektronmikroszkópos felvételek; a tüskék (csillagok) és a dendritörzsek narancssárga színnel vannak kiemelve. A Sept-7-et kódoló szemcsék gyakran koncentráálódtak a tüske tövében (nyilak). A jelölés nemcsak a tüskefejekben, hanem a tüskenyakokban is megfigyelhető volt (nyílhegyek). Méretszám: 200nm. **(D)** Vonaldiagram, amely a szemcsék lokalizációjának számszerűsítését mutatja a dendrit-membrántól való távolság függvényében. Az immunarany szemcsék körülbelül 60%-a a membrántól 0-100nm-en belül koncentrálik. A vonaldiagramot digitálisan simítottuk hárompontos súlyozott futó átlag segítségével.



A Sept7 eloszlásának pontosabb meghatározása érdekében elektronmikroszkópos vizsgálatot végeztünk patkány hippocampusban, beágyazás előtti immunarany jelöléssel. Számos arany szemcsét lokalizáltunk a dendritekben, a tüskékben és az axon-végződésben is. Bár a szemcsék jelen voltak a dendritekben és a tüskékben, jellemzően a tüske nyakának tövében koncentráálódtak, ahol a tüskék a dendrit tengelyhez kapcsolódtak (**34. A-C. ábra**). A Sept7 dendrit-törzseken belüli eloszlásának megállapításához megmértük az arany szemcsék távolságát a tengely membránjától. A Sept7-GFP és az endogén Sept7 fluoreszcencia-mikroszkópos megfigyeléseinkkel összhangban (**33. C. ábra**), a Sept7-et jelölő arany szemcsék a dendritikus membrán közelében koncentráálódtak, átlagosan  $146 \pm 9$  nm távolságban ( $n=250$  részecske), a jelölési sűrűség csúcsértéke  $\sim 50$  nm-re volt a membrántól (**34. D. ábra**). Érdekes módon a Sept7-et jelölő arany részecskék gyakran társultak nagy ( $\sim 35-50$  nm átmérőjű), hosszúkás és elektronsűrű struktúrákhoz a tüskenyakaknál (**34. B.-C. ábra**, nyilak). A tenyésztett hippocampális neuronokban hasonló eloszlást találtunk, intenzív, ív alakú festődéssel az axon-tüskék tövében (**33. C. ábra**). Az immun-EM tehát azt mutatja, hogy a Sept7 erősen koncentrálik közvetlenül a dendritikus membrán alatt, és a Sept7-et jelölő részecskék a tüskék tövében koncentráálódnak.

## Tüskeszínapszisok szerkezete neuropszichiátriai modellekben

### WAVE-1 hiány okozta elváltozások a tüske színapszisokban

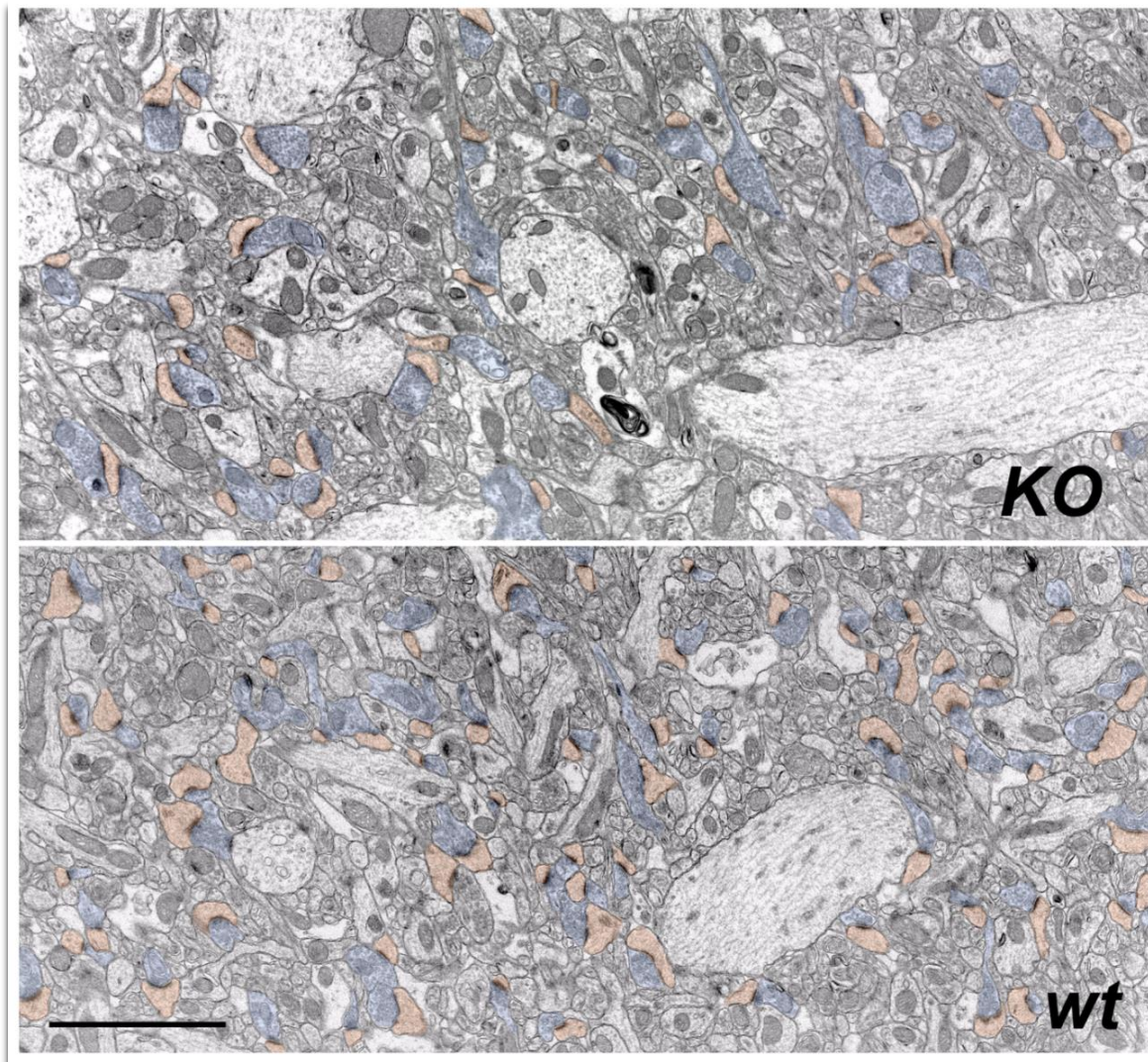
A hippocampusz CA1 régiójának stratum radiatum rétegét tanulmányoztuk mindkét csoportban (*wt* ill. WAVE-1 KO). Az állatok axon-terminálisait, dendrittüskéit és ezek szinaptikus kapcsolatait vizsgáltuk meg. Nem találtunk egyértelmű különbséget a nőstények és hímek adatsorai között, ezért mindkét nemből gyűjtöttünk adatokat az analízishez.

#### Preszinaptikus axon-terminálisok

A CA1 régió egyes metszeteinek adatai azt támasztják alá, hogy a genetikai lézió egy enyhe (8%-os) növekedést eredményezett az axonterminálisok denzitásában:  $86,2 \pm 1,6$  (SEM) /  $100 \mu\text{m}^2$  a KO csoportban ( $n=1990$  terminális, 70 területről, 3 állatból), a *wt* csoporthoz képest ( $79,5 \pm 1,6$  (SEM) /  $100 \mu\text{m}^2$ ;  $n=2334$  terminális, 39 területről, 3 állatból,  $P < 0.05$ , Wilcoxon-teszt, a denzitások mediánja  $86,4 / 100 \mu\text{m}^2$  és  $78,3 / 100 \mu\text{m}^2$  a KO és *wt* csoportokban). A kérdésünk az volt, hogy hány ilyen axonterminális létesít szinaptikus kapcsolatot dendrittüskével (csak azon kapcsolatokat vizsgálva, melyeket úgy definiáltunk, hogy tisztán látható a szinaptikus rés jelenléte és a tüskében a PSD). Azt találtuk, hogy jelentősen csökkent a terminálisok mennyisége a KO egerekben ( $n=1003$  terminális az 1990-ból), ahol a metszési síkban a terminálisok az axon-tüske színapszisok csupán 50,4%-ában voltak jelen, amíg a *wt* csoportban a terminálisok 75,2 %-a ( $n=1756$  terminális a  $n=2334$ -ből) szinaptizált dendrittüskével. Tovább vizsgáltuk, hogy az axonterminálisok mekkora hányada képez tüskeszínapszist a KO ill. *wt* állatok stratum radiatumából származó, egyesével vizsgált elektronmikroszkópos felvételeken: szignifikánsan alacsonyabb értéket mutattak a KO állatokból származó minták. ( $P < 0,001$ , a KO csoport mediánja: 50,0%, a *wt* csoporté: 75,7%). Összefoglalva, amíg a WAVE-1 deléciója enyhén növelte az axonterminálisok arányát/hányadát a CA1 régióban, addig a tüskékkel színapszist képző terminálisok arányát csökkentette.

A vizsgálataink tehát azt mutatták, hogy a terminálisok morfológiája kis mértékben változott KO egerekben (**35. ábra**), továbbá úgy találtuk, hogy a mutáns egerek terminálisai ~18%-kal nagyobbak is voltak (**36. A. ábra**; a terminálisok területe  $0,206 \pm 0,004 \mu\text{m}^2$  a KO egerekben,  $n=750$  terminális, összevetve a *wt* egerekkel, ahol ugyanez  $0,174 \pm 0,004 \mu\text{m}^2$ ,  $n=772$ ); a mediánjaik: 0,177 és 0,142;  $P < 0,001$ ). Sőt, ezek a nagyobb terminálisok ~24%-kal több szinaptikus vezikulát tartalmaztak terminálisonként, mint a *wt* egereké (a KO csoport állataiban

26,8±1,5 szinaptikus vezikula/terminális (n=77, 3 állat) és 21,6±1,1 szinaptikus vezikula/terminális a wt csoportban (n=77; 3 állat), P<0,02).

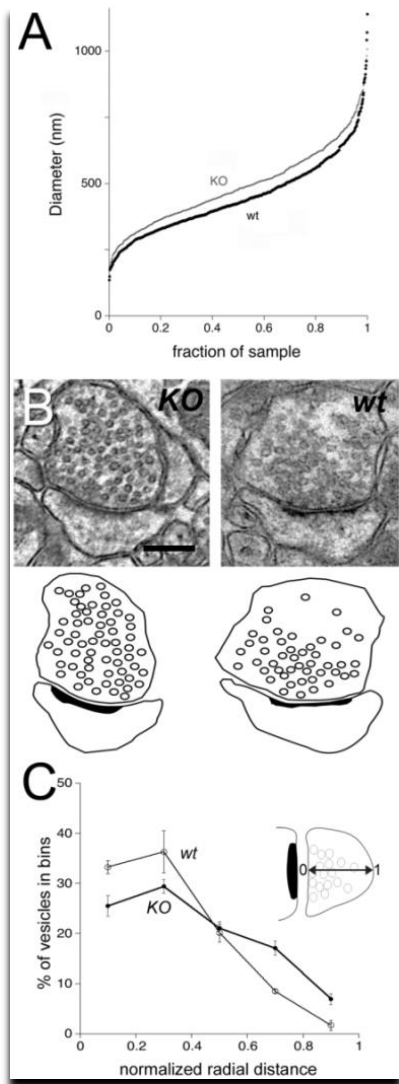


**35. ábra.** A WAVE-1 deléciójához kapcsolódó ultrastrukturális változások áttekintése. Jellegzetes, alacsony nagyításon készült elektronmikroszkópos kép egy szinaptikus neuropilben a str. radiatumból. A **posztzinaptikus tüskék** (narancs) és **preszinaptikus boutonok** (kék) a KO (A) és wt (B) csoportok anyagából. Méretség: 5 µm.

Preszinaptikus vezikulák a KO egerekben kevésbé szorosan kapcsolódtak az aktív zónához, mint a vad típusú társaikban, ez utóbbi csoport vezikulái jellemzően az aktív zónában koncentrálódtak, míg az axonterminálisokban, a periféria felé haladva számuk egyre csökkent (**36. B. ábra**). Hogy kvantitatívvá tegyük relatív pozíciójukat, megmértük a vezikulák távolságát a szinaptikus membrántól (aktív zóna), mely megerősítette, hogy a vezikulák a KO egerekben (180±6 nm; n=598 vezikula) jelentősen nagyobb távolságra helyezkedtek el a szinaptikus membrántól, mint a wt egerekben (136±4nm; n=574); (mediánjuk: 147 és 111; P<0,001).

Azonban a KO állatok axonterminálisai nagyobbak voltak, mint a *wt* egereké, alkalmanként torzítva ezzel az eredményeket. Hogy ezt kiküszöböljük, normalizált eloszlást számoltunk a szinaptikus vezikulákat tekintve, úgy, hogy az a vezikula, mely érinti a preszinaptikus membránt az aktív zónában, 0 értéket kapott a normalizált radiális távolságra, míg az a vezikula, mely a plazmamembrán ellentétes oldalán helyezkedett el, 1,0 –es értéket kapott (**36. C. ábra**). Ez az analízis megerősítette a korábbi feltevésünket és megmutatta, hogy a KO egerek vezikuláinak a membrántól számított átlagos normalizált távolsága 0,40 egység, míg a *wt* egerek szinaptikus vezikulái a szinapszishoz közelebb helyezkedtek el, átlagosan 0,29 normalizált pozícióban (**36. C. ábra**; medián: 0,37 és 0,29;  $P < 0,001$ ). Így tehát a nagyobb axonterminálisok a WAVE-1 KO állatokban szignifikánsan több vezikulát tartalmaztak, amelyek rendellenes eloszlást mutattak a terminálison belül.

A WAVE-1 hiánya a dendrittüskékben



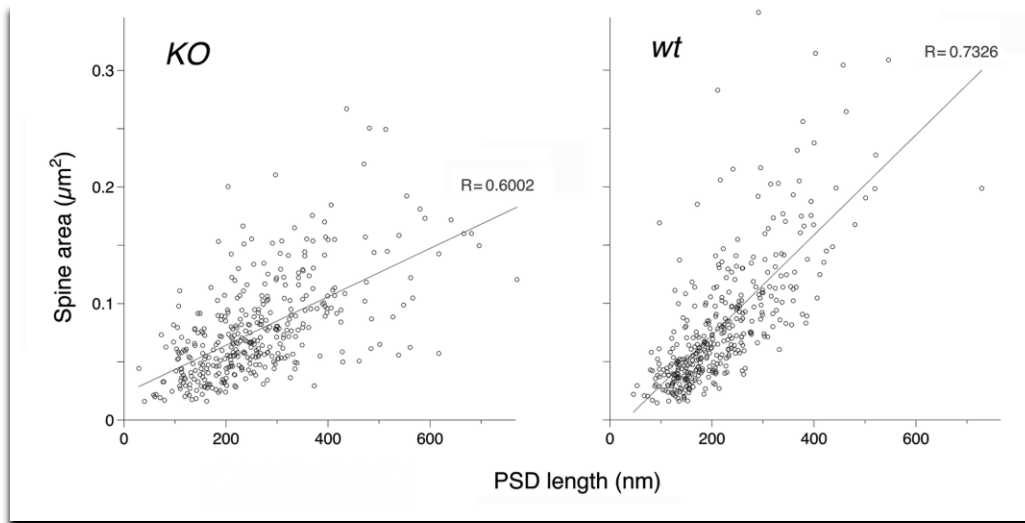
**36.ábra.** A WAVE-1 befolyásolta a preszinaptikus terminális méretét és a szinaptikus vezikulák szerveződését is. **A.** Az összesített plot a KO állatokban (szürke körrel) és *wt* állatokban (fekete gyémánt alakzattal jelölt) a terminálisok átlag átmérőjének eloszlását mutatja (átmérő kiszámítása:  $\sqrt{\text{terület} \cdot 4/\pi}$ )

**B.** Elektronmikroszkópos felvételek ( felül) és ezeknek megfelelő rajzok ( alsó ábrák) illusztrálják a szinaptikus vezikulák szerveződését az axonterminálison belül KO egérben (bal oldal), összehasonlítva a kontrol csoporttal, *wt* egér (jobb oldal). A mikroszkópos képek a hippokampusz CA1 régiójának str. radiatumából származnak. **C.** A szinaptikus vezikulák száma több és a szinaptikus membrántól távolabb helyezkednek el a KO egerekben, összehasonlítva a *wt* csoporttal.

Összhangban a korábban publikált *in vitro* tanulmányok fénymikroszkópos eredményeivel, melyek alátámasztották a tüskék számának csökkenését, mint a WAVE-1 hiány által előidézett hatást, egy feltűnő (~30%-os) csökkenést figyeltünk meg a CA1 régió posztzinaptikus dendrittüskéinek számában, KO egerekben (KO,  $42,8 \pm 1,2$  tüske/ $\mu\text{m}^2$ ,  $n=70$  mezőből; *wt*,  $60,7 \pm 1,5$  tüske/ $\mu\text{m}^2$ ,  $n=80$  mezőből;  $P < 0,001$ ; **35. ábra**). Összehasonlítva a KO és *wt* csoportok tüskeméretét ( $n=384$  tüske a KO állatokból és  $n=395$  a *wt* csoportból), nem találtunk szignifikáns különbséget a tüskék területét illetően (KO,  $0,077 \pm 0,002 \mu\text{m}^2$ ; *wt*,  $0,079 \pm 0,002 \mu\text{m}^2$ ;  $P > 0,4$ ). Ezzel ellentétben a tüskék kerülete  $1221 \pm 22 \text{ nm}$ , *wt* egerekben  $1133 \pm 21 \text{ nm}$ ;  $P < 0,002$ ) szignifikánsan nőtt KO egerekben. Hasonlóképpen a PSD hossza, ahogy a metszeten látható, szignifikánsan hosszabb a KO csoport tüskéiben, összevetve a *wt* állatokéval ( $216 \pm 5 \text{ nm}$ ;  $P < 0,001$ ). Egy korábbi, sorozatmetszetek mikroszkópos vizsgálatán alapuló kísérlet azt bizonyítja, hogy a nagyobb tüskék jellemzően hosszabb PSD-t tartalmaznak. Ennek megfelelően értékeltük a kapcsolatot a tüskék fejének területe és a PSD-jük hossza között az általunk feldolgozott metszeten. Random mintavételezéssel kiválasztott, KO állatokból

származó metszeteink dendrittüskéiben pozitívan korrelált a tüskefej területe és a PSD hossza

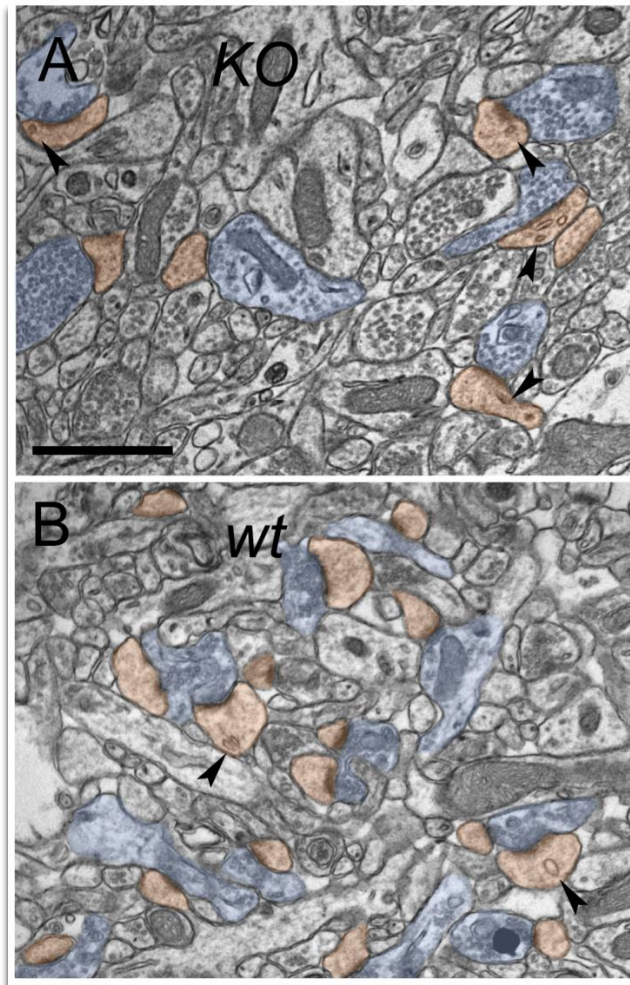
( $r^2=0,36$ ), de egyértelműen erősebb volt a korreláció a *wt* egerek csoportjában ( $r^2=0,54$ , **37. ábra**).



**37.ábra.** A WAVE-1 hatása a túske méret és a PSD hosszának kapcsolatára. A szórásgörbe a túskeprofilok területét, mint a PSD hossz egyik függvényét mutatja, CA1 régiójának stratum radiatum KO állatokban (bal) és *wt* állatokban (jobb). A lineáris regresszió mutatja a gyengébb korrelációt a túskefej területe és PSD hossz között KO állatban ( $R=0,60$ ) a *wt* anyaghoz képest ( $R=0,73$ )

Az, hogy a túske kerülete nőtt, míg a túske területe változatlan maradt a KO egerekben, azzal magyarázható, hogy a túskeprofilok kevésbé állnak közel a kerek alakhoz KO állatban, mint *wt* társaikban. Ezt megvizsgálandó „cirkularitást”, kerekiséget számoltunk a random módon kiválasztott túskek fejének profiljai alapján (1,0 érték jelzi a tökéletesen kör alakú túskeket és 0 értékhez tartozik a teljesen lapított túskealak) (lásd a módszerek adatainál). Azt találtuk, hogy a KO egerek túskei szignifikánsan távolabb álltak a tökéletes kör alaktól, mint *wt* társaik stratum radiatumban jelenlévő túskei. ( $0,74 \pm 0,01$ ;  $P < 0,001$ ), azt jelezve, hogy a KO állatok megnyúlt, lapos túskefejekkel rendelkeznek.

A túskek belső szerkezetében is felfedeztünk a normálistól eltérő változásokat. Nem találtunk túskeapparátust a KO mintákban (989 túskeből, 0 túskeben), ellentétben a *wt* állatok túskeivel, ahol (1602 túskeből 35-ben), a túskek ~2%-a jól meghatározott, tisztán kivehető szerveződést mutatott (jellegzetes, gomba alakú túskek). Másrészt, a KO csoport anyagából származó mintákban közel háromszor annyi endoszómát találtunk (46,4/100 túske), mint a *wt* csoportban (16,6/100 túske,  $P < 0,001$ ; **38. ábra**, nyílhegyek).

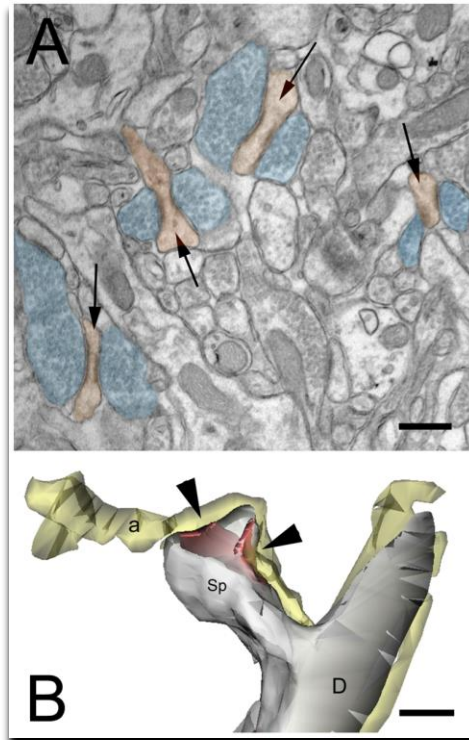


**38. ábra.** A WAVE-1 funkciókiesése a túske belső szerkezetében abnormális változásokat okoz. Reprezentatív elektronmikroszkópos felvételek a CA1 régió str. radiatumából; az 35. ábrának megfelelő színekkel. A KO anyagból származó tüskék (A) jóval több endoszómát tartalmaznak (fekete nyílhegyek), mint a wt társaik dendrittüskéi (B). Méretsáv: 1 $\mu$ m.

### *WAVE-1 funkciókiesés okozta változások a szinaptikus kapcsolatokban*

A fenti eredmények alátámasztják azt a megállapítást, miszerint a WAVE-1 funkciókiesés okozta hatások a posztszinaptikus dendrittüskékben erőteljesebbek, az axonterminálisokban tapasztaltakhoz képest. Érdekes, hogy a jellemzően lapított alakú tüskéknek térben jól elkülönülő PSD-jük van. Ezek nem a jellegzetes, perforált szinapszisok, melyekkel ellentétben, itt a PSD-k a dendrittüske fejének két, ellentétes oldalán helyezkednek el, láthatóan különböző axonterminálisokhoz kapcsolódva (lásd nyílak az **39. A. ábrán**). Ezek a morfológiai jellemzők ritkán figyelhetők meg a normál CA1 régió stratum radiatumában. Hogy kiderítsük, vajon létrejött-e szinaptikus kapcsolat az axonterminálisok között, sorozatmetszetek felhasználásával rekonstrukciót készítettünk egy reprezentatív területről, mely ezeket az átlagostól eltérő szinapszisokat tartalmazza (n=21). Mindegyik megvizsgált esetben azt találtuk, hogy egyetlen

axonterminális ad le ágakat mindkét szinapszisnak (39. B. ábra). Ezek a szabálytalan alakú szinaptikus kapcsolatok magyarázzák –legalábbis részben- a megfigyelt számbeli aszimmetriát a szinaptikus partnerek között.



39.ábra. Abnormális tüskék a stratum radiatumból, WAVE-1 KO egérben. A. A nyilak a két PSD-vel rendelkező dendrittüskére mutatnak. A **tüskék** narancssárga színnel, az **axonterminálisok** kézzel ábrázolva. B. Egy axospinózus szinaptikus kapcsolat 3 dimenziós reprezentációja, mutáns egér hippocampuszából. A CA1 régió dendritjének egy csúcsi szegmensén (D) lévő tüske (Sp), melynek szinaptikus felszíne látható. A tüske két, elkülönülő PSD-vel rendelkezik (piros nyilak). Ugyanazon axon (sárga) hoz létre két, különálló szinaptikus kapcsolatot, két PSD-vel. Az **axon** sárgával, a **PSD** piros színnel jelölve. A nyilak a szinaptikus felszínre mutatnak, a preszinaptikusan aktív zóna és a tüske PSD-je között. Méreetsáv: 200µm.

Összességében arra jutottunk, hogy a terminálisok száma KO egerekben kevésbé változott, de ezek a terminálisok nagyobbak voltak, bennük nagyobb számú, de kevésbé jól szervezett szinaptikus vezikulával. A posztzinaptikus oldalon a tüske-denzitás szignifikánsan csökkent KO állatokban és e tüskék a normálistól különböző szinaptikus kapcsolatokat hoztak létre; továbbá a tüskék feji része lapított volt, a normálistól eltérő belső membrán-kapcsolt struktúrákkal.



## Az Arp2/3 komplex hiány okozta szerkezeti változások az előagyi tüskeszínapszisokban

### *Az Arp2/3 hiány a hippocampusban*

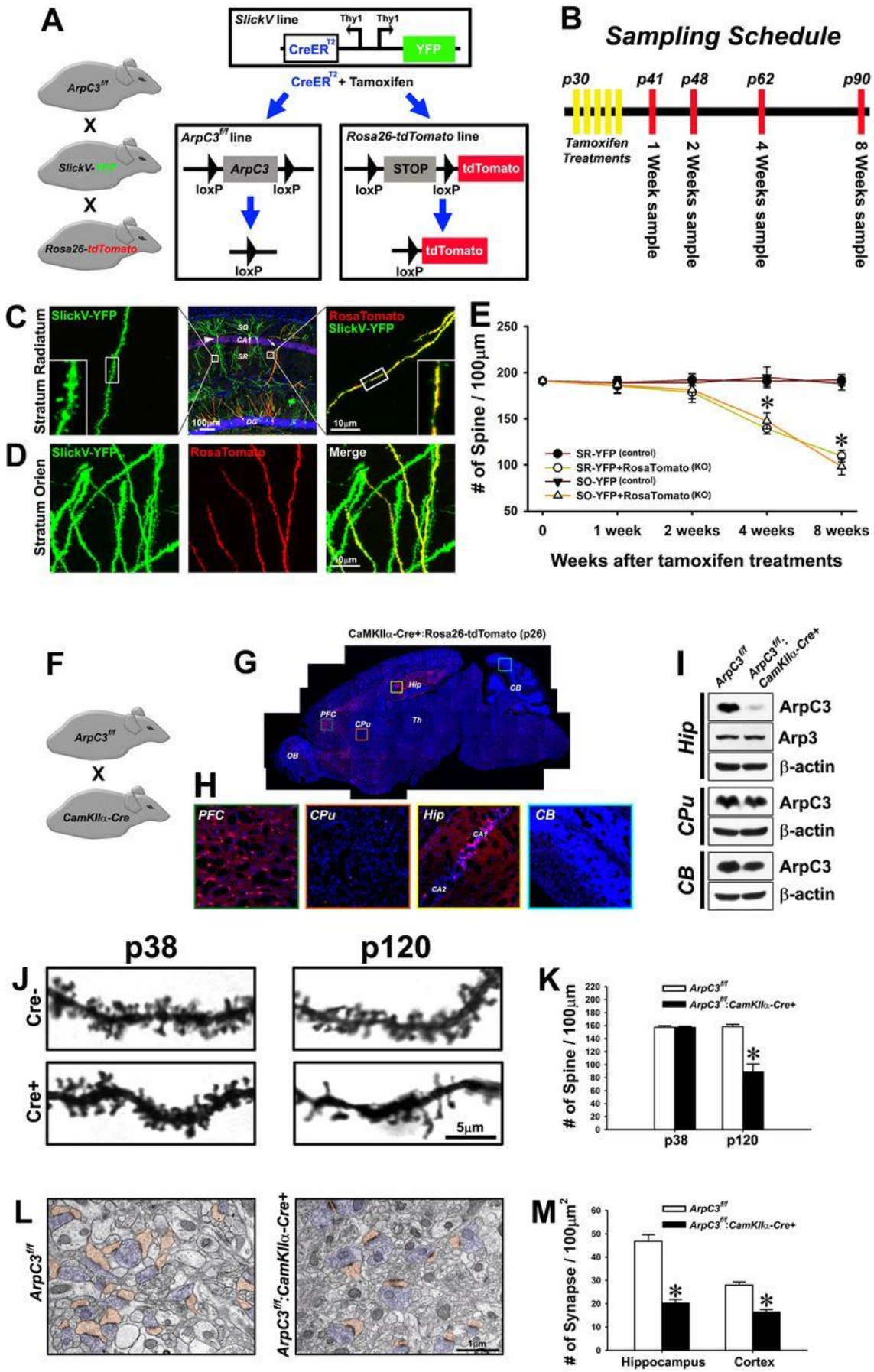
Az Arp2/3 komplex hiányának vizsgálatára háromszoros mutáns *ArpC3f/f:SlickV-YFP-CreERT2:Rosa26-lox-stop-lox-tdTomato-fluoreszcens fehérje* transzgenikus egereket hozott létre a Duke Egyetemen (Durham, NC, USA) Scott Soderling laboratóriuma. Ezzel számunkra is lehetővé vált, hogy az agyszövet mintákon fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatokat végezzünk, és nyomon kövessük az ArpC3 deléció indukálta morfológiai változásokat. Ezzel az egérrel lehetővé vált a Cre-pozitív és -negatív neuronok *in vivo* jelölése és vizualizálása tamoxifen-kezelést követően (**40. A. ábra**), továbbá lehetővé tette a Cre-indukcióval rendelkező és nem rendelkező neuronok morfológiájának azonosítását és összehasonlítását ugyanazon szöveten belül. Ezen felül, az ArpC3 Cre-mediált elvesztése posztnatálisan is indukálható volt, és a neuronok morfológiájában bekövetkező változások időben is nyomon követhetők voltak (**40. B. ábra**).

A hippocampusból származó metszeteket (**40. C.-D. ábra**) a tamoxifen-kezelés után 1-8 héttel (P30-P35) készítettük el, és minden egyes időpontban megmértük a tüskék sűrűségét. Meglepő módon a tamoxifen-kezelést követő első 2 hétben nem volt különbség a tüskék sűrűségében az ArpC3f/f:Cre-pozitív (YFP/tdTomato kettős pozitív) KO neuronok és az ArpC3f/f:Cre-negatív (YFP egyszeresen pozitív) kontroll neuronok között (**40. E. ábra**). Azonban 4 hétre a KO neuronok tüskésűrűségének fokozatos csökkenése már nyilvánvaló volt, a tamoxifen kezelés után 8 héttel a stratum radiatumban a tüskék 43%-os csökkenése volt megfigyelhető (**40. E. ábra**). Így az ArpC3 posztnatális deléciója *in vivo* a tüskék fokozatos elvesztését idézi elő, nem pedig azonnali eltűnésüket.

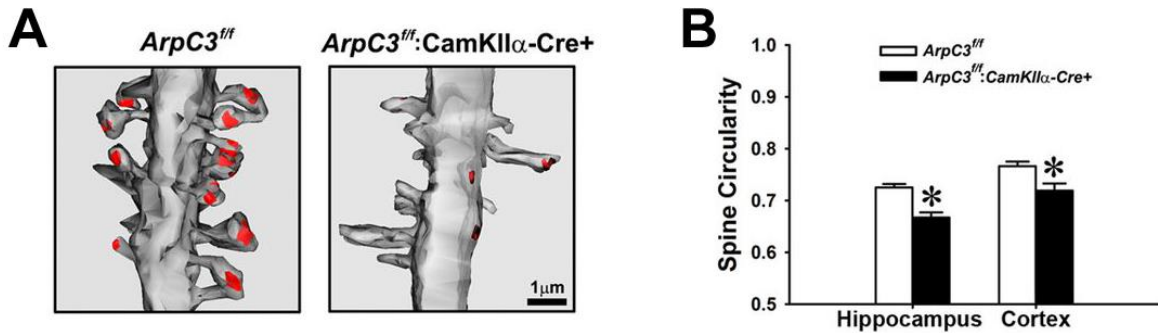
A tüskék progresszív elvesztésének megerősítésére *ArpC3f/f:CamKII $\alpha$ -Cre* egereket hoztunk létre (**40. F. ábra**). A CamKII $\alpha$ -Cre már PND20-ra kiterjedten expresszálja a Cre rekombinázt pl. a CA1 hippocampusz és az agykéreg egyes területein, például a prefrontális kéreg piramidális neuronjaiban (**40. G.-H. ábra**). Az ArpC3 fehérje specifikusan eltűnt a Cre-t expresszáló régiókban (**40. I. ábra**) P38-ban nem volt különbség az *ArpC3f/f* és az *ArpC3f/f:CamKII $\alpha$ -Cre* tüskék sűrűsége között a CA1 hippocampusban Golgi-festés elemzésével (**40. J.-K. ábra**). Ezzel szemben PND120-nál az *ArpC3f/f:CamKII $\alpha$ -Cre* mintákban 44%-os csökkenés volt a tüskék sűrűségében (**40. J.-K. ábra**), ami megerősíti a hármas mutáns egerekben megfigyelt progresszív tüske-vesztést.

Ez a posztnatális tüske-vesztés a serkentő tüske-szinapszisok megfelelő csökkenését tükrözi, amely jelenségről úgy gondolják, hogy számos neuropszichiátriai rendellenességhez hozzájárul. E következtetés igazolására a tüskék szinaptikus kapcsolatait tovább vizsgáltuk transzmissziós elektronmikroszkópiával az *ArpC3fff:CamKII $\alpha$ -Cre* mutáns egerekben (**40. L. ábra**). 4 hónapos korban az *ArpC3fff:CamKII $\alpha$ -Cre* egereknél a hippocampusz stratum radiatumában a tüskékre érkező szinapszisok 56%-os, az agykéregben pedig a kontrollhoz képest 41%-os szinapszisvesztést tapasztaltunk (**40. M. ábra**), ami azt mutatja, hogy az ArpC3 deléción a dendrit-tüskékre érkező szinapszisok kiterjedt, de késleltetett vesztését eredményezi.

Az is megfigyelhető volt, hogy a tüskék számának csökkenése mellett azok morfológiája is megváltozik. A tüskék morfológiájában bekövetkezett progresszív változások jól megfigyelhetők a **40. ábrán** is (J). A kontroll és a knock-out tüskék közötti morfológiai különbségeket felnőtt *ArpC3fff:CamKII $\alpha$ -Cre* egerek hippocampális stratum radiatumából származó metszeteken is megvizsgáltuk és 3D rekonstrukcióval megbizonyosodunk a tüskék alakjában bekövetkező változásokról. (**41. A. ábra**). Az EM anyag kvantitatív elemzése azt mutatta, hogy az *ArpC3fff:CamKII $\alpha$ -Cre* egerek tüske-fejei megnyúltabbak voltak, mint az *ArpC3fff* kontroll egereké (**41. B. ábra**). Ezek az adatok együttesen azt mutatják, hogy az Arp2/3 szükséges az aktivitásfüggő tüske-morfológia kialakulásához, és azt sugallják, hogy alapvető a normál tüske-morfológia egyensúlyának fenntartásához is.



**40. ábra. A tükkeszinapszisok progresszív elvesztése ArpC3 deléció következményeként.** **A**, A hármas mutáns *ArpC3<sup>f/f</sup>:SlickV-YFP:Rosa26-lox-stop-lox-tdTomato* egerek sematikus vázlata. A Cre-aktivitás indukálása tamoxifen kezeléssel az ArpC3 delécióját és egy lox-stop-lox kazetta tdTomato-val történő jelölését eredményezi azoknál a neuronoknál, ahol az ArpC3 elvész. A Cre-aktivitást nélkülöző neuronok viszont csak YFP-vel vannak jelölve. **B**, A tripla mutáns egereken végzett kísérletek idővonala sematikusán, amely a tamoxifen kezeléseket és a mintavétel időpontját mutatja. **C**, Reprerentatív konfokális képek, amelyek YFP (kontroll, balra) és YFP + tdTomato (cKO, jobbra) dendrit-szakaszokat mutatnak ugyanabból a szövetből (középen; 8 héttel a tamoxifen-kezelés után). A hippocampus régiói jelölve; SO, stratum oriens; SR, stratum radiatum; DG, dentate gyrus. **D**, Reprerentatív konfokális felvételek a stratum oriensből származó dendritekről, amelyeken YFP (balra), tdTomato (Cre-pozitív; középen) és a kettő együtt (jobbra) látható, ami a egyértelműen a tükkeszinapszisok szelektív elvesztését jelzi a Cre-expresszálo neuronban (8 héttel a tamoxifen után). **E**, A tamoxifen-kezelés után 1-8 héttel a kontroll (YFP) és a cKO (YFP+tdTomato) neuronok tükkesűrűségének grafikonja a CA1 stratum radiatum (SR; n=11-15 neuron minden genotípus és időpont esetében) és stratum oriens (SO; n=9-16 neuron minden genotípus és időpont esetében) hippocampális régiókból. A tükkek számának kétirányú ANOVA-ja a Cre indukciót követő idő (F(3,189) = 22,42, p < 0,001) és a csoport (F(3,189) = 43,82, p < 0,001) szignifikáns fő hatását, valamint szignifikáns idő × csoport kölcsönhatást (F(9,189) = 7,99, p < 0,001) mutatott. A Bonferroni-korrigált páros összehasonlítások felfedték, hogy a tamoxifen-kezelést követő első 2 hétben a négy csoport között nem volt szignifikáns különbség a tükkek számában. Azonban 4 és 8 hét múlva a tükkek száma mind az SR, mind az SO rétegekben szignifikánsan csökkent a Cre+ neuronokban a Cre- kontroll neuronokhoz képest (\*P<0,001, a megfelelő kontrollokhoz képest). **F**, *ArpC3<sup>f/f</sup>:CaMKII $\alpha$ -Cre* egérvonal. **G**, Reprerentatív szagittális metszet *CaMKII $\alpha$ -Cre:Rosa26-lox-stop-lox-tdTomato* PND26 korú egérből. **tdTomato** expresszió (piros), a Cre aktivitás markere, és **DAPI** nukleáris festés (kék) látható. **H**, A kiemelt képek a G-ből a prefrontális kéreg (PFC), a caudate-putamen (CPu), a hippocampus CA1 és CA2 (Hip), valamint a kisagy (CB) régióit mutatják nagy nagyítással. OB, szaglógumó; Th, talamusz. **I**, reprerentatív immunoblotok Cre+ (Hip) és Cre- régiókból (CPu, CB) az ArpC3, Arp3 és  $\beta$ -aktin tekintetében. A még kis mennyiségben látható ArpC3 valószínűleg a Cre- hippocampus glia és interneuronokat tükrözi. **J**, Az *ArpC3<sup>f/f</sup>:CaMKII $\alpha$ -Cre* egerekből származó tükkek vizualizációja az *ArpC3<sup>f/f</sup>* kontrollokkal összehasonlítva Golgi festéssel PND38 és PND120 időpontokban. **K**, A tükkek denzitását bemutató grafikon PND38 és PND120 időpontban. A független t-teszt nem mutatott különbséget a tükkek sűrűségében a cKO egerek és a kontrollok között a PND38 agyakban. A PND120-as cKO egerek azonban a tükke-sűrűség szignifikáns csökkenését mutatták a PND120 kontrollokhoz képest (t(1,4) = 6,71, P<0,01), \*P<0,01. **L**, Reprerentatív elektronmikroszkópos felvételek, amelyek posztszinaptikus tükkeket (narancssárga) és preszinaptikus butonokat (kék) mutatnak a kontroll és cKO CA1 hippocampusban PND120 korú egerekből. **M**. A grafikon a tükkeszinapszisok sűrűségét hasonlítja össze a hippocampusból [Cre- (n=283 axospinális szinapszis 29 EM felvételtől); Cre+ (n=196 axospinális szinapszis 46 EM felvételtől)], és a kéregből [Cre- (n = 181 axospinális szinapszis 31 EM felvételtől); Cre+ (n = 113 axospinális szinapszis 33 EM felvételtől)] származó kontroll és cKO metszetekben. \*P<0,001, a megfelelő kontrollokhoz képest.



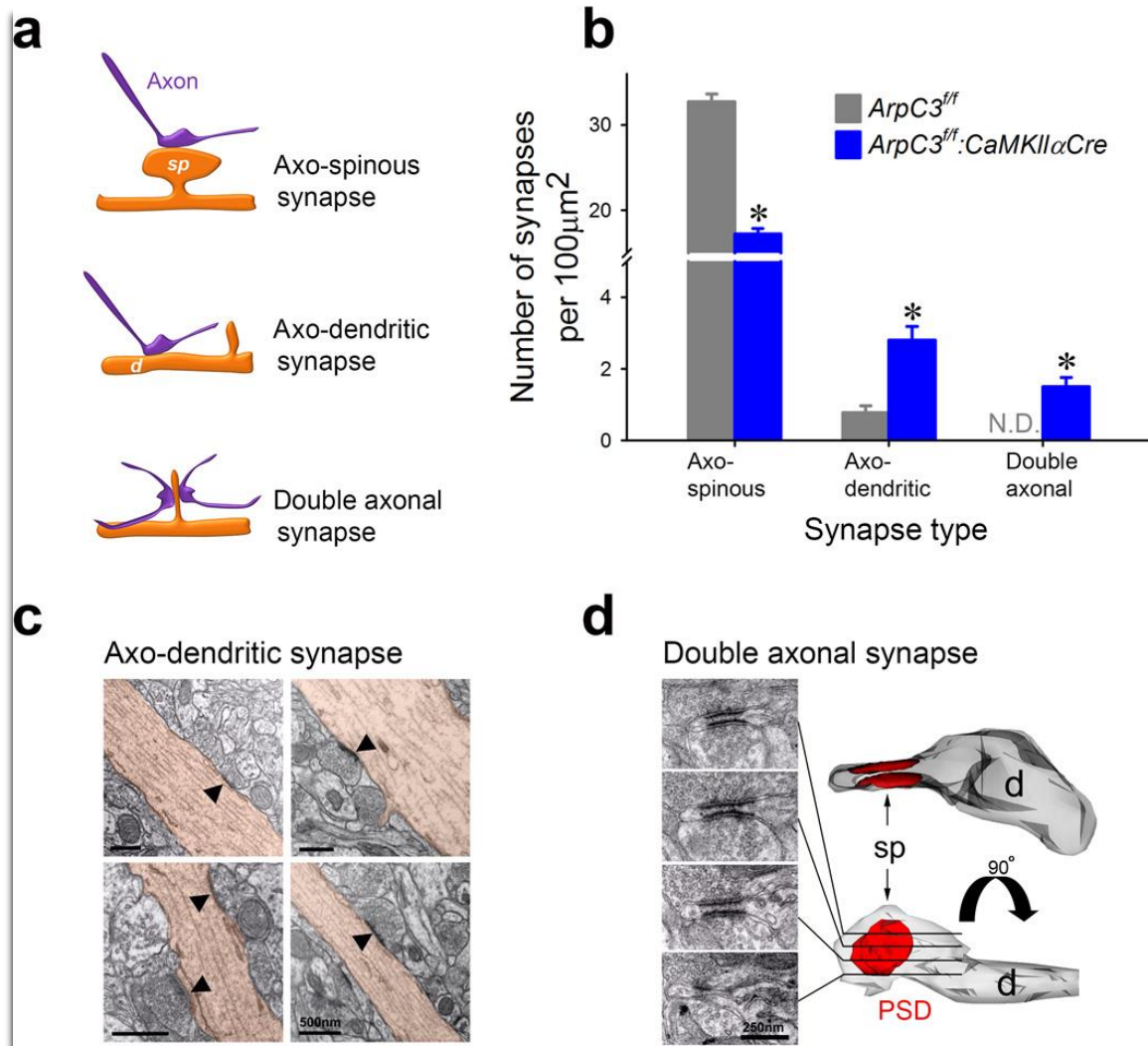
**41. ábra.** Háromdimenziós EM-rekonstrukciók hippocampális dendritekről. **A.** ArpC3f/f (kontroll, balra) és ArpC3f/f:CaMKIIα-Cre (cKO, jobbra) egerekből, amelyek reprezentatív különbségeket mutatnak az általános tüske-morfológiában és sűrűségben. A posztszinaptikus denzitás pirossal van jelölve. **B.** A tüskefej cirkularitását ábrázoló grafikon, amely a kontroll ArpC3f/f és cKO ArpC3f/f:CaMKIIα-Cre egerek elektronmikroszkópos felvételeinek kvantitatív analízisének eredményeit ábrázolja; 1,0 megfelel a tökéletes körnek. Hippokampusz (n=283 az ArpC3f/f kontroll esetében, n = 196 az ArpC3f/f:CaMKIIα-Cre esetében, \*P<0,001, a kontrolltól). Agykéreg (n=181 az ArpC3f/f kontroll esetében, n = 113 az ArpC3f/f:CaMKIIα-Cre esetében, \* P<0,01, a kontrolltól).

### *A tüskék elvesztése abnormalis szinaptikus kapcsolatokhoz vezet a frontális kéregben*

A kutatócsoportunk további vizsgálatai az Arp2/3 komplex-hiányos egerek frontális agykéregében arra a megfigyelésre vezettek, hogy a frontális kéregből a VTA/SNC-hez vezető közvetlen serkentő bemenet fokozott aktivitása megnövekedett motoros aktivitáshoz vezethet, amely emelkedett striatális dopamin szintekkel járt együtt (Kim et al., 2015). A frontális kéregben lévő piramis sejtek tüskéinek eltűnése azonban azt sugallta, hogy ezek a neuronok kevésbé gerjeszthetők a csökkent glutamáterg bemenet miatt. Ezért tovább vizsgáltuk a frontális agykérgi piramis-sejt-szinapszisok ultrastrukturális morfológiáját az Arp2/3 mutáns egerekben (**42. a. ábra**).

A véletlenszerűen kiválasztott neuropil területek transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálata megerősítette az Arp2/3 mutáns egerek II.-V. agykérgi rétegében a serkentő szinaptikus tüske-szinapszisok jelentős csökkenését (kontroll:  $32,7 \pm 0,8/100\mu\text{m}^2$ ; Arp2/3 mutáns:  $17,2 \pm 0,6/100\mu\text{m}^2$ ; **42. b. ábra**). Érdekes módon, a közvetlenül a dendritörzsekre bementet adó aszimmetrikus (serkentő) szinapszisok aránya ugyanakkor jelentősen megnőtt (több mint ötszörösére) az Arp2/3 mutáns egerekben (kontroll:  $2,4\% \pm 0,5$ ; Arp2/3 mutáns:  $13,8\% \pm 3,0$ ) (**42. b.-c. ábra**). Továbbá, az Arp2/3 mutáns egerek neuropilje jelentős hányadban tartalmazott abnormalis, rövid, széles nyakú és lapos fejű tüskéket, amelyek két, térben elkülönült axonvégződéssel álltak szinaptikus kapcsolatban; ezeket az aberrált, kettős

axonvégződésű szinapszisokat a *wt* egerekben soha nem észleltük (kontroll: 0%±0; mutáns: 12,7%±2,0; 42. b.-d. ábra).

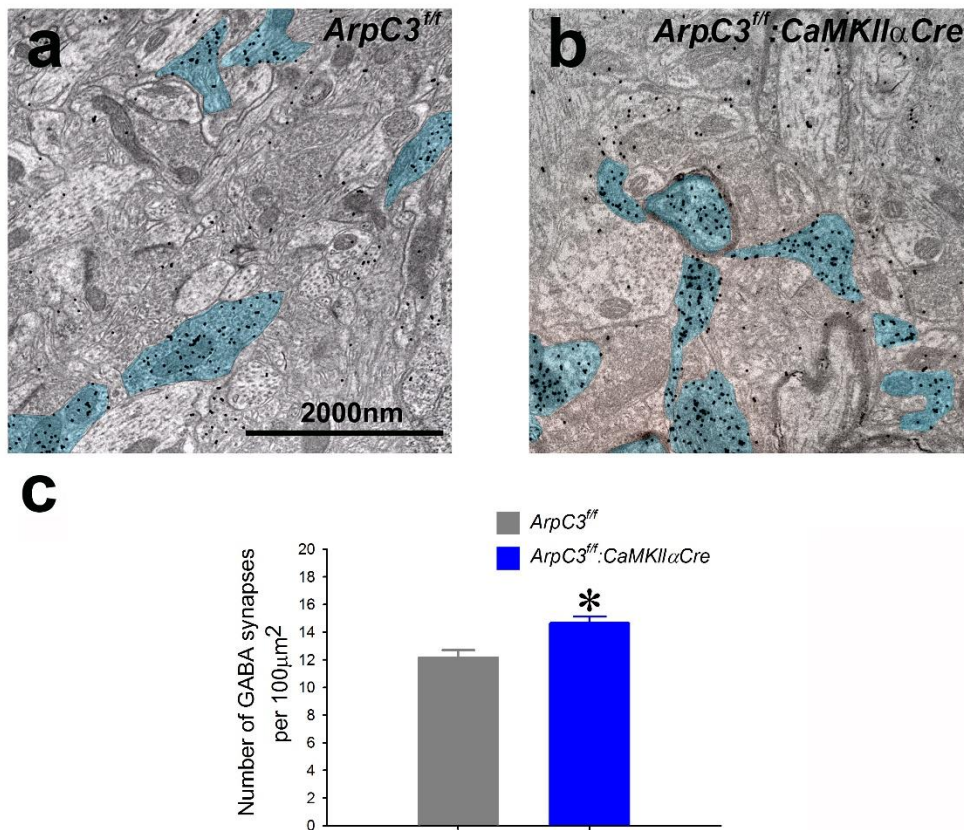


#### 42. Az Arp2/3 funkció elvesztése abnormális szinaptikus kapcsolatok kialakulásához vezet

(a) Az Arp2/3 mutáns egerekben megfigyelt aszimmetrikus szinaptikus kapcsolatok három típusát szemléltető ábra. (b) A háromféle szinapszis átlagos számát bemutató grafikon a kontroll (ArpC3<sup>ff</sup>; szürke; n=70 mikroszkópia 3 egérből) és a cKO (ArpC3<sup>ff</sup>:CaMKIIαCre; kék; n=75 mikroszkópia 3 egérből) egerekben (független t-próba, \*p<0,0001). (c) Elektronmikroszkópos felvételek az Arp2/3 mutáns egerek frontális kéregében a dendritörzsekkel (barna) közvetlen kapcsolatot létesítő aszimmetrikus szinapszisokról (nyílhegyekkel jelölve). (d) Elektronmikroszkópos sorozatmetszet felvételek (balra), amelyek egy rekonstruált kettős axonális tüskét ábrázolnak Arp2/3 mutáns egér frontális kéregében. *sp*; tüske, *d*; dendrit, *PSD*; posztszinaptikus denzitás. \*P<0,0001. N.D.= nem detektálható. Az adatok átlag ±SEM értékben vannak feltüntetve.

Ezzel szemben a GABAerg bemenet immun-EM analízise a KO egerek agyában a GABAerg szinaptikus kapcsolatok sűrűségének enyhe, de szignifikáns növekedését mutatta ki (kontroll: 12,2±0,5/100μm<sup>2</sup>; mutáns: 14,7±0,5/100μm<sup>2</sup>) a frontális kéreg hasonló területein (43. ábra). Ezek az adatok azt mutatják, hogy az Arp2/3 elvesztésének fő hatása az agykérgi neuropilben a

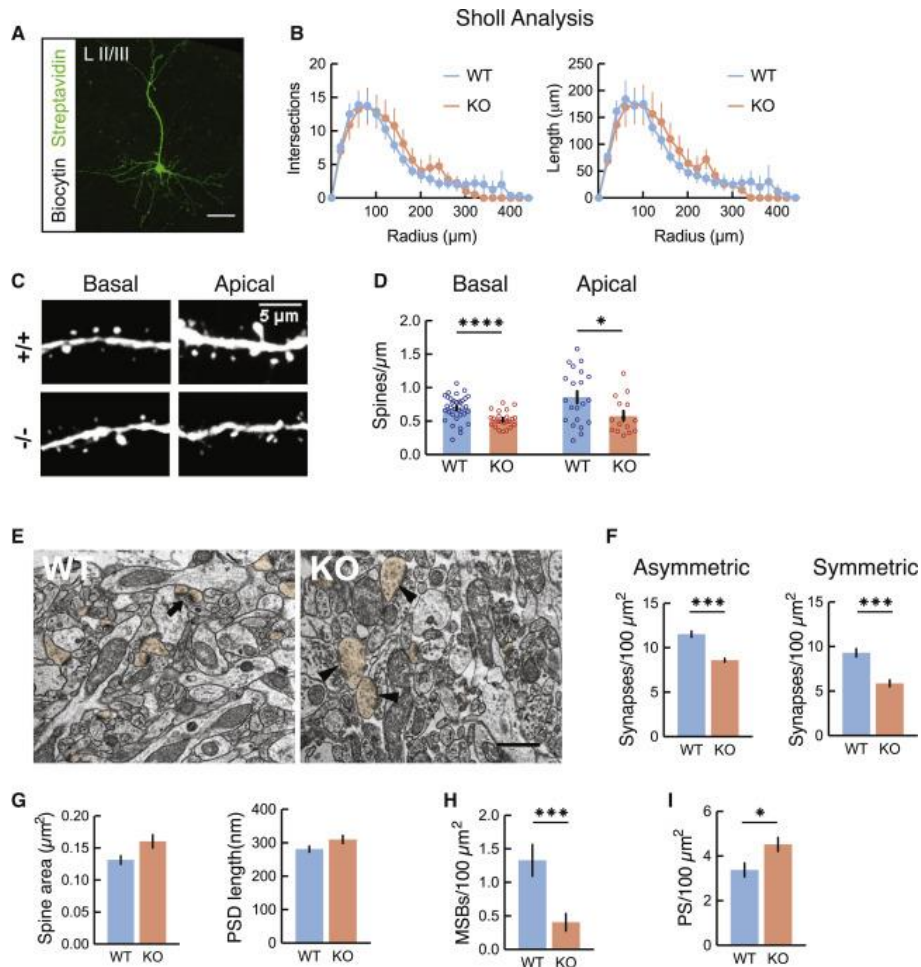
serkentő szinaptikus kapcsolatokra van, ami a normális tüske szinapszisok számának csökkenéséhez vezet. Mindazonáltal az axonális kontaktusok megmaradnak, és vagy közvetlenül a dendrit-törzsekre tolnak, vagy ha megmaradtak tüskéken, akkor többszörös szinaptikus kontaktusokat alakítottak ki.



43. ábra. Reprezentatív elektronmikroszkópos felvételek a frontális agykérgi régióból preembedding GABAerg jelölést követően (kékkel színezve) (a) *ArpC3<sup>f/f</sup>* és (b) *ArpC3<sup>f/f</sup>:CaMKII $\alpha$ Cre* egereknél. (c) A szinapszis-sűrűség kvantitatív meghatározása (n=43 felvétel 3 egérből az *ArpC3<sup>f/f</sup>* egerek esetében és n=46 felvétel 3 egérből az *ArpC3<sup>f/f</sup>:CaMKII $\alpha$ Cre* egerek esetében) (\* $P < 0,001$ , független t-próba)

## A CNTNAP2 hiány okozta szerkezeti változások

Csökkent dendrittüske sűrűség a CNTNAP2 KO egerekben



**44. ábra. Csökkent dendritikus serkentő és gátló szinapszisok CNTNAP2 KO egerekben** (A) Reprezentatív z stack vetület a biocitinnel töltött L2/3 neuronról, sztreptavidin-Alexa 488 antitesttel vizualizálva. A skálásáv 100 μm hosszúságot jelez. (B) Sholl-elemzés, amely azt mutatja, hogy a dendritek metszéspontjainak száma ( $p = 0,0632$ , 2-utas ANOVA) és hossza ( $p = 0,9315$ , 2-utas ANOVA) hasonló a CNTNAP2 wt ( $n=8$  sejt) és a KO ( $n=9$  sejt) között. (C) L2/3 Thy1-GFP+ piramis neuronok konfokális képe az mPFC-ben, reprezentatív apikális és bazális dendriteket mutatva wt és Cntnap2 KO egerekben. (D) Összefoglaló grafikonok, amelyek az átlagos tuskésűrűség számszerűsítését mutatják az apikális és bazális ágakban  $*P<0,05$ ,  $****P<0,0001$ . (E) Reprezentatív elektronmikroszkópos felvételek, amelyek az L2/3 mPFC neuropilt mutatják wt és Cntnap2 KO egerekben. A nyíl egy multiszinaptikus boutont (MSB) jelez. A nyílhegyek perforált aszimmetrikus szinapszisokat jeleznek. A túskeprofilok narancssárga színnel vannak színezve. Skálásáv: 500 nm. (F) Az aszimmetrikus és szimmetrikus szinapszisok denzitása  $****P<0,0001$ , Wilcoxon-teszt. (G) Tüske és posztzinaptikus sűrűség (PSD) területe és hossza. (H) MSB-k sűrűsége wt és KO egerek esetében;  $****P = 0,0002$ , Wilcoxon-teszt. (I) Perforált szinapszisok (PS) wt és KO egereknél;  $*P = 0,0122$ , Wilcoxon teszt. Minden hibásáv az SEM-et jelzi.

Az ismert, hogy a prefrontális kéregben mind bizonyos ASD-s betegségek esetében, mind a CNTNAP2 KO egerekben csökken a serkentő neurotranszmisszió. Kérdésünk tehát az volt, hogy az serkentő neurotranszmisszió csökkenését a szinaptikus bemenetek teljes számának csökkenése okozta-e, akár a dendrit-elágazások csökkenése, akár a tuskék sűrűségének

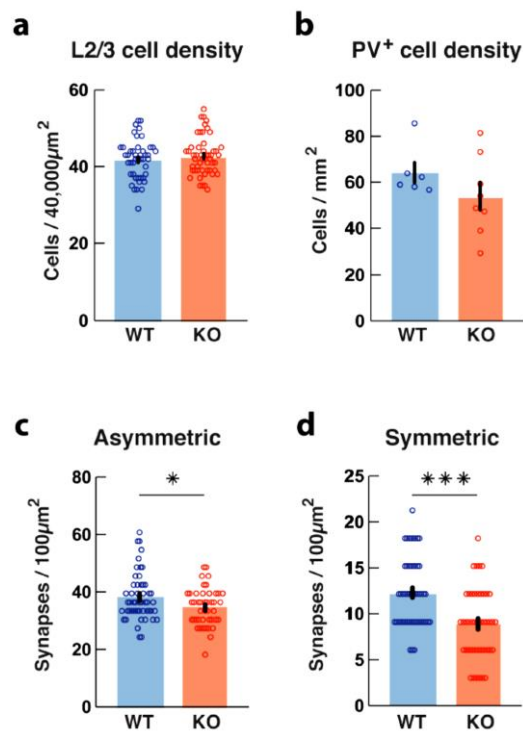


csökkenése révén. Az L2/3 piramis sejtek 3D-s anatómiai rekonstrukcióit úgy végeztük el, hogy az *in vitro* szeletfelvételi kísérletek során a sejteket biocitinnel töltöttük fel, és konfokális mikroszkópiával képeket készítettünk róluk. A Sholl-elemzés nem mutatott ki jelentős változásokat a teljes dendritikus hosszban, a dendritikus elágazások teljes számában vagy a dendritikus komplexitásban (**44. A.-B. ábra**), ami arra utal, hogy a CNTNAP2 KO egerek L2/3 piramis neuronjai normális dendritikus arborizációval rendelkeznek. Ezenkívül a neuronális sejttestek sűrűsége az L2/3-ban és az immunjelölt PV+ neuronok sűrűsége a prelimbikus kéregben hasonló volt a CNTNAP2 KO egerekben és a kontrollokban is.

Annak meghatározására, hogy vajon a CNTNAP2 KO neuronokon a dendrittüskék denzitása csökken-e, homozigóta CNTNAP2 KO (vagy *wt*) egereket kereszteztünk Thy1-GFP egerekkel, amelyek GFP-t expresszálnak az agykérgi piramis sejtek egy al csoportjában, többek között a L2/3 mPFC piramis sejteket is. A dendrit-tüskék számszerűsítése ezekben a sejtekben azt mutatta, hogy a KO egerek L2/3 piramis sejtjei mind a bazális, mind az apikális dendritikus tüskék sűrűségének jelentős csökkenését mutatják (apikális (*wt*:  $0,86 \pm 0,09$  tüske/ $\mu\text{m}$ ,  $n=21$  dendrit; KO:  $0,57 \pm 0,07$  tüske/ $\mu\text{m}$ ,  $n=15$  dendrit) és bazális ágakban (*wt*:  $0,70 \pm 0,03$  tüske/ $\mu\text{m}$ ,  $n=34$  dendrit; KO:  $0,52 \pm 0,02$ ,  $n=24$  dendrit;  $P < 0,05$ , párosítás nélküli t-próba;  $P < 0,0001$ , Welch's t-próba; **44. C.-D ábra**), ami a funkcionális szinaptikus bemenetek csökkenése mögött állhat, amelyet az elektrofiziológiai kísérletekben is megfigyeltek.

E hipotézis további validálása érdekében elektronmikroszkópiával vizsgáltuk az L2/3 mPFC dendrittüskéket és szinaptikus kontaktusokat *wt* ( $n=3$ ) és CNTNAP2 KO egerekben ( $n=3$ ) (**44. E. ábra**). Korábbi eredményeinkkel összhangban mind az aszimmetrikus (serkentő), mind a szimmetrikus (gátló) szinapszisok számának jelentős (~25%) csökkenését figyeltük meg a KO egerekben (*aszimmetrikus* (serkentő szinapszisok); *wt*:  $11,53 \pm 0,35$  szinapszis/ $100 \mu\text{m}^2$ ,  $n=80$  mező; KO:  $8,59 \pm 0,21$  szinapszis/ $100 \mu\text{m}^2$ ,  $n=90$  mező; 3 egér genotípusonként;  $P < 0,0001$ , Wilcoxon-teszt; és *szimmetrikus* (gátló szinapszisok); *wt*:  $9,30 \pm 0,46$  szinapszis/ $100 \mu\text{m}^2$ ,  $n=80$  mező; KO:  $5,87 \pm 0,38$  szinapszis/ $100 \mu\text{m}^2$ ,  $n=90$  mező;  $P < 0,0001$ , Wilcoxon-teszt; **44. F. ábra**). Érdekes módon nem találtunk szignifikáns változásokat a tüskeprofilok területében vagy a szinapszisok hosszában a KO egerekben (PSD területe (*wt*:  $0,1313 \pm 0,006 \mu\text{m}^2$ ,  $n=257$  tüske; KO:  $0,1604 \pm 0,010 \mu\text{m}^2$ ,  $n=187$  tüske;  $P=0,1142$ , Wilcoxon-teszt; PSD hossza (*wt*:  $281,10 \pm 8,89$  nm,  $n=257$  tüske; KO:  $309,90 \pm 11,83$  nm,  $n=187$  tüske;  $P=0,0709$  Wilcoxon-teszt; **44. G. ábra**). A CNTNAP2 KO egereknél azonban jelentősen csökkent a multiszinaptikus boutonok (MSB-k)

sűrűsége (wt  $1,33 \pm 0,23$  MSB/100  $\mu\text{m}^2$ , n=80 mező) és KO ( $0,41 \pm 0,13$  MSB/100  $\mu\text{m}^2$ , n=90 mező)  $P=0,0002$ , Wilcoxon-teszt; **44. H. ábra**), ami a szinaptogenezis egyik markere (Toni et al., 1999). A perforált szinapszisok számának növekedésére is felfigyeltünk ezekben az egerekben ( $3,38 \pm 0,31$  PS/100  $\mu\text{m}^2$ , n=90 mező) és KO ( $4,52 \pm 0,31$  PS/100  $\mu\text{m}^2$ , n=80 mező);  $P = 0,0122$ , Wilcoxon teszt; **44. I. ábra**), amelyek fokozott szinaptikus „turnoverhez” társulnak (Sorra et al., 1998, Calverley and Jones, 1990), ami alátámasztja a CNTNAP2 KO egerekben a dendrittüskék fokozott turnover-éről szóló korábbi eredményeket (Gdalyahu et al., 2015).



**45. ábra.** A *Cntnap2* KO egerek változatlan L2/3 neuronális sejtsűrűséget és PV+ neuronsűrűséget mutatnak, de csökkent aszimmetrikus (serkentő) és szimmetrikus (gátló) szinapszis-sűrűséggel rendelkeznek a prelimbikus mPFC L1-ben. **a.** Prelimbikus mPFC L2/3 neuronális sűrűség a sejtmagok számolásával mérve n=52 (WT) és n=45 (KO) n=3 (WT) és n=3 (KO) egérből származó toluidinkékkel festett vékony metszetekben ( $P=0,36$ ). **b.** Prelimbikus PV+ neuronsűrűség, az immunjelölt PV+ neuronok számlálásával mérve n=6 (WT) és n=8 (KO) metszetekben, n=4 (WT) és n=4 (KO) egerekből ( $P=0,23$ ). **c-d.** Az aszimmetrikus (serkentő: WT  $38,26 \pm 1,14$  szinapszis/100  $\mu\text{m}^2$ , n=52 mező; KO  $34,63 \pm 0,98$  szinapszis/100  $\mu\text{m}^2$ , n=45 mező; 3 egér genotípusonként; \* $P= 0,019$ , párosítatlan t-próba) és szimmetrikus szinapszisok (feltételezett gátló: WT  $12,33 \pm 0,52$  szinapszis/100  $\mu\text{m}^2$ , n=52 mező; KO  $8,91 \pm 0,58$  szinapszis/100  $\mu\text{m}^2$ , n=44 mező; \*\*\* $P < 0,0001$ , párosítatlan t-próba).

Annak meghatározására, hogy a CNTNAP2 elvesztése hogyan változtatja meg a szinaptikus bemeneteket az serkentő neuronok disztális apikális dendritágain, az L1-ben

aszimmetrikus (feltételezett serkentő) és szimmetrikus (feltételezett gátló) szinapszisokat is megszámoltuk. A Cntnap2 KO egerek a kontrollhoz képest jelentősen csökkent aszimmetrikus és szimmetrikus szinapszisok számát mutatták az L1-ben, ami a disztális dendritikus serkentés és gátlás károsodására utal ezekben az állatokban (**45. ábra**). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a CNTNAP2 elvesztése jelentős hibákat okoz mind a gátló, mind a serkentő szinaptikus kapcsolatok sűrűségben, valamint a szinapszisok plaszticitásának és stabilitásának jellemző markereinek változásához vezet.

## Táplálék-bevitel csökkentés okozta szinaptikus változások

### *Az állatok testtömegének változása táplálékbevitel csökkentés során*

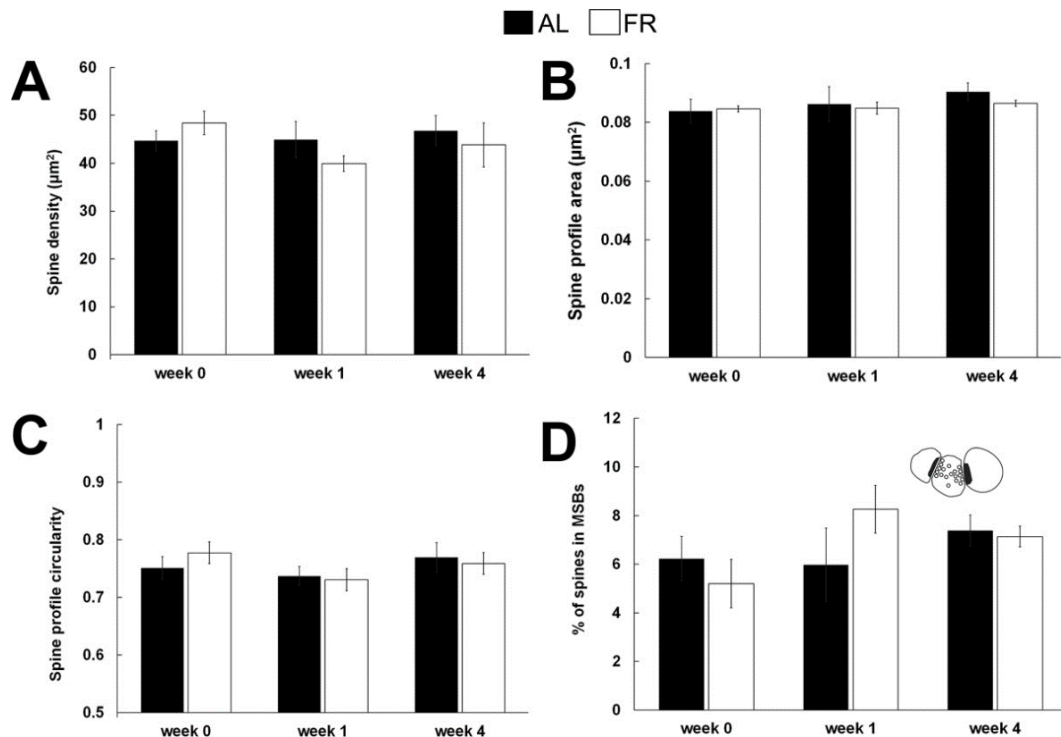
A kísérleti patkányok testtömege mind az *ad libitum* (AL), mind a táplálékbevitel csökkentett (FR) csoportban nőtt a kísérlet teljes időtartama alatt. Az állatok kezdeti átlagos testsúlya AL:196,3±1,1g, FR:197,4±1,0g volt ( $P>0,40$ ). A kezdeti héten az AL és FR csoportban az állatok *ad libitum* táplálékot kaptak. Ennek az időnek a végére a testtömegük ~25%-kal nőtt (AL: 247,6±2,9 vs. FR:249,4±2,8g;  $P>0,36$ ). Egy hét csökkentett táplálkozás után (1. hét) az FR patkányok testtömege nem nőtt tovább (242,3±3,1g, n=12). Az AL-patkányok azonban a kezdeti testsúlyuk ~50%-át növelték (293,8±8, g;  $P<0,001$ ; n=12). Az FR csoport testsúlya az első korlátozott hét után kezdett el nőni, de sokkal lassabb ütemben. A kísérlet teljes 4 hete alatt az FR patkányok átlagosan alacsonyabb súlyúak voltak, mint az AL patkányok (AL: 408,2±5,9 vs. FR: 301,7±2,1g;  $P>0,001$ ), ahogyan az várható volt.

### *A táplálékkorlátozás hatása a CA1 neuronokra és szinapszisokra*

Először azt vizsgáltuk meg, hogy az FR hatással van-e a hippocampusz neuronjainak számára ill. sűrűségére (**4. B. ábra** - *Anyag és módszer fejezet*). Nem találtunk szignifikáns különbségeket a csoportok között a piramissejtek sűrűségében a teljes kísérleti időszak alatt; így a táplálékbevitel rövid távú változásai nem befolyásolták a CA1 hippocampusz neuronjainak sűrűségét. Ezután megvizsgáltuk a CA1 stratum radiatumban lévő neuropil ultrastruktúráját a FR táplálkozás megkezdése előtt (**4. C. ábra**). Ezen a kezdeti héten (0. hét) nem találtunk egyértelmű különbségeket az általunk vizsgált jellemzők között (ahogyan az várható volt, mivel mindkét csoportot addig a pontig *ad libitum* tápláltuk).

A táplálékkorlátozás következtében a CA1 neuropilen belüli lehetséges változások feltárása érdekében elemeztük és összehasonlítottuk a CA1 hippocampusz különböző szinaptikus jellemzőit 1 hét és 4 hét FR-táplálás után. Egyik időpontban sem találtunk szignifikáns változást a posztzinaptikus tüskék sűrűségében (**46. A. ábra**), a tüskeprofilok átlagos területében (**46. B. ábra**) vagy a tüskeprofilok átlagos cirkularitásában (**46. C. ábra**). Hasonlóképpen, a multiszinaptikus boutonok (MSB-k) sűrűsége nem különbözött szignifikánsan sem az egyhetes FR után (1. hét), sem a kísérleti időszak végén (4. hét; **46. D. ábra**). A lehetséges hatások további hatásainak feltárása érdekében a tüske profilokat méretük szerint analizáltuk, és

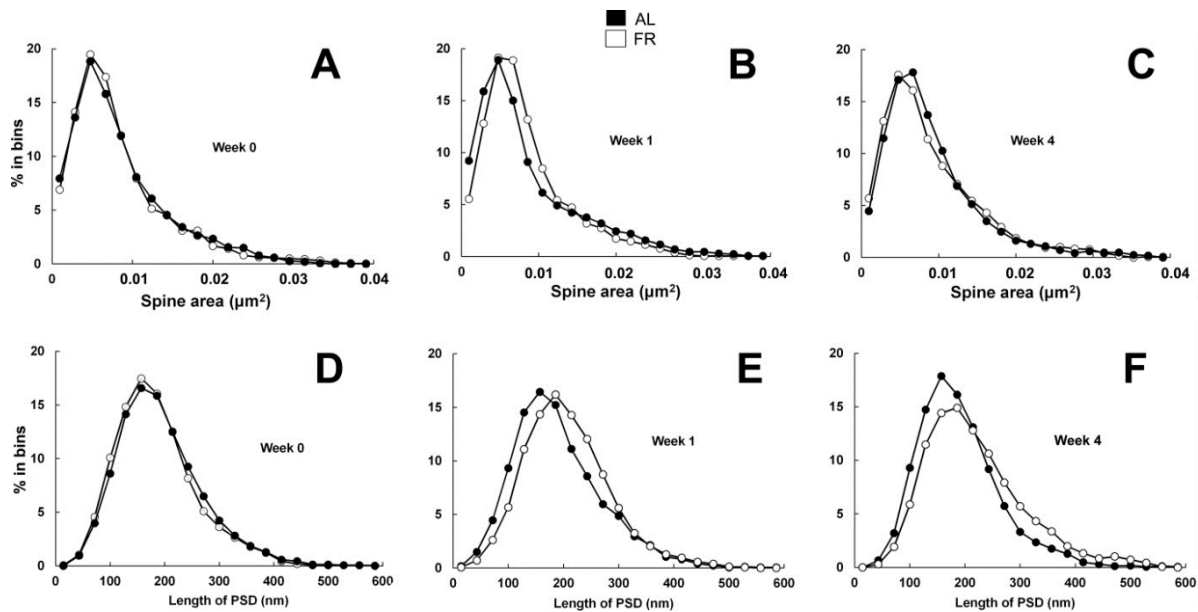
nem találtunk nyilvánvaló különbséget a méreteloszlásukban az étrend vagy a FR időtartamának hatására (47. A-C. ábra).



46. ábra. A négy olyan szinaptikus tulajdonság kvantitatív meghatározását bemutató grafikon, amelyek nem változtak az FR étrend hatására. **A.** Nincs szignifikáns különbség az AL és FR csoportok között a tüskék sűrűségében a kísérlet 4. hetében. **B.** Nem észleltünk különbséget sem az átlagos tüske-profil területben, sem **C.** a tüske-profilok cirkularitásában az FR-táplálás során. **D.** Bár eltérések mutatkoznak, a statisztikai elemzés nem mutatott egyértelmű különbséget a CA1 hippocampuson belüli MSB-sűrűség között a táplálékkorlátozott és. normál táplálású állatok között.

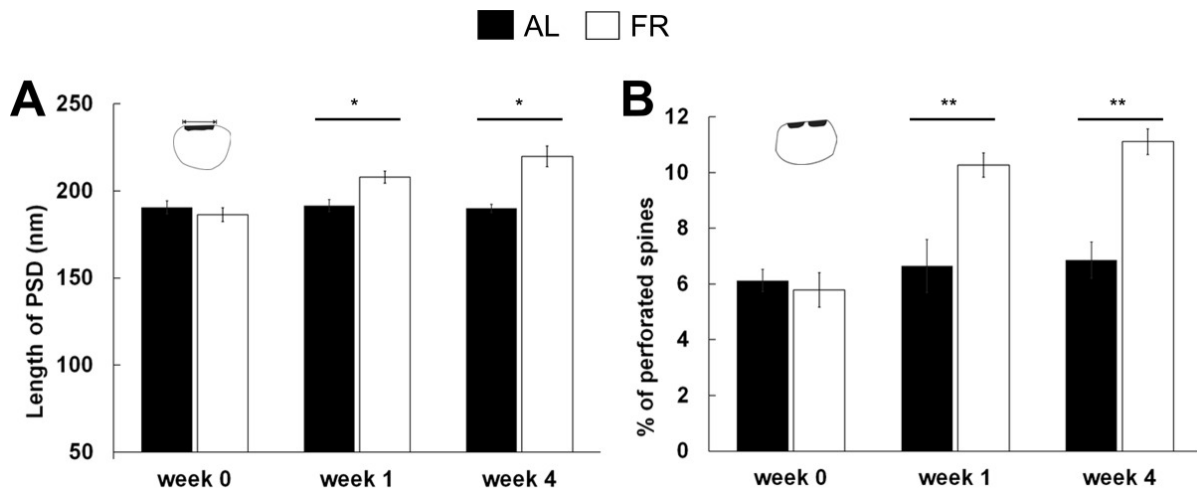
Az FR táplálás bizonyítottan fokozza a szinaptikus átvitelt a hippocampusban (Adams et al., 2008, Fontan-Lozano et al., 2007); ezért a CA1 szinapszisok szerkezeti jellemzőit is elemeztük, beleértve a PSD méretét és komplexitását. Az tüskeszinapszisokra összpontosítva megmértük a PSD-k hosszát minden tüskeprofilban (47. ábra). A posztzinaptikus denzitás átlagos hosszának szignifikáns és progresszív növekedését figyeltük meg az FR csoportban: az FR kezdetén (0. hét) nem volt különbség a PSD-k átlagos hossza között a csoportok között (AL:  $190,6 \pm 3,7$  vs. FR:  $186,3 \pm 4,0$ nm;  $P > 0,9$ ), de már egy hét FR diéta után az állatoknak átlagosan hosszabb PSD-k voltak, mint az AL kontrolloknál (AL:  $191,6 \pm 3,4$  vs. FR:  $207,9 \pm 3,5$ nm;  $P < 0,01$ ); a PSD hosszának növekedése négy hét után még kifejezettebbé vált (AL:  $189,9 \pm 2,3$  vs. FR:  $219,8 \pm 6,0$ nm;  $P < 0,01$ ; lásd még 48. A. ábra). A PSD hossza a hippocampusz LTP indukcióját követően tudományos megfigyelések szerint nő, ami a szinaptikus komplexitás növekedésével jár. Ez arra készítetett

minket, hogy megvizsgáljuk, vajon az FR állatok tüskéi nagyobb arányban tartalmaznak-e perforált szinapszisokat. Ennek megfelelően megvizsgáltuk a perforált szinapszisokkal rendelkező tüskék arányát (**48. B. ábra**). A 0. héten nem volt különbség a perforált tüskeprofilok arányában (AL:  $6,1 \pm 0,4$  vs. FR:  $5,8 \pm 0,6\%$ ;  $P > 0,8$ ); az ilyen szinapszisok aránya már az első FR héten jelentősen megnőtt (AL:  $6,6 \pm 1,0$  vs. FR:  $10,3 \pm 0,4\%$ ;  $P < 0,01$ ), és a kísérlet végén is magasabb maradt (AL:  $6,9 \pm 0,6$  vs. FR:  $11,1 \pm 0,5\%$ ;  $P < 0,01$ ).



**47. ábra.** A tüske méretének és PSD hosszának jellemzői. **A-C:** A különböző méretű tüskék eloszlása nem mutatott szignifikáns különbségeket a 4 hét alatt. **D-F:** Ezzel szemben a PSD-k átlagos hossza a FR következtében magasabb értékek felé tolódott el.

Részletesebben megvizsgálva a PSD méretek eloszlását a tüskék között, azt találtuk, hogy egy hetes FR táplálás után a 150-250 nm-es tartományba eső PSD-k aránya magasabb volt, mint az AL csoportban (**47. E. ábra**), míg 4 hetes FR táplálás a 250 nm-nél hosszabb PSD-k növekedéséhez vezetett (**47. F. ábra**), miközben kevesebb PSD volt a 150-250 nm-es tartományban. Összefoglalva, sem a tüskék mérete, sűrűsége, alakja, sem a kapcsolatok komplexitása (amint azt az MSB-k sűrűsége mutatja) nem változott jelentősen a 4 hetes FR-táplálás során a normál táplálású állatokhoz képest, de a PSD-k mérete és morfológiai komplexitása egyaránt nőtt.

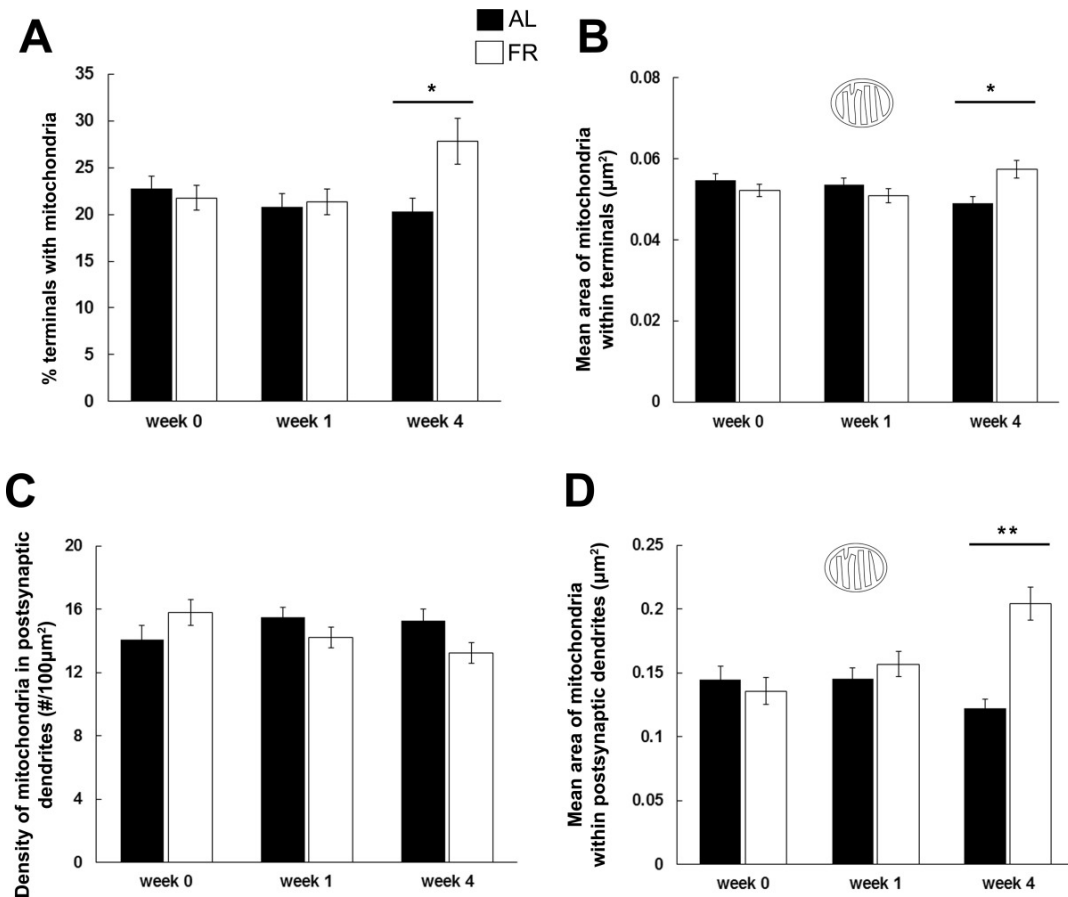


48. ábra. A PSD méretének és összetettségének változását bemutató grafikonok. A. A poszt-szinaptikus denzitás átlagos hossza a tüskeszínapszisok szinaptikus felületének hosszának progresszív növekedését mutatja az AL és FR csoportok között. B. A perforált PSD-vel rendelkező tüskék százalékos aránya a CA1 tüskék között. A grafikonok a komplex/perforált PSD-k számának szignifikáns növekedését mutatják. (\* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ ).

### *Az táplálékbevitel-csökkentés hatása a CA1 neuropil mitokondriumaira*

Kíváncsiak voltunk, hogy a táplálékbevitel csökkentés befolyásolhatja-e a mitokondriumok sűrűségét vagy méretét a neuropilben. Azonosítottuk és megszámláltuk a mitokondriumokat (ugyanazokat az elektronmikroszkópos felvételeket használva, mint a szinaptikus elemzéshez), hogy megbecsüljük ezen organellek átlagos sűrűségét, valamint átlagos területüket. Mivel a mitokondriális paraméterek a metabolikus milió azonos változásai mellett ellentétes irányba is elmozdulhatnak (Cheng et al., 2010), külön elemeztük az axonvégződéseken és a poszt-szinaptikus profilokban lévő mitokondriumokat. A CA1 radiatumban lévő dendrit tüskékben általában nincsenek a mitokondriumok, és a mintánkban sem találtunk egyet sem, ezért a poszt-szinaptikus változások mérőszámaként a dendrit-törzsekben lévő mitokondriumokat vizsgáltuk. Először is meghatároztuk, hogy az axonális boutonok mekkora hányada tartalmaz mitokondriumokat, és hogy az FR hatással van-e a mitokondriumok sűrűségére ezekben a profilokban. Az axonális boutonokat szinaptikusnak minősítettük, ha volt poszt-szinaptikus partnerük, illetve nem-szinaptikus boutonoknak, ha egy klaszterben ötnél több vezikulát tartalmaztak, de a metszet síkjában nem volt látható poszt-szinaptikus partnerük. Mindkét bouton-típust bevontuk az elemzésünkbe. A kezdeti és az első héten nem láttunk különbséget a mitokondriumtartalomban az AL és FR csoportok között, de a 4. hét végén a mitokondriumokat tartalmazó boutonok szignifikáns növekedését láttuk az FR csoportban (49.

A. ábra; AL: 20,316%±1,46% vs. FR: 27,835%±2,44%; P<0,05). A 4 hetes táplálékkorlátozás után nem csak több mitokondriumot tartalmazó terminális volt, de ezek szignifikánsan nagyobbak is voltak, mint az AL csoportban (47. B. ábra; P<0,05).



49. ábra. A mitokondriumok mennyiségi elemzése a CA1 stratum radiatumban AL és FR patkányokban. A: Nincs szignifikáns különbség az AL és FR csoportok között a kezdeti (0. hét) és az FR első hetében (1. hét) a mitokondriumokat tartalmazó boutonok számában; azonban a kísérlet végére a mitokondriumokat tartalmazó terminálisok száma jelentősen megnőtt (4. hét; P<0,05). B: Csak a 4. hét végén észleltük a mitokondriumok területének szignifikáns növekedését az boutonokban (P<0,05). C: Bár eltéréseket mutatott, a statisztikai elemzés nem mutatott egyértelmű különbséget a mitokondriumok sűrűségében a poszt-szinaptikus piramidendritekben egyik kísérleti csoportban sem (P>0,14). D: A kísérlet végére (4. hét) csak az FR csoportban nőtt szignifikánsan a mitokondriumok átlagos mérete a dendritekben (P<0,01).

Ezután elemeztük a mitokondriumokat a piramis sejtek apikális dendritjeiben. Azt találtuk, hogy a dendritekben található mitokondriális profilok sűrűsége nem különbözik szignifikánsan egyik kísérleti csoport esetében sem (49. C. ábra; P>0,143). Míg azonban az AL csoportban a mitokondriális profilok átlagos területe hasonló volt a kísérlet teljes időtartamában (49. D. ábra; P>0,5), az FR csoportban a 4. hétre a mitokondriális profilok átlagos területének nyilvánvaló és



szignifikáns növekedését észleltük (**49. D. ábra**; AL:  $0,122 \pm 0,007$  vs. FR  $0,204 \pm 0,01 \mu\text{m}^2$ ;  $P > 0,01$ ). Arra a következtetésre jutottunk, hogy a rövid távú FR nem volt hatással a mitokondriumok sűrűségére a hippocampusz CA1 stratum radiatumában; azonban ezen organelumok átlagos mérete megnőtt mind a posztszinaptikus dendritekben, mind az axonális boutonokban. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a négy hetes táplálékkorlátozás jelentős hatással lehet a hippocampusz anyagcseréjére.

## Megvitatás és Következtetések

---

### Endocitótikus zóna jelentősége a tuskoszínapszisokban

Az tuskékben található endocitótikus fehérjék vizsgálatainak az eredményei azt mutatják, hogy ezen fehérjék a színapszistól laterálisan koncentrálnak, ami a túske membrán jellegzetes, tangencionális szerveződésére utal.

Korábbi munkák olyan fehérjéket dokumentáltak, amelyek a PSD mellett koncentrálnak (He et al., 2000, Baude et al., 1993), és lamináris molekuláris szerkezetet mutattak ki a PSD-n belül (Valtschanoff and Weinberg, 2001). Az itt bemutatott laterálisan leírt molekuláris architektúra új dimenzióval bővíti a tuskoszínapszis szerveződésének megértését, ami a laterális domének endocitózisban betöltött szerepére utal. Vizsgálataink közvetlen bizonyítékot szolgáltatnak arra, hogy az endocitótikus fehérjék a tuskén belül még vizuálisan beazonosítható burkos vezikulák hiányában is magas szervezettséget mutatnak. Feltételezésünk szerint ez a szerveződés hozzájárul a gyorsabb és hatékonyabb endocitótikus folyamatokhoz. Eredményeink arra utalnak, hogy az érett dendrit-tuskék egy endocitótikus „gépezetet” tartanak fenn.

A túske nem szinaptikus régiói a fehérjék, például a neurotranszmitter-receptorok transzportjának közvetítésével vagy a túske membránjának átalakításával (Toni et al., 2001) közvetlenül befolyásolhatják a színapszisok erősségét és morfológiáját (Ashby et al., 2006). Az endocitótikus fehérjék laterális doménekbe történő lokalizációja a receptor internalizáció kétlépcsős folyamatára utal: a PSD-ből való leválást követően az endocitótikus zónába történő laterális mozgás. A receptorok a PSD-ban koncentrálnak; azon kívül a membránban nagymértékben mobilizálódnak (Triller and Choquet, 2005). Az AP-2, a clathrin és a dynamin általunk megfigyelt szekvenciális térbeli szerveződése arra utal, hogy az adaptorok kötődése még azelőtt bekövetkezik, hogy a receptorok az endocitózis helyére vándorolnak. A nagyobb tuskék több AMPA-receptort tartalmaznak, és több preszinaptikus vezikulát tartalmazó terminálisokkal hoznak létre szinaptikus kapcsolatot (Nusser et al., 1998, Takumi et al., 1999, Sorra and Harris, 2000). Adataink azt mutatják, hogy a színapszistól távoli laterális endocitótikus zónák is változnak a túske méretével. Azt feltételezzük, hogy a tuskék egymással kölcsönhatásban lévő funkcionális területek (domének) összekapcsolt rendszereit tartalmazzák, amelyek a túske növekedése és a morfológiai plaszticitás során koordináltan skálázódnak.

### *Az endocitotikus „gépezet” kölcsönhatása a PSD-al*

Az AMPA receptorok endocitózisa és endoszomális újrahasonosítása szabályozza az serkentő szinaptikus transzmissziót (Derkach et al., 2007). Ahogyan azt mi is kimutattuk, a posztzinaptikus „cargo” endocitózisa a PSD mellett laterálisan elhelyezkedő endocitotikus zónában történik, amely egy jól meghatározott, clathrinban gazdag terület (Blanpied et al., 2002, Racz et al., 2004). De nem volt egyértelmű, hogy ez az endocitotikus gépezet hogyan válik stabilan pozícionálttá. Kimutattuk, hogy ezt az egymáshoz illeszkedő térbeli elrendeződést a posztzinaptikus adaptor fehérje Homer és a nagy GTPáz dynamin-3 közötti fizikai kölcsönhatás közvetíti. A Dyn3-Homer komplex igen alkalmas arra, hogy az endocitotikus apparátust a PSD-hez kapcsolja, mivel a Homer a PSD központi állványzatát alkotó Shank-hez is kötődik, míg a dynamin-3 oligomerizálódik önmagával és a dynamin-2-vel is, és így kötődik az aktin alapú endocitotikus adaptorokkal (Gray et al., 2005b). A Shank a PSD legmélyebb, citoplazmatikus oldalára lokalizálódik (Valtschanoff and Weinberg, 2001), és helikális szálakból álló nagyméretű lapszerű struktúrákat hoz létre (Baron et al., 2006). Másrészt a dynamin-ek képesek kiterjedt aktinhálózatot szervezni (Kruchten and McNiven, 2006, Schafer, 2004), és homo- vagy hetero-oligomerizálódva, egymásra rakódó gyűrűs szerkezeteket is képesek kialakítani (Okamoto et al., 1999). Így a Shank és a dynamin kiterjesztett oligomer struktúrái, amelyeket multimerizált Homer köt össze (Hayashi et al., 2006, Praefcke and McMahon, 2004), hidat képezhetnek a PSD és az EZ között.

Eredményeink továbbá arra is utalnak, hogy a posztzinaptikus membránt szervező fehérje kölcsönhatások laterálisan kiterjednek a túske-membrán mentén. Mind a Shank, mind a Homer a PSD-ben koncentrálódik, egy olyan membrán alrégióban, amely a túske plazmamembránjának csak ~15%-át teszi ki. A PSD-n túl a laterális túske-membrán nagyrészt „terra incognita” marad. Ultrastukturális eredményeink szerint a Homer kötőpartnere, a dynamin-3 a laterális túske membránjára lokalizálódik, és eloszlása kiterjed a PSD-re és az EZ-re is. Továbbá, a Dyn3-Homer kölcsönhatás szelektív megszakítása vagy az endogén dynamin-3 kiütése az EZ fizikai elvesztéséhez vezet a laterális túske doménekből (Lu et al., 2007). A Homer-Shank szerkezeti fehérjékből kiinduló fehérje-kölcsönhatások a túske perifériáján vagy távolabbi "területein" a membránszerveződés általános feltételei lehetnek és elképzelhető, hogy hozzájárulhatnak más membránfehérjék hozzáadásához vagy eltávolításához, laterálisan a PSD széleitől. Mindenesetre a legújabb, szuperrezolúciós mikroszkópiás eredmények

messzemenőig megerősítik azt, hogy az általunk elektronmikroszkóposan leírt posztzinaptikus endocitotikus zóna egy specializált és egyedi clathrin-domén, amely az endocitotikus fehérjék meghatározott résztvevőit differenciáltan tartalmazza, nano-szinten szervezett és a szinaptikus aktivitás hatására átrendeződik (Catsburg et al., 2022).

### *A túske-specifikus endocitózis jelentősége*

Bár a posztzinaptikus membránforgalom a szinapszisok kialakulásának és módosulásának központi mechanizmusa, a dendrittüskék erősen kompartmentált forgalmának sejtszintű gépezetéről még mindig hiányosak az ismereteink. Kimutattuk, hogy a PSD és a túske endocitotikus gépezete közötti fizikai kapcsolat biztosítja a lokalizált endocitotikus „forgalmat”. Az ilyen lokalizált transzport-forgalom egyik következménye az lenne, hogy "fókuszálná" vagy korlátozná azt a membránterületet, amelyen az endocitotikus újrahasznosítás megtörténhet, lehetővé téve a membránösszetétel lokális és dinamikus szabályozását dendrittüskénként. A PSD közelében lévő EZ hatékony és gyors internalizációt biztosíthat a közeli szinaptikus komponensek számára, ami a túske felszínén megjelenő faktorok gyors szabályozását kínálja. Továbbá az EZ segíthet fenntartani egy adott túske molekuláris összetételét azáltal, hogy megakadályozza a membránkomponensek diffúzióját a szomszédos szinapszisokba. A PSD melletti, dinamikus EZ jelenléte, valamint a membránfehérjék korlátozott diffúziója a túskefejből, hatékonyan és szelektíven szabályozhatja egy adott szinapszis molekuláris összetevőit, ami magyarázhatja azt a jelenséget, hogy az egyes tüskék képesek egyedi és tartós molekuláris identitást fenntartani. Egy ilyen mechanizmus általános paradigmát nyújthat a sejtmembrán-összetétel nanométeres léptékű lokális szabályozására.

## Az aktin-szabályozó fehérjék mikrodoménekbe szerveződnek

### Cofilin

#### *Cofilin a dendritekben*

A dendritágakon, dendrittörzseken belül kis foltokba rendeződött, bőséges cofilin jelölést figyeltünk meg. Bár e jelölés egy része valószínűleg transzportcsomagokat jelent, a cofilin szerepet játszik a dendritek morfogenezisében, legalábbis *in vitro* neuronokban (Lee-Hoeflich és mtsai., 2004). A dendritek a felnőtt agyban (amelynek citoszkeletonját a mikrotubulusok uralják) meglehetősen stabilak, de a dendrittörzsekből még felnőtt korban is gyorsan új tüskék keletkezhetnek (Terry-Lorenzo et al., 2005, Trachtenberg et al., 2002, Engert and Bonhoeffer, 1999, Zuo et al., 2005), ami arra utal, hogy a dendriteknek fenn kell tartaniuk az aktin remodelling képességét. A jelen strukturális/morfológiai adatok arra utalnak, hogy a cofilin közvetlen szerepet játszhat a dendriteken belüli lokális aktin remodellingben.

#### *A tüske mátrix duális szerveződése*

A PSD-n kívül a tüskék tartalmazhatnak tüske-apparátust és simafelszínű endoplazmatikus retikulumot, de mindkét struktúra ritka a rágcsálók CA1 hippokampuszából származó tüskékben (Cooney et al., 2002). A tüskék az aktin filamentumok heterogén populációját tartalmazzák. A tüskeváz duális szerveződését feltételező hipotézis (*two-pool hypothesis*) szerint a tüskefej központja jelenti a tüske szerkezeti magját, ahol az F-aktin viszonylag stabil, míg a perifériáján lévő sokkal dinamikusabb F-aktin közvetíti az aktivitás hatására megfigyelhető gyors alakváltozásokat (Halpain, 2000, Roelandse et al., 2003). Mivel a cofilin kulcsszerepet játszik az aktin filamentumok újra-rendezésében (Bamburg, 1999), a dinamikus aktin valószínűleg a tüske cofilinben gazdag doménjeihez társul. Ezzel a hipotézissel összhangban a cortactin és a profilin, amelyek mindketten az F-aktin stabilizálásának irányába hatnak, a tüske központi részében, magjában koncentrálódnak (Racz and Weinberg, 2004, Neuhoff et al., 2005), míg eredményeink azt mutatják, hogy a cofilin ehelyett a tüske héjában található. Ezek az adatok együttesen az aktin szabályozó fehérjék figyelemre méltó térbeli elkülönülését mutatják.

#### *Cofilin és aktivitásfüggő tüske-plaszticitás*

A tartós hatásnövekedést (LTP) kiváltó ingerek által az NMDA receptorokon keresztül indukált masszív  $[Ca^{2+}]$  áramlás stabilizálja az aktin tüskevázat (Fischer et al., 2000, Star et al.,

2002, Ackermann and Matus, 2003, Fukazawa et al., 2003), amelyért részben a Rho-család GTPázainak aktiválása a felelős (Carlisle and Kennedy, 2005). Ezzel szemben a tartós szinaptikus hatékonyság-csökkenéssel (LTD-vel) járó, jóval alacsonyabb NMDAR-mediált  $[Ca^{2+}]$  emelkedés során a calcineurin aktiválódhat (Mulkey et al., 1994, Halpain et al., 1998), ami a tüske zsugorodásához vezet (Zhou et al., 2004). Számos eredmény látott napvilágot, amelyek felhívják a figyelmet arra, hogy ezek az alapvetően különböző folyamatok hogyan okozhatják a glutamát receptorok beillesztését és eltávolítását a poszt-szinaptikus denzitás területén (Lin et al., 2004, Matsuzaki et al., 2004), de a tüske morfológiájához kapcsolódó változások ekkor még kevésbé voltak ismertek.

A rendelkezésre álló adatok mind arra utalnak, hogy a cofilin elsődleges szerepet játszik az aktivitás és a tüske alakjának összehangolásában. Amikor calcineurin aktiválja a Slingshot kalciumfüggő cofilin-foszfatazt, az defoszforilálja a cofilint, ami az aktin filamentumok depolimerizációját és ez végeredményben a tüske zsugorodásához vezet (Zhou et al., 2004, Wang et al., 2005). Ezzel szemben a kis GTPázok Rho családja stabilizálja a tüskét (Nakayama et al., 2000, Tashiro et al., 2000). Érdekes, hogy a Rho GTPázok képesek aktiválni a LIMK-t, az egyetlen ismert kinázt, amely foszforilálja a cofilint, így gátolva annak aktin-depolimerizáló aktivitását. Ezzel teljesen öszhangban van az a megfigyelés, miszerint a LIMK-1 hiányos egerekben a magasabb cofilin aktivitás a tüskék méretének csökkenéséhez vezetett (Meng et al., 2002).

### *Cofilin a PSD-ben*

A proteomikai vizsgálatok a PSD-ban azonosították a cofilin jelenlétét (Walikonis et al., 2000, Jordan et al., 2004, Li et al., 2004, Peng et al., 2004, Yoshimura et al., 2004). A PSD-frakció azonban valószínűleg tartalmaz szennyeződéseket; ráadásul az ilyen biokémiai vizsgálat nem tudja megkülönböztetni a szinapszisok kis hányadában magas szinten jelen lévő fehérjét az összes szinapszisban alacsonyabb szinten kifejeződő fehérjéktől. A mi eredményeink kiterjesztik ezt a biokémiai munkát hiszen a morfológiailag azonosított PSD-ben magas cofilinszintet mutattunk ki. A cofilin koncentrációja a szinapszis azon régióiban, ahol egyébként az NMDA receptorok találhatóak, funkcionálisan jelentős megfigyelés, mivel eredmények szerint a cofilin részt vesz a szinaptikus NMDA receptorok hatékonyságának szabályozásában (Morishita et al., 2005).

Az, hogy a LIMK KO állatoknak nemcsak kisebb dendrittüskéik vannak, hanem csökkent a PSD-k mérete is (Meng et al., 2002), felveti annak lehetőségét, hogy a cofilin diszregulációja mindkét jelenségért felelős lehet. A tüske mérete korrelál a PSD méretével (Harris and Stevens, 1989, Wallace and Bear, 2004). Mivel a nagyobb PSD-k több AMPA típusú glutamát receptort tartalmaznak (Takumi et al., 1999, Kharazia and Weinberg, 1997), a tüske mérete a szinaptikus erősséggel, illetve hatékonysággal is korrelál. Így a posztszinaptikus receptorok számát, a PSD méretét és a tüske méretét össze kell hangolni. Bár a mechanizmus, amely e szinaptikus „skálázás” hátterében áll, továbbra is tisztázatlan, ismert, hogy a glutamát által kiváltott aktin depolimerizáció az AMPA receptorok disszociációját eredményezi a posztszinaptikus membránban lévő horgony-fehérjéikről, ami a receptor internalizációjához (Zhou et al., 2001). Sőt, az aktin-depolimerizáló szerek *in vitro* csökkentik a szinaptikus AMPA-receptorok számát a hippokampális dendrittüskékben (Allison et al., 1998). Feltételezésünk szerint a receptorok a cofilin aktiválásával mobilizálódnak a PSD-n belül, így megkönnyítve eltávolításukat a szinapsziszból, miközben egyidejűleg csökken a PSD mérete. Az aktin citoszkeleton dinamikus átrendeződése *in vitro* hippokampális neuronokban megköveteli, hogy a cofilin aktiválódása és deaktiválódása térben és időben korlátozott legyen (Lee-Hoeflich et al., 2004). Eredményeink alátámasztják ezt a megállapítást: a cofilin héj-doménbe koncentrációja alkalmassá teszi ezt a fehérjét a tüsketér fogat és a szinaptikus hatékonyság koordinált szabályozására.

## Arp2/3 komplex szerveződése a túskeplazmában

### Módszertani megjegyzések

Az Arp2/3 komplex az ARPC-2-n kívül hat másik alegységet is tartalmaz, melyek egy szorosan összekapcsolódott biokémiai funkcionális multimert alkotnak (Robinson et al., 2001), ami arra utal, hogy az ARPC-2 megbízható markere lehet ennek a komplexnek – bár ezt eddig közvetlen bizonyítékokkal nem sikerült igazolni az agyszövetre vonatkozóan. Proteomikai tanulmányokban leírták az Arp2/3 alegységeinek jelenlétét a PSD-ban (Li et al., 2004, Peng et al., 2004). A vizsgálatainkban bemutatott eredmények is arra utalnak, hogy az Arp2/3 jelen van a PSD-ban, igaz, csak kis mennyiségben. Ugyanakkor, mivel a beágyazás előtti (pre-embedding) jelöléssel előfordulhat, hogy nem sikerült detektálni az antigéneket a PSD-ban, annak antitestek számára korlátozott hozzáférhetősége miatt (Lorincz et al., 2002, Racz and Weinberg, 2004), ezért valószínűleg az is elképzelhető, hogy ezzel a módszerrel alábecsültük az antigének valós mennyiségét a PSD-ban.

Az immunarany jelölésre jellemző háttérzaj csökkenthető nagyobb, torzításmentes adatmennyiség átlagolásával. Ezzel a módszerrel nem várt eredményre jutottunk az Arp2/3 komplex dendrittüskén belüli térbeli eloszlására vonatkozóan. Mivel az általunk alkalmazott átlagolós módszer felnagyít minden nem-véletlenszerű eloszlást, az Arp2/3 valódi *in vivo* előfordulása még az itt bemutatottnál is élesebben csúcsosodó eloszlást mutathat a vizsgált régióon belül. Hiba akkor fordulhat elő nagyobb valószínűséggel, ha sorozatmetszetek helyett véletlenszerűen választott, egyetlen metszeten vizsgáljuk az antigének eloszlását. Az a tény, hogy ennek a hibának az előfordulása igencsak mérsékelt, alátámasztja az az eredményünk, hogy a PSD hossza és a dendrittüske mérete között erős korrelációt figyeltünk meg ( $r = 0,68$ ), ami nagyon hasonló a korábban CA1 dendrittüskék teljes rekonstrukciós módszerrel történő analíziséhez kapott eredményekhez, bár annál valamivel kevésbé impresszív ( $r = 0,88$ ) (Harris and Stevens, 1989). Ezért az itt bemutatott kísérleti eljárás megbízható eszközzel szolgálhat a fehérje-eloszlás kvalitatív vizsgálatára, bár valószínűsíthető, hogy alábecsüli az ARPC-2 kompartmentalizációjának valós mértékét.

Az általunk használt módszerek átlagolt „pillanatképeket” eredményeznek egy egyébként dinamikus folyamatból, ami az Arp2/3 legáltalánosabb eloszlásának feltérképezésére alkalmas, de annak átmeneteit nem képes megjeleníteni. Ugyanakkor, az Arp2/3 minden valószínűség szerint szigorúan szabályozott módon szerveződik, hogy képes legyen fenntartani az aktin-



átrendeződési folyamatokat, még olyan dinamikus rendszerek esetén is, mint a vándorló sejtek vezető élein (Svitkina and Borisy, 1999, Atilgan et al., 2005). Ezért, az itt leírt koncentrált térbeli elrendeződés a tüskeplazmában feltételezhetően az Arp2/3 komplex legalapvetőbb aktivitási helyét reprezentálja.

### *Aktin-átrendeződés és a dendrittüske-váz*

A dendrittüskek aktivitás-függő morfológiai változásai szoros kapcsolatban állnak a tartós szinaptikus plaszticitási folyamatokkal (Fifkova and Delay, 1982, Matus, 2000, Matus, 2005, Knott et al., 2006, Chen et al., 2007, Harvey and Svoboda, 2007). Ezekért a változásokért a szinaptikus bemenetek által kiváltott molekuláris kaszkádok rendkívül komplex összejátéka felelős, melyek végső soron az aktin sejtvezet átalakulását képesek kiváltani (Carlisle and Kennedy, 2005, Calabrese et al., 2006, Schubert and Dotti, 2007, Honkura et al., 2008). A már jól ismert eredmények szerint az Arp2/3 központi szerepet játszik a szinaptikus plaszticitási folyamatokban: az Arp2/3 komplex egyik aktivátorának, a WAVE-1-nek (Wiskott-Aldrich syndrome protein family member 1) a gátlása a tanulási folyamatok és a memória romlásához vezet (Soderling et al., 2003, Soderling and Scott, 2006, Derkach et al., 2007, Kim et al., 2013) Ezen túlmenően a WAVE-1 teljes elvesztése abnormális dendrittüske morfológiát eredményez (Kim et al., 2006b, Hazai et al., 2013).

A morfogenezis során a filopódiumokból a végső, gomba-alakú dendrittüske-forma az aktin polimerizációjának következtében kialakuló tolóerő hatására alakul ki (Ethell and Pasquale, 2005, Tada and Sheng, 2006). A dendrittüskekben leírt többé-kevésbe lineáris aktin-fonat - mely a nyaki régióban a legsűrűbb -, feltételezhetően az eredeti filopódium-kitüremkedés fő tengelyének maradványa (Fifkova and Delay, 1982, Smart and Halpain, 2000). Honkura és munkatársai (Honkura et al., 2008) leírtak egy dinamikusan átalakuló aktin-hálózatot a periférián, míg a dendrittüskek alapján egy stabil aktin-hálózatot azonosítottak. Ebben a felállásban az Arp2/3 komplex a dendrittüske feji régiójában végbemenő növekedés egyik kulcsszereplője lehet (Kim et al., 2006b). Az itt ismertetett adatok szerint az Arp2/3 komplex első sorban egy henger-szerű régióban koncentrálódik a dendrittüske citoplazmájában. Ez a megjelenés egy elágazási pontok kialakulásának kedvező régió meglétét feltételezi (Kiehart and Franke, 2002, Goley and Welch, 2006). Az ebből a régióból induló filopódium-növekedés képes lehet annak a tolóerőnek a kialakítására, ami a dendrittüskek

membránjának kitüremkedésének megindulásához szükséges az aktivitás-függő morfológiai változások során – amint azt modell-rendszerekben meg is figyelték (Pollard, 2007).

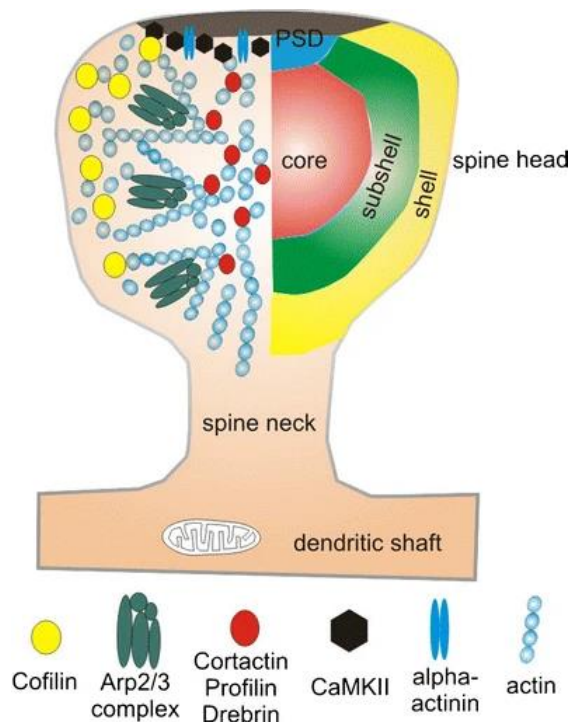
### *Az Arp2/3 szerepe a dendrittüskékben végbemenő endocitózisban*

A hippokampális dendrittüskékben korábban leírtak specializált endoszomális kompartmentumokat (Blanpied et al., 2002, Cooney et al., 2002). Korábbi kutatásainkban mi is megfigyeltük, hogy a funkcionálisan a dendrittüskék „endocitotikus zónájaként” azonosított, laterális részén (tangenciális távolság, ~0,4–0,6 normalizált egység) – mely régió speciális szerepet játszik a szinaptikus receptorok mozgásához szükséges aktivitásfüggő endocitózisban - három kulcsfontosságú endocitotikus fehérje is megtalálható (Perez-Otano and Ehlers, 2004, Lu et al., 2007, Racz et al., 2004). A nem-neuronális rendszerekből származó bizonyítékok arra utalnak, hogy az aktin sejtvázs szerepet játszik a szabályozott endocitózisban (Kaksonen et al., 2006, Galletta et al., 2008, Smythe and Ayscough, 2006); továbbá, az Arp2/3 komplex által szabályozott aktin polimerizáció előfeltétele a clathrinburkos vezikulák kialakulásának és mozgásának (Merrifield et al., 2002, Martin et al., 2006, Sun et al., 2015). *in vitro* kísérletek eredményei pedig igazolják, hogy az Arp2/3 megfelelő szabályozása fontos az AMPA receptorok NMDA receptor-mediálta endocitózisában is (Rocca et al., 2008). Az itt ismertetett *in vivo* adatok is alátámasztják ezeket az eredményeket, felvetve így annak a lehetőségét, hogy az Arp2/3-ban gazdag régiók hozzájárulhatnak a posztszinaptikus endocitózis hatékony szabályozásához.

### *Az aktin-szabályozó fehérjék a dendrittüskékben: mikrodomének*

Az aktin filamentumok döntő szerepet játszanak mind a szinaptikus dendrittüskék morfológiájának, mind a szinaptikus plaszticitásnak a szabályozásában. Az aktin alapú tüskeváz architektúráját több ABP-család szabályozza. Az itt bemutatott adatok azt sugallják, hogy ezek az ABP-k az aktin gyors turnoverje ellenére jól leírható és különböző térbeli tartományokban koncentrálnak (**50. ábra**). Mivel az immunarany jelölés kvantitatív meghatározása átlagolt értékekre támaszkodik, előfordulhat, hogy nem érzékeli a tüskék közötti heterogenitást (O'Rourke et al., 2012). Ez az átlagolás azonban tompítja a mögöttes, nem véletlenszerű eloszlásokat, így az egyes specifikus ABP-k *in vivo* valódi eloszlása valószínűleg még inkább az adott területre lokalizálható. Ezek a különálló ABP-k által meghatározott mikrodomének a

tüskeváz erősen kompartmentális szabályozására utalnak (Nicholson et al., 2012). Ezt a következtetést alátámasztják az élősejtes képalkotásból származó megfigyelések, amelyek szintén funkcionálisan diszkrét, a túskefejen belüli, szegregált aktin doménekre utalnak (Frost et al., 2010a, Hotulainen et al., 2009, Honkura et al., 2008, Frost et al., 2010b, Jung et al., 2020). Ezek az adatok együttesen arra utalnak, hogy a túskeváz szabályozását térben korlátozott ABP domének végzik, amelyek a szinaptikus plaszticitás során megfigyelhető aktivitásfüggő aktin átalakítás szabályozzák egyben felelősek azért. Meghibásodás akár a jelátviteli rendszerben, akár a konkrét szabályozófehérjék működésében súlyos következményekkel járhatnak.



**50. ábra. ABP mikrodomének a túskeplazmában.** Az előagyi szinapszisok proteomikai vizsgálatai jelentős számú ABP-t azonosítottak a biokémiaiilag meghatározott PSD-ben. Ezek közül néhány lehet szennyeződés, de többről, köztük az  $\alpha$ -aktininről (kék kettős oválisok) és a CaMKII-ről (fekete hatszögek) immunelektron-mikroszkópiával kimutatták, hogy a morfológiailag meghatározott PSD-n belül helyezkednek el. Az aktin (kis kék körök) dinamikusabb a túske héjában, mint a középpontban, ami az aktivitás funkcionális gradiensére utal, a héjtól a mag felé. Ezekkel az adatokkal összhangban a cofilin (sárga körök) - a filamentumok depolimerizációjáért felelős fehérje - erősen koncentrálnak ebben a héjtartományban. A túskeplazmán belül egy különálló "gyűrű vagy fánk" mikrodomén jelenlétére utal a filamentumok elágazását közvetítő Arp2/3 komplex (zöld kompozitok) felhalmozódása. A túske középpontja (maga) egy viszonylag stabil aktin-poolt tartalmaz. Az ABP-k heterogén poolja, beleértve a cortactint, a profilint és a drebrint (piros körök), ebben a mag-mikrodomáinban koncentrálnak.

## A septin és a tüskenyak görbülete

Megfigyeléseink alapján a Sept7-komplexek gyakran lokalizálódtak a dendrittüskék alapjához a filopodiális kinövés és a tüske fejlődés során. A dendrittüskék tövében a Sept7-GFP ív alakú struktúrákat hozott létre, amelyek a plazmamembrán görbületét követték, ahhoz igazodtak. Ez az eredmény megegyezik az emlős septinekre vonatkozó korábbi adatokkal. A septinekről ismert, hogy savas foszfolipidekhez kötődnek *in vitro* (Zhang et al., 1999), és az agyi eredetű septinkomplexek membránkötése és filamentumképzése negatív görbület indukciójához vezethet a liposzómákon (Tanaka-Takiguchi et al., 2009). Érdekes módon ez a membránhajlító aktivitás akkor volt a legerősebb, amikor a septinek a liposzómákban PIP<sub>2</sub>-hez kötődtek, egy olyan lipidhez, amely dendritikus tüskékben is feldúsulhat (Horne and Dell'Acqua, 2007). Mind a PIP<sub>2</sub> jelenléte, mind a negatívan görbült membránok iránti preferencia felelős lehet a Sept7 tüskenyakakhoz való toborzásáért. A GFP-jelölt Sept7 konfokális képalkotása vékony, hosszúk, ívszerű, Sept7-et tartalmazó struktúrákat mutatott, amelyek a plazmamembránhoz igazodnak a tüskenyakaknál, összhangban az emlős septineknél már megfigyelt filamentumképződésével (Xie et al., 2007, Sirajuddin et al., 2007). Elektronmikroszkópiával nem tudtunk septingyűrűket detektálni a nyakaknál, bár az arany szemcséket következetesen a Sept7-komplexre hasonlító nagy elektrondenzitású struktúrák közelében lokalizáltuk. A tüske-nyaki septinkomplexek dinamikájának és esetleges filamentum-jellegének tisztázásához a septin dúsulás, szerveződés és turnover részletesebb vizsgálatára van szükség. Az viszont kijelenthető, hogy a septinek szerepet játszanak a dendrittüskék nyak-görbületének kialakításában és stabilitásában.

## A tüske-szinapszisok szerkezete egyes kórképekben

### WAVE-1 szerepe a kóros tüskemorfológia kialakításában

A szinaptikus hatékonyságban bekövetkező változások jellemzően a szinaptikus morfológiában végbemenő változásokkal járnak, mert a biokémiai kaszkádokkal (melyek az aktin sejtvezeték dinamikáját és az újjászervezéshez szükséges gépezetét irányítják) közös jelátviteli útvonalakon osztoznak, így azok képesek hatást gyakorolni a plaszticitási folyamatokba (Matsuzaki et al., 2004). A molekulák, melyek ezen útvonalak középpontjául szolgálnak, éppolyan elengedhetetlenek a normál neuronális morfológiához, mint a szinaptikus plaszticitáshoz. Egyre gyűlő bizonyítékok támasztják alá azt, hogy a WAVE-1 fehérje is egy ilyen központi molekula: szükséges a lamellipodiális sejtmelegnyúláshoz, a neuronális növekedési kúpokban (Nozumi et al., 2003) és a WAVE gén zavara hiányosságokat okoz a *Drosophila* glutamáterg, neuromuszkuláris sejtkapcsolataiban (Schenck et al., 2004). Sőt, a WAVE-1 fehérje csökkent expressziója csökkenti az érett dendrittüskék számát a hippocampális idegsejt kultúrákban (Ceglia et al., 2010). Hasonlóképp, a WAVE-1-től upstream jelátvitel megzavarása is a tüskék számának csökkenését, megváltozott szinaptikus plaszticitást és a memória megtartásának zavarát idézi elő (Soderling et al., 2007, Soderling et al., 2003). Csakúgy, mint a WAVE-1 ligandjának, az Abi-2-nek (Grove et al., 2004, Proepper et al., 2011) vagy az ARP2/3 komplexnek a downstream zavara (Kim et al., 2013). Így a WAVE-1 a jelátviteli kaszkád központi molekulájaként kulcsszerepet játszhat a morfológiai változásokhoz kapcsolódó szinaptikus plaszticitási folyamatokban.

Jelen ultrastrukturális adataink, melyek KO egerekből származnak, egy lehetséges kiindulási pontként szolgálnak, hogy megértsük, hogyan szabályozhatja a WAVE-1 a hippocampusz CA1 régiójának szinaptikus folyamatait. Adataink alátámasztják, hogy a preszinaptikus Schaffer-kollaterálisok axonterminálisaiban a WAVE-1 kiesése a szinaptikus vezikulák számára és eloszlására hatással volt. A változást kiváltó biokémiai folyamat még ismeretlen. WAVE-1 KO egereken végzett elektrofiziológiai kísérletek megerősítették, hogy a szinaptikus (paired-pulse) facilitáció normális volt a CA1 régióban, ami arra utal, hogy a preszinaptikus vezikulaürítési valószínűség normális (Soderling et al., 2007). Ugyanakkor a Cdk5 (Ciklin-dependent kináz-5) által végzett WAVE-1 foszforilációja gátolja az Arp2/3 komplex-függő aktin polimerizáció szabályozhatóságát, illetve a Cdk5 aktivitása szabályozza a funkcionálisan reciklizálódó vezikula-készletet a hippocampusz szinapszisaiban (Marra et al., 2012). Ennek

megfelelően azt feltételezzük, hogy a Cdk5-ön keresztül a WAVE-1 szabályozza a vezikulák preszinaptikus eloszlását.

A KO egerekben a normálistól eltérő, lapított alakú dendrittüske fej feltehetően a hibás aktin-váz szabályozásnak egy megnyilvánulási formája (Murakoshi and Yasuda, 2012, Penzes et al., 2011, Penzes and Rafalovich, 2012). Kimutattuk azt is, hogy a KO egerek dendrittüskéinek feji része hosszabb PSD-t tartalmaz. Mivel a PSD hossza korrelál a szinaptikus membrán glutamát receptorainak számával és az EPSC nagyságával (Harris and Weinberg, 2012, Bourne and Harris, 2008b, Nusser et al., 1998, Matsuzaki et al., 2001, Kasai et al., 2010), a mutáns egerekben megfigyelhető hosszabb PSD valószínűleg több glutamát receptort tartalmaz, összhangban az erősebb LTP-vel és enyhébb LTD-vel, amit korábban megfigyeltek már a *wt* egerek kapcsán (Soderling et al., 2007). Jelenlegi adataink azt sugallják, hogy az AMPA receptorok a szinapszishoz a tüske endoszóma reciklizációjából származnak (Ehlers, 2000, Park et al., 2004a). Érdekes, hogy a KO egerek dendrittüskéiben markánsabb növekedést mutatott az endoszómák száma.

Az, hogy vajon a tüskeplazmában csapdába esnek-e ezek az endoszómák - mely hibás aktin polimerizációhoz vezet - vagy esetleg a számuk nő, egy hatékonyabb receptor transzportnak köszönhetően, még további kutatásokat igényel.

Összegezve, az említett, együttes pre- és posztzinaptikus változások a szinapszis szerveződésében szerkezeti alapot mutatnak be a kognitív hiányosságokra, melyet korábbi kutatások már leírtak és alátámasztják a WAVE-1 fontos szabályozó szerepét a szinaptikus plaszticitásban.

## ASD és a tuskeszinasziszok kapcsolata

Azt találtuk, hogy a CNTNAP2 elvesztése, amely emberben gyakran az autizmus jellemző tüneteinek hátterében húzódik, a mPFC L2/3 piramis neuronjain a serkentő szinasziszok teljes számának csökkenését eredményezi, amit konfokális mikroszkópiával is megerősítettünk. Arra a következtetésre jutottunk, hogy a CNTNAP2 elvesztése alapvető hatással van az mPFC-ben lévő serkentő és gátló neuronok szinaszitikus összeköttetésére. A funkcionális szinaszitikus konnektivitás és a szinasziszok sűrűségének megfigyelt csökkenése a CNTNAP2 KO állatok mPFC-ében összhangban van a közelmúltban végzett tanulmányokkal, amelyek csökkent helyi és tartós funkcionális összeköttetést mutattak ki ezen egerek prefrontális kéregében (Liska et al., 2018), valamint a szomatoszenzoros kéregben végzett munkával, amely mind az serkentő, mind a gátló bemenet csökkenését mutatja (Antoine et al., 2019). Ezenkívül a neurontenyészetekben végzett munka a CNTNAP2 RNSi knockdownja után csökkent mEPSC és mIPSC gyakoriságot mutatott, ami a dendrit-arborizáció komplexitásának és a tuskéfej méretének csökkenésével volt összefüggésben (Anderson et al., 2012). Bár általánosságban megegyezik a mi eredményeinkkel, mi nem találtunk változásokat a dendritikus arborizációban az mPFC-ben, annak ellenére, hogy a tuskék sűrűsége egyértelműen csökkent. Ezenkívül nem találtunk szignifikáns változásokat elektronmikroszkópiával a tuskék méretében vagy a szinasziszok méretében az mPFC L2/3-ban. Ezek az ellentmondások eredményeink és a korábbi tanulmányok között, különösen a dendritikus morfológia és a tuskék tekintetében, az *in vitro* neuronok és az *in vivo* preparátumok közötti inherens különbségekből eredhetnek.

A multiszinapszis boutonok (MSB-k) megfigyelt csökkenése és a perforált posztaszinaszitikus denzitások (PSD-k) növekedése tovább erősíti azt az elképzelést, hogy a CNTNAP2 komplex fontos szerepet játszhat a pre- és posztaszinaszitikus profilok között található szinaszitikus részben. Mivel mind az MSB-k, mind a perforált PSD-k a jól fejlett szinasziszok markerei, ez arra is utalhat, hogy a Cntnap2 elvesztése mind a pre-, mind a posztaszinaszitikus mechanizmusokon keresztül megzavarja a szinaszisz dinamikáját (Toni et al., 1999, Fiala et al., 2002, Nikonenko et al., 2002, Ganeshina et al., 2004, Geinisman et al., 1989, Geinisman et al., 2001). Ennek megfelelően a KO egerek tenyésztett agykérgi neuronjain végzett közelmúltbeli munkák a tuskék sűrűségének csökkenéséről és az AMPA receptor GluA1 lokalizációjának csökkenéséről számoltak be a CNTNAP2 KO neuronok tuskeszinasziszaisban (Varea et al., 2015), ami összhangban van a már leírt mEPSC amplitúdó kis mértékű csökkenésével. Ez egybeesik a

közelmúltban végzett munkával is, amely azt mutatja, hogy a Cntnap2 KO egereknél csökkent az AMPA receptor expressziója és transzmissziója *in vivo* (Kim et al., 2019). Eredményeink összhangban vannak korábbi munkánkkal is, amelyek a Cntnap2 KO egerek szomatoszenzoros kéregben lévő L5 neuronok apikális dendritjeiben a Cntnap2 KO egerek csökkent tüskesűrűségéről számoltak be (Gdalyahu et al., 2015). Ezért a CNTNAP2 kiesésének hatása a tüskék sűrűségére a tüskék csökkent stabilitásaként általánossá válhat az egész kéregben.

A jövőben a vizsgálatoknak a prefrontális kéreg bemeneteit és kimeneteit sejttípus- és projekció-specifikus módon kell feltérképezniük, hogy feltárják, vajon a serkentő- és gátló kapcsolatok változásai általánosan érvényesülnek-e, vagy szelektíven károsodnak bizonyos hálózatokban. Ehhez olyan kísérletekre lenne szükség, amelyekben a Cntnap2-t feltételesen eltávolítják specifikus sejttípusokban Cre-Lox technikákkal. Azt sem tudjuk, hogy az általunk talált szinaptikus és populációdinamikai változások visszafordíthatók vagy javíthatók-e a Cntnap2 génexpresszió felnőttkori helyreállításával, vagy a neuronális fejlődés korábbi szakaszaiban lesz szükség beavatkozásokra.

## Skizofrénia és a dendrittüske-morfológia kapcsolata

Az Arp2/3 mutáns egereken végzett vizsgálataink során már korábban megállapítottuk, hogy a szinaptikus és viselkedési fenotípusok progresszív lefolyása hasonlóságot mutat számos pszichiátriai rendellenességgel, különösen a skizofrénia (SZ) kognitív, negatív és pozitív tüneteivel (Kim et al., 2013). A dezorganizált viselkedés, amely magában foglalja a túlzott motoros aktivitást, az SZ pozitív tünete embernél is. A rágcsálómodellekben a motoros hiperaktivitást és a sztereotip viselkedést a pozitív tünetekkel összefüggő, mögöttes neurális hálózati-rendellenességek szempontjából fontosak, mivel jól reagálnak az antipszichotikumokra, és olyan gyógyszerek indukálják őket, amelyek emberekben pszichózist váltanak ki (van den Buuse, 2010). Az egérmodellekben nagyszerű lehetőség rejlik tehát a SZ tüneteinek hálózati és szerkezeti szintű koncepcióinak tisztázására, és kiindulópontként szolgálnak a rendellenességhez társuló tünetek patofiziológiájának feltérképezésére. Az SZ-t azonban bonyolítja a kórképek heterogén mivolta, amelyek egymáshoz való viszonya (ha van egyáltalán) nem mindig érthető vagy detektálható. E patológiák közé tartozik az agykérgi dendrittüskék túlzott mértékű elvesztése ill. eltűnése, a glutamáterg hálózatok túlzott



serkentése a kéregben, és a striatumban a dopaminerg tónus emelkedése (Laruelle et al., 1996, Belforte et al., 2010, Gainetdinov et al., 2001).

Eredményeink rávilágítanak arra a meglepő felfedezésre, hogy a tüskék elvesztése, amelyet korábban a Golgi-festés és a szürkeállomány sűrűségének *neuroimaging* vizsgálata során számos neuronális fejlődési és degeneratív rendellenességben megfigyeltek, inkább fokozott neuronális serkentéshez, mint csökkent aktivációhoz vezethet. Feltételezésünk szerint ez leginkább akkor fordulhat elő, ha a tüskék eltűnése a szinapszisok kialakulását követő posztnatális időszakokban indul be, szemben a tüskék károsodott fejlődésével, amely szintén csökkent tüskeszinapszist eredményezhet.

Eredményeink együttesen egy új mechanizmust azonosítanak egy hibás szinaptikus aktin szabályozási útvonallal kapcsolatban, amely egy olyan idegi hálózati-rendellenességet eredményez, amely kóros striatális dopaminhoz és számos pszichiátriai rendellenesség szempontjából releváns motoros zavarokhoz vezet. Az abnormális kapcsolatokra vonatkozó eredményeink ismereteink szerint elsőként adnak potenciális magyarázatot az SZ-ben megfigyelhető, látszólag egymástól független korábbi megfigyelésekre, mint például a kérgi tüskeszinapszisok kóros eltűnése, a kérgi serkentő neuronok fokozott aktivitása és a megváltozott striatális kimenet, (Sun et al., 2009, McIntosh et al., 2011, Glausier and Lewis, 2013, Tendilla-Beltran et al., 2019). Ezek az eredmények rávilágítanak arra, hogy a jövőben olyan stratégiákra van szükség, amelyek közvetlenül a pszichiátriai zavarok szempontjából releváns endofenotípusokhoz vezető mechanizmusokat célozzák meg, nem pedig a jelenlegi antipszichotikus gyógyszereket, amelyek látszólag az hálózati kapcsolatokban bekövetkező rendellenességek downstream következményeit (vagyis okozatait) javítják.

## A táplálkozás hatása a tüskeszinapsziokra

Eredményeink szerint a rövid távú táplálék-bevitel korlátozás nem változtatta meg a CA1 hippokampusz stratum radiatumában a tüskék méretét vagy sűrűségét, de növelte a szinapszisok hosszát és összetettségét. A PSD hossza erősen korrelál a szinapszisban lévő glutamát-receptorok számával és az EPSC-k nagyságával (Matsuzaki et al., 2001, Matsuzaki et al., 2004, Bosch and Hayashi, 2011, Hayashi and Majewska, 2005, Bourne and Harris, 2008b, Bourne and Harris, 2011, Kasai et al., 2010). Korábbi elektronmikroszkópos munkák is szoros kapcsolatot találtak a szinapszis mérete és a tüske mérete között (Harris and Stevens, 1989,

Harris et al., 1992, Harris and Weinberg, 2012). Ennek megfelelően az FR állatokban észlelt hosszabb PSD-k valószínűleg több glutamát receptort tartalmaznak, ami összhangban van a táplálékkorlátozás során megfigyelt fokozott LTP-vel és AMPA receptor beépüléssel (Fontana-Lozano et al., 2007, Ribeiro et al., 2014). Ezenkívül a perforált szinapszisok számának drámai növekedése is arra utal, hogy az FR elősegíti a CA1 szinapszisok strukturális plaszticitását, mivel a perforált szinapszisok a hippocampusban az LTP indikátorának tekinthetők (Sorra and Harris, 2000, Neuhoff et al., 1999, Toni et al., 1999, Nikonenko et al., 2002, Stewart et al., 2005, Connor et al., 2006). Azonban az a megállapításunk, hogy a szinapszis mérete a túske méretének megfelelő növekedése nélkül nőtt, arra utal, hogy az FR diéta elősegíti a szinaptikus hatékonyság növekedését, amely eltér a hippocampális LTP során megfigyelttől. Azt, hogy a táplálékkorlátozás okozta plaszticitás valószínűleg eltér a klasszikus LTP-től, az is alátámasztja, hogy nem észleltük az MSB-k átlagos sűrűségének növekedését, ellentétben több korábbi EM-vizsgálattal, amelyek azt találták, hogy az MSB-k száma növekszik a hippocampus-függő asszociatív tanulás során (Geinisman et al., 2001), és az LTP során (Toni et al., 1999) és a környezetgazdagításnak kitett állatok esetében is hasonlókat figyeltek meg (Jones et al., 1997). Így a szinaptikus transzmisszió FR-diéta általi fokozása érdekes különbségeket mutat a standard protokollok után tapasztalt szinaptikus hatékonyságnövekedéshez képest.

A hippocampus szinaptikus szerkezetében bekövetkező változások kiváltása mellett az FR-diéta változásokat idézhet elő az anyagcserében is. Mivel az agy a legnagyobb energiaigényű szerv, és nagyon érzékeny az energiahányra, arra számítottunk, hogy a hippocampusban a mitokondriumok változását fogjuk tapasztalni az FR-diéta hatására. Annak ellenére, hogy a mitokondriumok átlagos sűrűsége a teljes kísérlet során változatlan maradt a diéták vagy csoportok között, a 4. hét végére jelentős növekedést észleltünk a méretükben. A kalória restriktió képes a neuronok mitokondriális metabolizmust fokozni (Cheng et al., 2010, Liu et al., 2008), de nem valószínű, hogy még hosszabb FR-diéta akár indukálná a mitokondriális biogenezist (Lambert et al., 2004). Bár eredményeink összhangban vannak a fenti vizsgálatokkal, mivel nem észleltük a mitokondriális profilsűrűség növekedését a CA1 neuropilben, ellentmondásban vannak egy olyan korábbi vizsgálattal, amely nem talált változást a mitokondriális fehérjék szintjében az FR hatására (Hancock et al., 2011). Elképzelhető, hogy ez a szintű táplálékkorlátozás nem indukálja a mitokondriális biogenezist, hanem növeli a meglévő mitokondriumok aktivitását és méretét.

A táplálékbevitel korlátozása a rágcsálók élettartamát meghosszabbítja (Fernandes et al., 1972, Berg and Simms, 1965), továbbá fokozza a szinaptikus plaszticitást és javítja a hippocampusz-függő tanulást és memóriát (Hashimoto and Watanabe, 2005, Fontan-Lozano et al., 2007, Mattson, 2010). A táplálékkorlátozás által kiváltott javulás hátterében álló szerkezeti változások háttere azonban kevésbé ismert. Ultrastrukturális adataink adatokat szolgáltatnak arra vonatkozóan, hogy a FR hogyan változtathatja meg a CA1 szinapszisok tulajdonságait: a hosszabb (valószínűleg hatékonyabb) szinapszisok állhatnak a hippocampuszban korábban megfigyelt funkcionális változások hátterében. Hogyan lehetséges az FR által kiváltott fokozott LTP a szinaptikus plaszticitás "klasszikus" strukturális jelei (nagyobb tüskék, több MSB stb.) nélkül? A táplálékkorlátozás és az éhség kiválthatja a ghrelin, egy gyomorból származó hormon felszabadulását (Cummings et al., 2001, Murray et al., 2014). A ghrelinről kimutatták, hogy csökkenti az öregedéssel összefüggő elváltozásokat a kognitív folyamatokban (Witte et al., 2009), miközben fokozza a tanulást és elősegíti a szinaptikus plaszticitást (Fontan-Lozano et al., 2007). A legújabb eredmények szerint a ghrelin fokozza az serkentő szinaptikus transzmissziót és a szinaptikus plaszticitást az AMPA-receptor serkentő szinapszisokba való beépülésének szabályozásával, ami feltehetően hatékonyabbá teszi a hippocampusz-függő tanulási és memória-folyamatokat (Diano et al., 2006, Ribeiro et al., 2014). Mivel a hosszabb PSD több AMPA-receptort tartalmaz (Kharazia and Weinberg, 1997, Matsuzaki et al., 2001, Nusser et al., 1998, Takumi et al., 1999), feltételezhető, hogy a ghrelin AMPA-receptorok hozzáadásán keresztül kifejtett hatása hozzájárul a CA1-ben a táplálékkorlátozás során megfigyelt PSD-átalakulásához.

Eredményeink összhangban vannak azzal az elképzeléssel is, hogy az éhség az agy különböző neuronköreinek strukturális és funkcionális érzékenyítését eredményezheti, ami túlélési előnyt jelenthet. Összességében adataink korábban nem ismert ultrastrukturális változásokat tártak fel a neuropilben, és arra utalnak, hogy a hippocampusz szinapszisai érzékenyen reagálnak még az energiaegyensúly rövid távú változásaira is, ami alátámasztja a metabolikus egyensúly és a hippocampusz funkciói közötti kapcsolatot.

## Összefoglalás

---

Rágcsáló agy fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatával megállapítottuk, hogy az egyes aktin-szabályozó fehérjék a serkentő szinapszisok posztszinaptikus tüskeplazmájának mely területén fordulnak elő. Ehhez immuncitokémiával kombinált fény- és elektronmikroszkópos kvantitatív vizsgálatokat végeztünk. Az adatok feldolgozása egyértelműen kimutatta, hogy az aktin-alapú tüskeváz szabályozásában alapvető szerepet játszó egyes fehérjék kompartmentalizálódva koncentrálnak. A depolimerizáló hatású cofilin közvetlenül a membrán alatti régióban, héj-szerű területen fordul elő. Az Arp2/3 komplex, a tüskeplazmán belül egy gyűrű alakú területen található a legnagyobb mennyiségben, míg a cortactin, amelyik stabilizálja a filamentum- elágazódásokat, a tüske középpontjában lokalizálódik az előagyban, míg a kisagy tüskéiben a tüskehéjban. Megállapítható, hogy az aktin-átalakítási funkciók elkülönült helyeken, mikrodoménekben találhatóak. Vizsgálataink alátámasztották, hogy az előagyi tüskék felszíne sokkal dinamikusabb, míg a tüskefej központjában stabilabb aktin-mag található. A tüskékben tehát nagyon magas rendezettségű biokémiai szegregáció támogatja a hatékony neuronális jelátvitelt. Az ingerület továbbításáért felelős jelátviteli rendszer szorosan összekapcsolódik az aktin citoszekeleton szabályozásáért felelős enzimekkel, kialakítva ezzel az aktivitás függő szinaptikus plaszticitás morfológiai alapjait is.

Abnormális dendrittüske morfológiát számos neuropszichiátriai kórkép, például értelmi fogyatékoság, skizofrénia vagy az autizmus esetében leírtak. Eredményeink egyértelműen alátámasztják, hogy az idegsejtekben található aktin-sejtváz szabályozási útvonalaiiban bekövetkező hibák és e kórképek között közvetlen kapcsolat lehet. Skizofrénia-modellünkben a dendrittüskékben zajló aktivitás-függő aktin reorganizáció enzimrendszerének érintettségét mutattuk ki. A szinapszisok stabilitásában szerepet játszó CNTNAP2 génhiba pedig az autizmus-spektrum betegség hátterében húzódó szinaptikus defektusok egy részéért lehet felelős, amelyek szintén a tüskék szerkezetét változtatja meg. Mindezek arra utalnak, hogy tüskékben található aktin-citoszekeletonra ill. a szinapszis-morfológiára hatást gyakorló fehérjék hibás szabályozása számos idegrendszeri és pszichiátriai kórkép kialakulásáért felelős.

Az hippocampális tüskeszinapszisokra metabolikus változások is hatással vannak. Eredményeink szerint a rövid távú táplálék-bevitel korlátozás ugyan nem változtatta meg a CA1 hippocampusz stratum radiatumában a tüskék méretét vagy sűrűségét, de növelte a szinapszisok hosszát és összetettségét. A hippocampusz szinapszissai tehát érzékenyen reagálnak még az energiaegyensúly rövid távú változásaira is, ami alátámasztja a metabolikus egyensúly és a hippocampusz funkciói közötti kapcsolatot.

A tüskékben tehát egy igen precíz biokémiai gépezet található, amely a szinaptikus ingerületet nemcsak a dendrit és a sejttest felé közvetíti, de közvetlenül hatással van a tüskevázra is, ezáltal optimalizálja, plasztikusan hozzáigazítja a jelátvivő „berendezés” morfológiáját az aktivitáshoz. Ez az szinaptikus plaszticitás morfológiai megjelenése is egyben. A tüske-szerkezet megismerése mindenképpen közelebb visz minket az idegi információfeldolgozás megértéséhez, de klinikai jelentősége sem elhanyagolható, hiszen számos neuropszichiátriai és neurodegenerációs kórkép esetében ismert a tüskék abnormális morfológiája és működése, ami egyértelműen a tüskékben található aktin-váz szabályozásában bekövetkező anomáliákhoz köthetőek.

## Köszönetnyilvánítás

---

Jelen értekezésben bemutatott kutatási eredmények az Országos Tudományos Kutatási Alap OTKA, az NKFIH, az Állatorvostudományi Egyetem, valamint a National Institutes of Health (USA) ill. az Európai Szociális Alap (EFOP) támogatásával valósultak meg.

Köszönöm Rimóczi Imrénének, Halasy Katalinnak, Sótonyi Péternek, Richard Weinbergnek, Michael Ehlersnek, és Scott Soderlingnek a kutatói pályám során nyújtott önzetlen és magas szintű szakmai támogatást. Köszönettel tartozom Kristen Phendnek, Susan Burettnek, Magyar Tündének és Pop Renátának a kimagaslóan precíz és pontos laboratóriumi és mikroszkópos mintaelőkészítési asszisztenciáért. Nélkülük az értekezésben bemutatott anyagok nem jöhettek volna létre ilyen minőségben.

Köszönöm családom és kollégáim támogatását kutatómunkámhoz.

## Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények

1. **Racz, B**; Blanpied, TA; Ehlers, MD; Weinberg, RJ *Lateral organization of endocytic machinery in dendritic spines* NATURE NEUROSCIENCE 7: 9 pp. 917-918., 2 p. (2004)
2. **Racz, B**; Weinberg, RJ *The subcellular organization of cortactin in hippocampus* JOURNAL OF NEUROSCIENCE 24: 46 pp. 10310-10317., 8 p. (2004)
3. Choi, J; Ko, J; **Racz, B**; Burette, A; Lee, JR; Kim, S; Na, M; Lee, HW; Kim, K; Weinberg, RJ et al. *Regulation of dendritic spine morphogenesis by insulin receptor substrate 53, a downstream effector of Rac1 and Cdc42 small GTPases* JOURNAL OF NEUROSCIENCE 25: 4 pp. 869-879., 11 p. (2005)
4. **Racz, B**; Weinberg, RJ *Spatial organization of cofilin in dendritic spines* NEUROSCIENCE 138: 2 pp. 447-456., 10 p. (2006)
5. Lu, J; Helton, TD; Blanpied, TA; **Racz, B**; Newpher, TM; Weinberg, RJ; Ehlers, MD *Postsynaptic positioning of endocytic zones and AMPA receptor cycling by physical coupling of dynamin-3 to homer* NEURON 55: 6 pp. 874-889., 16 p. (2007)
6. **Racz, B**; Weinberg, RJ *Organization of the Arp2/3 complex in hippocampal spines* JOURNAL OF NEUROSCIENCE 28: 22 pp. 5654-5659., 6 p. (2008)
7. **Racz, B**; Weinberg, RJ *Microdomains in forebrain spines: an ultrastructural perspective.* MOLECULAR NEUROBIOLOGY 47: 1 pp. 77-89., 13 p. (2013)
8. Kim IH, **Racz B**, Wang H, Burianek L, Weinberg R, Yasuda R, Wetsel WC, Soderling SH. *Disruption of Arp2/3 Results in Asymmetric Structural Plasticity of Dendritic Spines and Progressive Synaptic and Behavioral Abnormalities* JOURNAL OF NEUROSCIENCE 33: 14 pp. 6081-6092., 12 p. (2013)
9. Hazai, D; Szudoczki, R; Ding, JD; Soderling, SH; Weinberg, RJ; Sótonyi, P; **Rácz, B** *Ultrastructural Abnormalities in CA1 Hippocampus Caused by Deletion of the Actin Regulator WAVE-1* PLOS ONE 8: 9 Paper: e75248, 8 p. (2013)
10. Ewers H, Tada T, Petersen JD, **Racz B**, Sheng M, Choquet D. *A septin-dependent diffusion barrier at dendritic spine necks* PLOS ONE 9: 12 Paper: e113916 (2014)
11. **Rácz, B**; Hazai, D ; Czeibert, K ; Sótonyi, P *Citoszkeletális eredetű neurológiai kórkép kvantitatív elektronmikroszkópos vizsgálata egérmodellben* MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA 136 : 1 pp. 52-58., 7 p. (2014)
12. H Kim, Il; A Rossi, M; K Aryal, D; **Racz, B.**; Kim, N; Uezu, A; Wang, F; C Wetsel, W; J Weinberg, R; Yin, H et al. *Spine pruning drives antipsychotic-sensitive locomotion via circuit control of striatal dopamine* NATURE NEUROSCIENCE 18: 6 pp. 883-891., 9 p. (2015)
13. Babits R, Szőke B, Sótonyi P, **Rácz B.** *Food restriction modifies ultrastructure of hippocampal synapses.* HIPPOCAMPUS. 26(4):437-44. doi: 10.1002/hipo.22533. (2016)
14. Marcello GM, Szabó LE, Sótonyi P, **Rácz B.** *Quantitative Electron Microscopic Assay Using Random Sampling from Single Sections to Test Plastic Synaptic Changes in Hippocampus.* BIO PROTOCOL 8(15):e2946. doi: 10.21769/BioProtoc.2946. (2018)
15. Lazaro MT, Taxidis J, Shuman T, Bachmutsky I, Ikrar T, Santos R, Marcello GM, Mylavarapu A, Chandra S, Foreman A, Goli R, Tran D, Sharma N, Azhdam M, Dong H, Choe KY, Peñagarikano O, Masmanidis SC, **Rácz B**, Xu X, Geschwind DH, Golshani P. *Reduced Prefrontal Synaptic Connectivity and Disturbed Oscillatory Population Dynamics in the CNTNAP2 Model of Autism* CELL REPORTS 27: 9 pp. 2567-256+., 18 p. (2019)
16. Szabó LE, Marcello GM, Süth M, Sótonyi P, **Rácz B.** *Distribution of cortactin in cerebellar Purkinje cell spines* SCIENTIFIC REPORTS 11 : 1 Paper: 1375 (2021)

## Az értekezéshez fel nem használt saját közlemények

Endle H, Horta G, Stutz B, Muthuraman M, Tegeder I, Schreiber Y, Snodgrass IF, Gurke R, Liu ZW, Sestan-Pesa M, Radyushkin K, Streu N, Fan W, Baumgart J, Li Y, Kloss F, Groppa S, Opel N, Dannlowski U, Grabe HJ, Zipp F, **Rácz B**, Horvath TL, Nitsch R, Vogt J. AgRP neurons control feeding behaviour at cortical synapses via peripherally derived lysophospholipids. NATURE METABOLISM 2022 Jun;4(6):683-692. doi: 10.1038/s42255-022-00589-7. (2022)

Stutz B ; Waterson, M. ; Šestan-Peša, M ; Dietrich, M O. ; Škarica, M ; Sestan, N ; **Rácz, B** ; Magyar, A ; Sotonyi, P ; Liu, Zhong-Wu et al. AgRP neurons control structure and function of the medial prefrontal cortex MOLECULAR PSYCHIATRY 27 pp. 3951-3960., 10 p. (2022)

Loraszko, G; **Rácz, B**; Ozsvári, L Changes in the Dentition of Small Dogs up to 4 Months of Age ANIMALS 12 : 11 Paper: 1417 , 12 p. (2022)

Pézsza NP; Kovács, D ; Somogyi, Z ; **Rácz, B** ; Farkas, O Probiotikumok hatásának vizsgálata sertésekben: Irodalmi összefoglaló MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA 144 : 10 pp. 613-622., 10 p. (2022)

Pézsza NP.; Kovács, D.; Gálfi, P. ; **Rácz, B.** ; Farkas, O. Effect of Enterococcus faecium NCIMB 10415 on Gut Barrier Function, Internal Redox State, Proinflammatory Response and Pathogen Inhibition Properties in Porcine Intestinal Epithelial Cells NUTRIENTS 14 : 7 Paper: DOI 10.3390/nu14071486 (2022)

Pézsza, NP; Kovács, D; **Rácz, B** ; Farkas, O Effects of Bacillus licheniformis and Bacillus subtilis on Gut Barrier Function, Proinflammatory Response, ROS Production and Pathogen Inhibition Properties in IPEC-J2—Escherichia coli/Salmonella Typhimurium Co-Culture MICROORGANISMS 10 : 5 Paper: 936 (2022)

Gómez-Valadés AG, Pozo M, Varela L, Boudjadja MB, Ramírez S, Chivite I, Eyre E, Haddad-Tóvolli R, Obri A, Milà-Guasch M, Altirriba J, Schneeberger M, Imbernón M, Garcia-Rendueles AR, Gama-Perez P, Rojo-Ruiz J, **Rácz B**, Alonso MT, Gomis R, Zorzano A, D'Agostino G, Alvarez CV, Nogueiras R, Garcia-Roves PM, Horvath TL, Claret M. Mitochondrial cristae-remodeling protein OPA1 in POMC neurons couples Ca<sup>2+</sup> homeostasis with adipose tissue lipolysis CELL METABOLISM 33: 9 pp. 1820-1835.e9. (2021)

Tóth EZ, Szabó FG, Kandrás Á, Molnár NO, Nagy G, Bagó AG, Erőss L, Fabó D, Hajnal B, **Rácz B**, Wittner L, Ulbert I, Tóth K. Perisomatic Inhibition and Its Relation to Epilepsy and to Synchrony Generation in the Human Neocortex INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 23: 1 Paper: 202, 27 p. (2022)

O'Neil, SD ; **Rácz, B** ; Brown, WE ; Gao, YD ; Soderblom, EJ ; Yasuda, R ; Soderling, SH Action potential-coupled Rho GTPase signaling drives presynaptic plasticity ELIFE 10 Paper: e63756 (2021)

Schroeder S, Hofer SJ, Zimmermann A, Pechlaner R, Dammbroek C, Pendl T, Marcello GM, Pogatschnigg V, Bergmann M, Müller M, Gschiel V, Ristic S, Tadic J, Iwata K, Richter G, Farzi A, Üçal M, Schäfer U, Poglitsch M, Royer P, Mekis R, Agreiter M, Tölle RC, Sotonyi P, Willeit J, Mairhofer B, Niederkofler H, Pallhuber I, Rungger G, Tilg H, Defrancesco M, Marksteiner J, Sinner F, Magnes C, Pieber TR, Holzer P, Kroemer G, Carmona-Gutierrez D, Scorrano L, Dengjel J, Madl T, Sedej S, Sigrist SJ, **Rácz B**, Kiechl S, Eisenberg T, Madeo F. Dietary spermidine improves cognitive function CELL REPORTS 35 : 2 Paper: 108985 (2021)

Marcello GM; Sotonyi P; Süth M; **Rácz B**, Minireview: High-fructose diet and the ultrastructure of brain synapses ÉLELMISZERVIZSGÁLATI KÖZLEMÉNYEK Special edition : 2020/1 pp. 5-7. , 3 p. (2020)

Maglione M, Kochlamazashvili G, Eisenberg T, **Rácz B**, Michael E, Toppe D, Stumpf A, Wirth A, Zeug A, Müller FE, Moreno-Velasquez L, Sammons RP, Hofer SJ, Madeo F, Maritzen T, Maier N, Ponimaskin E, Schmitz D, Haucke V, Sigrist SJ. Spermidine protects from age-related synaptic alterations at hippocampal mossy fiber-CA3 synapses. SCIENTIFIC REPORTS 9 : 1 p. 19616 (2019)

Liliom, H ; Tarnok, K ; Abraham, Z ; **Rácz, B** ; Hausser, A ; Schlett, K Protein kinase D exerts neuroprotective functions during oxidative stress via nuclear factor kappa B-independent signaling pathways JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY 142 : 6 pp. 948-961. , 14 p. (2017)

Czeibert, K ; Baksa, G ; Grimm, A ; Kozma, I ; Fekete, I ; Falk, Gy ; Nyíri, G ; Sótónyi, P ; **Rácz, B** ; Petneházy, Ö Understanding equine petrosal bone: 3D-reconstruction and virtual endoscopy of the middle and inner ear ANATOMIA HISTOLOGIA EMBRYOLOGIA-JOURNAL OF VETERINARY MEDICINE SERIES C 45 : Suppl.1 pp. 20-20. , 1 p. (2016)

Vereczki VK, Veres JM, Müller K, Nagy GA, **Rácz B**, Barsy B, Hájos N.Synaptic Organization of Perisomatic GABAergic Inputs onto the Principal Cells of the Mouse Basolateral Amygdala FRONTIERS IN NEUROANATOMY 10 : 3 Paper: 20 , 19 p. (2016)

Bencsik, N ; Sziber, Z ; Liliom, H ; Tarnok, K ; Borbély, Sándor ; Gulyas, M ; Ratkai, A ; Szucs, A ; Hazai-Novak, D ; Ellwanger, K et al. Protein kinase D promotes plasticity-induced F-actin stabilization in dendritic spines and regulates memory formation. JOURNAL OF CELL BIOLOGY 210 : 5 pp. 771-783. , 13 p. (2015)

Czeibert, K ; Baksa, G ; Szabó, P ; Sótónyi, P ; **Rácz, B** ; Petneházy, Ö Blood supply of the canine brain: a multiway approach with conventional technique, corrosion casting and cryosectioning ANATOMIA HISTOLOGIA EMBRYOLOGIA-JOURNAL OF VETERINARY MEDICINE SERIES C 43 : Suppl. 1. pp. 31-32. , 2 p. (2014)

Sótónyi, P ; Mezei, G ; **Rácz, B** ; Dallman, MF ; Abizaid, A ; Horvath, TL Gonadotropin-Releasing Hormone Fibers Contact POMC Neurons in the Hypothalamic Arcuate Nucleus REPRODUCTIVE SCIENCES 17 : 11 pp. 1024-1028. Paper: 20713970, 5 p. (2010)

Kovacs, EG; Szalay, F ; **Rácz, B** ; Halasy, K Chronic fasting-induced changes of neuropeptide Y immunoreactivity in the lateral septum of intact and ovariectomized female rats. BRAIN RESEARCH 1153 pp. 103-110. , 8 p. (2007)

Choi, J; Ko, J; **Rácz, B**; Burette, A; Lee, JR; Kim, S; Na, M; Lee, HW; Kim, K; Weinberg, RJ et al. Regulation of dendritic spine morphogenesis by insulin receptor substrate 53, a downstream effector of Rac1 and Cdc42 small GTPases JOURNAL OF NEUROSCIENCE 25: 4 pp. 869-879. , 11 p. (2005)

Horton, AC ; **Rácz, B** ; Monson, EE ; Lin, AL ; Weinberg, RJ ; Ehlers, MD Polarized secretory trafficking directs cargo for asymmetric dendrite growth and morphogenesis NEURON 48 : 5 pp. 757-771. , 15 p. (2005)

**Rácz, B** ; Halasy, K Kappa-opioid receptor in the rodent hippocampus: a comparative immunocytochemical study in the rat, guinea pig, hamster and gerbil. ACTA BIOLOGICA HUNGARICA (1983-2018) 54 : 1 pp. 45-53. , 9 p. (2003)

**Rácz, B**; Halasy, K Kappa opioid receptor is expressed by somatostatin- and neuropeptide Y-containing interneurons in the rat hippocampus. BRAIN RESEARCH 931: 1 pp. 50-55. , 6 p. (2002)

Halasy, K ; **Rácz, B** ; Maderspach, K Kappa opioid receptors are expressed by interneurons in the CA1 area of the rat hippocampus: a correlated light and electron microscopic immunocytochemical study. JOURNAL OF CHEMICAL NEUROANATOMY 19 : 4 pp. 233-241. , 9 p. (2000)

**Rácz, B** ; Fuzesi, M ; Halasy, K The hippocampal opioidergic system: a comparative immunocytochemical study in four rodents. NEUROBIOLOGY - BUDAPEST 6: 4 pp. 429-441., 13 p. (1998)

Füzesi M, **Rácz B**, Eliás B, Halasy K. Enkephalinergic nerve terminals target inhibitory interneurons in the rat hippocampus. NEUROREPORT 8: 11 pp. 2471-2475., 5 p. (1997)

## Publikációs mutatók az értekezés beadásakor

---

Eredeti közlemények száma: 43

Összesített impakt faktor: 262,29

Összes független idézetek száma: 1411

h-index: 16

i-index: 24



## Irodalomjegyzék

- ABE, H., NAGAOKA, R. & OBINATA, T. 1993. Cytoplasmic localization and nuclear transport of cofilin in cultured myotubes. *Exp Cell Res*, 206, 1-10.
- ACKERMANN, M. & MATUS, A. 2003. Activity-induced targeting of profilin and stabilization of dendritic spine morphology. *Nat Neurosci*, 6, 1194-200.
- ADAMS, M. M., SHI, L., LINVILLE, M. C., FORBES, M. E., LONG, A. B., BENNETT, C., NEWTON, I. G., CARTER, C. S., SONNTAG, W. E., RIDDLE, D. R. & BRUNSO-BECHTOLD, J. K. 2008. Caloric restriction and age affect synaptic proteins in hippocampal CA3 and spatial learning ability. *Exp Neurol*, 211, 141-9.
- ADDINGTON, A. M. & RAPOPORT, J. L. 2009. The genetics of childhood-onset schizophrenia: when madness strikes the prepubescent. *Curr Psychiatry Rep*, 11, 156-61.
- ALARCON, M., ABRAHAMS, B. S., STONE, J. L., DUVALL, J. A., PEREDERIY, J. V., BOMAR, J. M., SEBAT, J., WIGLER, M., MARTIN, C. L., LEDBETTER, D. H., NELSON, S. F., CANTOR, R. M. & GESCHWIND, D. H. 2008. Linkage, association, and gene-expression analyses identify CNTNAP2 as an autism-susceptibility gene. *Am J Hum Genet*, 82, 150-9.
- ALLEN, D. N., HUEGEL, S. G., SEATON, B. E., GOLDSTEIN, G., GURKLIS, J. A., JR. & VAN KAMMEN, D. P. 1998. Confirmatory factor analysis of the WAIS-R in patients with schizophrenia. *Schizophr Res*, 34, 87-94.
- ALLISON, D. W., GELFAND, V. I., SPECTOR, I. & CRAIG, A. M. 1998. Role of actin in anchoring postsynaptic receptors in cultured hippocampal neurons: differential attachment of NMDA versus AMPA receptors. *J Neurosci*, 18, 2423-36.
- ANDERSON, G. R., GALFIN, T., XU, W., AOTO, J., MALENKA, R. C. & SUDHOF, T. C. 2012. Candidate autism gene screen identifies critical role for cell-adhesion molecule CASPR2 in dendritic arborization and spine development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 18120-5.
- ANDRADE, J. P., LUKOYANOV, N. V. & PAULA-BARBOSA, M. M. 2002. Chronic food restriction is associated with subtle dendritic alterations in granule cells of the rat hippocampal formation. *Hippocampus*, 12, 149-64.
- ANITEI, M. & HOFACK, B. 2012. Bridging membrane and cytoskeleton dynamics in the secretory and endocytic pathways. *Nat Cell Biol*, 14, 11-9.
- ANTOINE, M. W., LANGBERG, T., SCHNEPEL, P. & FELDMAN, D. E. 2019. Increased Excitation-Inhibition Ratio Stabilizes Synapse and Circuit Excitability in Four Autism Mouse Models. *Neuron*, 101, 648-661 e4.
- ARKING, D. E., CUTLER, D. J., BRUNE, C. W., TESLOVICH, T. M., WEST, K., IKEDA, M., REA, A., GUY, M., LIN, S., COOK, E. H. & CHAKRAVARTI, A. 2008. A common genetic variant in the neurexin superfamily member CNTNAP2 increases familial risk of autism. *Am J Hum Genet*, 82, 160-4.
- ASHBY, M. C., MAIER, S. R., NISHIMUNE, A. & HENLEY, J. M. 2006. Lateral diffusion drives constitutive exchange of AMPA receptors at dendritic spines and is regulated by spine morphology. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26, 7046-55.
- ATILGAN, E., WIRTZ, D. & SUN, S. X. 2005. Morphology of the lamellipodium and organization of actin filaments at the leading edge of crawling cells. *Biophys J*, 89, 3589-602.
- BABITS, R., SZOKE, B., SOTONYI, P. & RACZ, B. 2016. Food restriction modifies ultrastructure of hippocampal synapses. *Hippocampus*, 26, 437-44.
- BAMBURG, J. R. 1999. Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 15, 185-230.
- BARON, M. K., BOECKERS, T. M., VAIDA, B., FAHAM, S., GINGERY, M., SAWAYA, M. R., SALYER, D., GUNDELFINGER, E. D. & BOWIE, J. U. 2006. An architectural framework that may lie at the core of the postsynaptic density. *Science*, 311, 531-5.
- BARRAL, Y. & MANSUY, I. M. 2007. Septins: Cellular and functional barriers of neuronal activity. *Current Biology*, 17, R961-R963.
- BARRAL, Y., MERMALL, V., MOOSEKER, M. S. & SNYDER, M. 2000. Compartmentalization of the cell cortex by septins is required for maintenance of cell polarity in yeast. *Molecular Cell*, 5, 841-851.
- BAUDE, A., NUSSER, Z., ROBERTS, J. D., MULVIHILL, E., MCILHINNEY, R. A. & SOMOGYI, P. 1993. The metabotropic glutamate receptor (mGluR1 alpha) is concentrated at perisynaptic membrane of neuronal subpopulations as detected by immunogold reaction. *Neuron*, 11, 771-87.
- BAYER, K. U. & SCHULMAN, H. 2019. CaM Kinase: Still Inspiring at 40. *Neuron*, 103, 380-394.
- BELFORTE, J. E., ZSIROS, V., SKLAR, E. R., JIANG, Z., YU, G., LI, Y., QUINLAN, E. M. & NAKAZAWA, K. 2010. Postnatal NMDA receptor ablation in corticolimbic interneurons confers schizophrenia-like phenotypes. *Nat Neurosci*, 13, 76-83.

- BELLUGI, U., LICHTENBERGER, L., MILLS, D., GALABURDA, A. & KORENBERG, J. R. 1999. Bridging cognition, the brain and molecular genetics: evidence from Williams syndrome. *Trends Neurosci*, 22, 197-207.
- BELMEGUENAI, A. & HANSEL, C. 2005. A role for protein phosphatases 1, 2A, and 2B in cerebellar long-term potentiation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25, 10768-72.
- BEN ZABLAH, Y., ZHANG, H., GUGUSTEA, R. & JIA, Z. 2021. LIM-Kinases in Synaptic Plasticity, Memory, and Brain Diseases. *Cells*, 10.
- BENOIST, M., PALENZUELA, R., ROZAS, C., ROJAS, P., TORTOSA, E., MORALES, B., GONZALEZ-BILLAULT, C., AVILA, J. & ESTEBAN, J. A. 2013. MAP1B-dependent Rac activation is required for AMPA receptor endocytosis during long-term depression. *EMBO J*, 32, 2287-99.
- BERG, B. N. & SIMMS, H. S. 1965. Nutrition, onset of disease, and longevity in the rat. *Can Med Assoc J*, 93, 911-3.
- BERNSTEIN, B. W. & BAMBURG, J. R. 2010. ADF/Cofilin: a functional node in cell biology. *Trends in Cell Biology*, 20, 187-195.
- BERTASO, F., ROUSSIGNOL, G., WORLEY, P., BOCKAERT, J., FAGNI, L. & ANGO, F. 2010. Homer1a-dependent crosstalk between NMDA and metabotropic glutamate receptors in mouse neurons. *PLoS One*, 5, e9755.
- BLANPIED, T. A., SCOTT, D. B. & EHLERS, M. D. 2002. Dynamics and regulation of clathrin coats at specialized endocytic zones of dendrites and spines. *Neuron*, 36, 435-49.
- BOSCH, M. & HAYASHI, Y. 2011. Structural plasticity of dendritic spines. *Curr Opin Neurobiol*.
- BOURNE, J. N. & HARRIS, K. M. 2008a. Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annual review of neuroscience*, 31, 47-67.
- BOURNE, J. N. & HARRIS, K. M. 2008b. Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annual Review of Neuroscience*.
- BOURNE, J. N. B. J. N. & HARRIS, K. M. 2011. Coordination of Size and Number of Excitatory and Inhibitory Synapses Results in a Balanced Structural Plasticity Along Mature Hippocampal CA1 Dendrites During LTP. *Hippocampus*, 21, 354-373.
- BRETSCHNEIDER, T., DIEZ, S., ANDERSON, K., HEUSER, J., CLARKE, M., MULLER-TAUBENBERGER, A., KOHLER, J. & GERISCH, G. 2004. Dynamic actin patterns and Arp2/3 assembly at the substrate-attached surface of motile cells. *Curr Biol*, 14, 1-10.
- BROWN, T. C., TRAN, I. C., BACKOS, D. S. & ESTEBAN, J. A. 2005. NMDA receptor-dependent activation of the small GTPase Rab5 drives the removal of synaptic AMPA receptors during hippocampal LTD. *Neuron*, 45, 81-94.
- BRUNIG, I., KAECH, S., BRINKHAUS, H., OERTNER, T. G. & MATUS, A. 2004. Influx of extracellular calcium regulates actin-dependent morphological plasticity in dendritic spines. *Neuropharmacology*, 47, 669-76.
- BURETTE, A., ZABEL, U., WEINBERG, R. J., SCHMIDT, H. H. H. W. & VALTSCHANOFF, J. G. 2002. Synaptic localization of nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase in the hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 22, 8961-70.
- BURETTE, C., LESPERANCE, T., CRUM, J., MARTONE, M., VOLKMANN, N., ELLISMAN, M. & WEINBERG, R. J. 2012. Electron tomographic analysis of synaptic ultrastructure. *J Comp Neurol*, in press.
- CAI, L., MARSHALL, T. W., UETRECHT, A. C., SCHAFER, D. A. & BEAR, J. E. 2007. Coronin 1B coordinates Arp2/3 complex and cofilin activities at the leading edge. *Cell*, 128, 915-29.
- CALABRESE, B., SAFFIN, J.-M. & HALPAIN, S. 2014. Activity-dependent dendritic spine shrinkage and growth involve downregulation of cofilin via distinct mechanisms. *PLoS one*, 9, e94787.
- CALABRESE, B., WILSON, M. S. & HALPAIN, S. 2006. Development and regulation of dendritic spine synapses. *Physiology (Bethesda)*, 21, 38-47.
- CALVERLEY, R. K. & JONES, D. G. 1987a. Determination of the numerical density of perforated synapses in rat neocortex. *Cell Tissue Res*, 248, 399-407.
- CALVERLEY, R. K. & JONES, D. G. 1987b. A serial-section study of perforated synapses in rat neocortex. *Cell Tissue Res*, 247, 565-72.
- CALVERLEY, R. K. & JONES, D. G. 1990. Contributions of dendritic spines and perforated synapses to synaptic plasticity. *Brain Res Brain Res Rev*, 15, 215-49.
- CAO, H., GARCIA, F. & MCNIVEN, M. A. 1998. Differential distribution of dynamin isoforms in mammalian cells. *Molecular biology of the cell*, 9, 2595-609.
- CAPANI, F., MARTONE, M. E., DEERINCK, T. J. & ELLISMAN, M. H. 2001. Selective localization of high concentrations of F-actin in subpopulations of dendritic spines in rat central nervous system: a three-dimensional electron microscopic study. *J Comp Neurol*, 435, 156-70.

- CARLIER, M. F., LAURENT, V., SANTOLINI, J., MELKI, R., DIDRY, D., XIA, G. X., HONG, Y., CHUA, N. H. & PANTALONI, D. 1997. Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *The Journal of cell biology*, 136, 1307-22.
- CARLISLE, H. J. & KENNEDY, M. B. 2005. Spine architecture and synaptic plasticity. *Trends Neurosci*, 28, 182-7.
- CARLSON, B. R., LLOYD, K. E., KRUSZEWSKI, A., KIM, I. H., RODRIGUIZ, R. M., HEINDEL, C., FAYTELL, M., DUDEK, S. M., WETSEL, W. C. & SODERLING, S. H. 2011. WRP/srGAP3 facilitates the initiation of spine development by an inverse F-BAR domain, and its loss impairs long-term memory. *J Neurosci*, 31, 2447-60.
- CARROLL, R. C., BEATTIE, E. C., VON ZASTROW, M. & MALENKA, R. C. 2001. Role of AMPA receptor endocytosis in synaptic plasticity. *Nature reviews Neuroscience*, 2, 315-24.
- CATSBURG, L. A., WESTRA, M., VAN SCHAİK, A. M. & MACGILLAVRY, H. D. 2022. Dynamics and nanoscale organization of the postsynaptic endocytic zone at excitatory synapses. *Elife*, 11.
- CAUDRON, F. & BARRAL, Y. 2009. Septins and the Lateral Compartmentalization of Eukaryotic Membranes. *Developmental Cell*, 16, 493-506.
- CEGLIA, I., KIM, Y., NAIRN, A. C. & GREENGARD, P. 2010. Signaling pathways controlling the phosphorylation state of WAVE1, a regulator of actin polymerization. *J Neurochem*, 114, 182-90.
- CHANG, J., GILMAN, S. R., CHIANG, A. H., SANDERS, S. J. & VITKUP, D. 2015. Genotype to phenotype relationships in autism spectrum disorders. *Nat Neurosci*, 18, 191-8.
- CHEN, J. A., PENAGARIKANO, O., BELGARD, T. G., SWARUP, V. & GESCHWIND, D. H. 2015. The emerging picture of autism spectrum disorder: genetics and pathology. *Annu Rev Pathol*, 10, 111-44.
- CHEN, L. Y., REX, C. S., CASALE, M. S., GALL, C. M. & LYNCH, G. 2007. Changes in synaptic morphology accompany actin signaling during LTP. *J Neurosci*, 27, 5363-72.
- CHEN, Y., MILENKOVIC, M., HORSFALL, W., SALAHPOUR, A., SODERLING, S. H. & RAMSEY, A. J. 2018. Restoring striatal WAVE-1 improves maze exploration performance of GluN1 knockdown mice. *PLoS One*, 13, e0199341.
- CHENG, A., HOU, Y. & MATTSOON, M. P. 2010. Mitochondria and neuroplasticity. *ASN Neuro*, 2, e00045.
- CHOI, J., KO, J., RACZ, B., BURETTE, A., LEE, J. R., KIM, S., NA, M., LEE, H. W., KIM, K., WEINBERG, R. J. & KIM, E. 2005. Regulation of dendritic spine morphogenesis by insulin receptor substrate 53, a downstream effector of Rac1 and Cdc42 small GTPases. *J Neurosci*, 25, 869-79.
- CLEMENT, J. P., ACETI, M., CRESOON, T. K., OZKAN, E. D., SHI, Y., REISH, N. J., ALMONTE, A. G., MILLER, B. H., WILTGEN, B. J., MILLER, C. A., XU, X. & RUMBAUGH, G. 2012. Pathogenic SYNGAP1 mutations impair cognitive development by disrupting maturation of dendritic spine synapses. *Cell*, 151, 709-723.
- CONNER, S. D. & SCHMID, S. L. 2003. Regulated portals of entry into the cell. *Nature*, 422, 37-44.
- CONNOR, S., WILLIAMS, P. T., ARMSTRONG, B., PETIT, T. L., IVANCO, T. L. & WEEKS, A. C. 2006. Long-term potentiation is associated with changes in synaptic ultrastructure in the rat neocortex. *Synapse*, 59, 378-82.
- COONEY, J. R., HURLBURT, J. L., SELIG, D. K., HARRIS, K. M. & FIALA, J. C. 2002. Endosomal compartments serve multiple hippocampal dendritic spines from a widespread rather than a local store of recycling membrane. *J Neurosci*, 22, 2215-24.
- CUMMINGS, D. E., PURNELL, J. Q., FRAYO, R. S., SCHMIDOVA, K., WISSE, B. E. & WEIGLE, D. S. 2001. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes*, 50, 1714-9.
- DALY, R. J. 2004. Cortactin signalling and dynamic actin networks. *Biochem J*, 382, 13-25.
- DE LA TORRE-UBIETA, L., WON, H., STEIN, J. L. & GESCHWIND, D. H. 2016. Advancing the understanding of autism disease mechanisms through genetics. *Nat Med*, 22, 345-61.
- DE RUBEIS, S., PASCIUTO, E., LI, K. W., FERNANDEZ, E., DI MARINO, D., BUZZI, A., OSTROFF, L. E., KLANN, E., ZWARTKRUIS, F. J., KOMIYAMA, N. H., GRANT, S. G., POUJOL, C., CHOQUET, D., ACHSEL, T., POSTHUMA, D., SMIT, A. B. & BAGNI, C. 2013. CYFIP1 coordinates mRNA translation and cytoskeleton remodeling to ensure proper dendritic spine formation. *Neuron*, 79, 1169-82.
- DECOURT, B., BOULEAU, Y., DULON, D. & HAFIDI, A. 2005. Expression analysis of neuroleukin, calmodulin, cortactin, and Rho7/Rnd2 in the intact and injured mouse brain. *Brain Res Dev Brain Res*, 159, 36-54.
- DERKACH, V. A., OH, M. C., GUIRE, E. S. & SODERLING, T. R. 2007. Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci*, 8, 101-13.
- DESMARAIS, V., GHOSH, M., EDDY, R. & CONDEELIS, J. 2005. Cofilin takes the lead. *Journal of Cell Science*, 118, 19-26.
- DIANO, S., FARR, S. A., BENOIT, S. C., MCNAY, E. C., DA SILVA, I., HORVATH, B., GASKIN, F. S., NONAKA, N., JAEGER, L. B., BANKS, W. A., MORLEY, J. E., PINTO, S., SHERWIN, R. S., XU, L., YAMADA, K. A., SLEEMAN, M. W., TSCHOP, M. H. & HORVATH, T. L. 2006. Ghrelin controls hippocampal spine synapse density and memory performance. *Nat Neurosci*, 9, 381-8.

- DING, J.-D., KENNEDY, M. B. & WEINBERG, R. J. 2013. Subcellular organization of camkii in rat hippocampal pyramidal neurons. *The Journal of comparative neurology*, 521, 3570-83.
- DUAN, X., ZHANG, Y., CHEN, K. L., ZHANG, H. L., WU, L. L., LIU, H. L., WANG, Z. B. & SUN, S. C. 2018. The small GTPase RhoA regulates the LIMK1/2-cofilin pathway to modulate cytoskeletal dynamics in oocyte meiosis. *J Cell Physiol*, 233, 6088-6097.
- DURAND, C. M., PERROY, J., LOLL, F., PERRAIS, D., FAGNI, L., BOURGERON, T., MONTCOUQUIOL, M. & SANS, N. 2012. SHANK3 mutations identified in autism lead to modification of dendritic spine morphology via an actin-dependent mechanism. *Mol Psychiatry*, 17, 71-84.
- EDEN, S., ROHATGI, R., PODTELEJNIKOV, A. V., MANN, M. & KIRSCHNER, M. W. 2002. Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature*, 418, 790-3.
- EHLERS, M. D. 2000. Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting. *Neuron*, 28, 511-25.
- ENDRIS, V., WOGATZKY, B., LEIMER, U., BARTSCH, D., ZATYKA, M., LATIF, F., MAHER, E. R., TARIVERDIAN, G., KIRSCH, S., KARCH, D. & RAPPOLD, G. A. 2002. The novel Rho-GTPase activating gene MEGAP/ srGAP3 has a putative role in severe mental retardation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 11754-9.
- ENGERT, F. & BONHOEFFER, T. 1999. Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature*, 399, 66-70.
- ETHELL, I. M. & PASQUALE, E. B. 2005. Molecular mechanisms of dendritic spine development and remodeling. *Prog Neurobiol*, 75, 161-205.
- ETIENNE-MANNEVILLE, S. & HALL, A. 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature*, 420, 629-35.
- EWERS, H., TADA, T., PETERSEN, J. D., RACZ, B., SHENG, M. & CHOQUET, D. 2014. A Septin-Dependent Diffusion Barrier at Dendritic Spine Necks. *Plos One*, 9.
- FERNANDES, G., YUNIS, E. J., SMITH, J. & GOOD, R. A. 1972. Dietary influence on breeding behavior, hemolytic anemia, and longevity in NZB mice. *Proc Soc Exp Biol Med*, 139, 1189-96.
- FIALA, J. C., ALLWARDT, B. & HARRIS, K. M. 2002. Dendritic spines do not split during hippocampal LTP or maturation. *Nat Neurosci*, 5, 297-8.
- FIFKOVA, E. 1985. Actin in the nervous system. *Brain Res*, 356, 187-215.
- FIFKOVA, E. & DELAY, R. J. 1982. Cytoplasmic actin in neuronal processes as a possible mediator of synaptic plasticity. *J Cell Biol*, 95, 345-50.
- FIFKOVA, E. & MORALES, M. 1992. Actin matrix of dendritic spines, synaptic plasticity, and long-term potentiation. *Int Rev Cytol*, 139, 267-307.
- FISCHER, M., KAECH, S., WAGNER, U., BRINKHAUS, H. & MATUS, A. 2000. Glutamate receptors regulate actin-based plasticity in dendritic spines. *Nat Neurosci*, 3, 887-94.
- FONSECA, R. 2012. Activity-dependent actin dynamics are required for the maintenance of long-term plasticity and for synaptic capture. *Eur J Neurosci*, 35, 195-206.
- FONTAN-LOZANO, A., SAEZ-CASSANELLI, J. L., INDA, M. C., DE LOS SANTOS-ARTEAGA, M., SIERRA-DOMINGUEZ, S. A., LOPEZ-LLUCH, G., DELGADO-GARCIA, J. M. & CARRION, A. M. 2007. Caloric restriction increases learning consolidation and facilitates synaptic plasticity through mechanisms dependent on NR2B subunits of the NMDA receptor. *J Neurosci*, 27, 10185-95.
- FRANGISKAKIS, J. M., EWART, A. K., MORRIS, C. A., MERVIS, C. B., BERTRAND, J., ROBINSON, B. F., KLEIN, B. P., ENSING, G. J., EVERETT, L. A., GREEN, E. D., PROSCHEL, C., GUTOWSKI, N. J., NOBLE, M., ATKINSON, D. L., ODELBURG, S. J. & KEATING, M. T. 1996. LIM-kinase1 hemizyosity implicated in impaired visuospatial constructive cognition. *Cell*, 86, 59-69.
- FREMEAU, R. T., JR., TROYER, M. D., PAHNER, I., NYGAARD, G. O., TRAN, C. H., REIMER, R. J., BELLOCCHIO, E. E., FORTIN, D., STORM-MATHISEN, J. & EDWARDS, R. H. 2001. The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. *Neuron*, 31, 247-60.
- FROMER, M., POCKLINGTON, A. J., KAVANAGH, D. H., WILLIAMS, H. J., DWYER, S., GORMLEY, P., GEORGIEVA, L., REES, E., PALTA, P., RUDERFER, D. M., CARRERA, N., HUMPHREYS, I., JOHNSON, J. S., ROUSSOS, P., BARKER, D. D., BANKS, E., MILANOVA, V., GRANT, S. G., HANNON, E., ROSE, S. A., CHAMBERT, K., MAHAJAN, M., SCOLNICK, E. M., MORAN, J. L., KIROV, G., PALOTIE, A., MCCARROLL, S. A., HOLMANS, P., SKLAR, P., OWEN, M. J., PURCELL, S. M. & O'DONOVAN, M. C. 2014. De novo mutations in schizophrenia implicate synaptic networks. *Nature*, 506, 179-84.
- FROST, N. A., KERR, J. M., LU, H. E. & BLANPIED, T. A. 2010a. A network of networks: cytoskeletal control of compartmentalized function within dendritic spines. *Curr Opin Neurobiol*, 20, 578-87.
- FROST, N. A., SHROFF, H., KONG, H., BETZIG, E. & BLANPIED, T. A. 2010b. Single-molecule discrimination of discrete perisynaptic and distributed sites of actin filament assembly within dendritic spines. *Neuron*, 67, 86-99.

- FU, A. K. & IP, N. Y. 2007. Cyclin-dependent kinase 5 links extracellular cues to actin cytoskeleton during dendritic spine development. *Cell Adh Migr*, 1, 110-2.
- 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, 447-60.
- GAIDAROV, I., SANTINI, F., WARREN, R. A. & KEEN, J. H. 1999. Spatial control of coated-pit dynamics in living cells. *Nature cell biology*, 1, 1-7.
- GAINETDINOV, R. R., MOHN, A. R. & CARON, M. G. 2001. Genetic animal models: focus on schizophrenia. *Trends Neurosci*, 24, 527-33.
- GALLETTA, B. J., CHUANG, D. Y. & COOPER, J. A. 2008. Distinct roles for Arp2/3 regulators in actin assembly and endocytosis. *PLoS Biol*, 6, e1.
- GANESHINA, O., BERRY, R. W., PETRALIA, R. S., NICHOLSON, D. A. & GEINISMAN, Y. 2004. Differences in the expression of AMPA and NMDA receptors between axospinous perforated and nonperforated synapses are related to the configuration and size of postsynaptic densities. *J Comp Neurol*, 468, 86-95.
- GDALYAHU, A., LAZARO, M., PENAGARIKANO, O., GOLSHANI, P., TRACHTENBERG, J. T. & GESCHWIND, D. H. 2015. The Autism Related Protein Contactin-Associated Protein-Like 2 (CNTNAP2) Stabilizes New Spines: An In Vivo Mouse Study. *PLoS One*, 10, e0125633.
- GEINISMAN, Y., BERRY, R. W., DISTERHOFT, J. F., POWER, J. M. & VAN DER ZEE, E. A. 2001. Associative learning elicits the formation of multiple-synapse boutons. *J Neurosci*, 21, 5568-73.
- GEINISMAN, Y., MORRELL, F. & DETOLEDO-MORRELL, L. 1989. Perforated synapses on double-headed dendritic spines: a possible structural substrate of synaptic plasticity. *Brain Res*, 480, 326-9.
- GESCHWIND, D. H. 2011. Genetics of autism spectrum disorders. *Trends Cogn Sci*, 15, 409-16.
- GILMAN, S. R., IOSSIFOV, I., LEVY, D., RONEMUS, M., WIGLER, M. & VITKUP, D. 2011. Rare de novo variants associated with autism implicate a large functional network of genes involved in formation and function of synapses. *Neuron*, 70, 898-907.
- GLAUSIER, J. R. & LEWIS, D. A. 2013. Dendritic spine pathology in schizophrenia. *Neuroscience*, 251, 90-107.
- GOLEY, E. D. & WELCH, M. D. 2006. The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 713-26.
- GONZALEZ-BILLAULT, C., MUNOZ-LLANCAO, P., HENRIQUEZ, D. R., WOJNACKI, J., CONDE, C. & CACERES, A. 2012. The role of small GTPases in neuronal morphogenesis and polarity. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 69, 464-85.
- GOURNIER, H., GOLEY, E. D., NIEDERSTRASSER, H., TRINH, T. & WELCH, M. D. 2001. Reconstitution of human Arp2/3 complex reveals critical roles of individual subunits in complex structure and activity. *Mol Cell*, 8, 1041-52.
- GOVEK, E. E., NEWWEY, S. E., AKERMAN, C. J., CROSS, J. R., VAN DER VEKEN, L. & VAN AELST, L. 2004. The X-linked mental retardation protein oligophrenin-1 is required for dendritic spine morphogenesis. *Nat Neurosci*, 7, 364-72.
- GRAY, N. W., FOURGEAUD, L., HUANG, B., CHEN, J., CAO, H., OSWALD, B. J., HEMAR, A. & MCNIVEN, M. A. 2003. Dynamin 3 is a component of the postsynapse, where it interacts with mGluR5 and Homer. *Current biology : CB*, 13, 510-5.
- GRAY, N. W., KRUCHTEN, A. E., CHEN, J. & MCNIVEN, M. A. 2005a. A dynamin-3 spliced variant modulates the actin/cortactin-dependent morphogenesis of dendritic spines. *Journal of cell science*, 118, 1279-90.
- GRAY, N. W., KRUCHTEN, A. E., CHEN, J. & MCNIVEN, M. A. 2005b. A dynamin-3 spliced variant modulates the actin/cortactin-dependent morphogenesis of dendritic spines. *J Cell Sci*, 118, 1279-90.
- GRILLO, C. A., PIROLI, G. G., EVANS, A. N., MACHT, V. A., WILSON, S. P., SCOTT, K. A., SAKAI, R. R., MOTT, D. D. & REAGAN, L. P. 2011a. Obesity/hyperleptinemic phenotype adversely affects hippocampal plasticity: effects of dietary restriction. *Physiol Behav*, 104, 235-41.
- GRILLO, C. A., PIROLI, G. G., JUNOR, L., WILSON, S. P., MOTT, D. D., WILSON, M. A. & REAGAN, L. P. 2011b. Obesity/hyperleptinemic phenotype impairs structural and functional plasticity in the rat hippocampus. *Physiol Behav*, 105, 138-44.
- GROSSMANN, T. 2013. The role of medial prefrontal cortex in early social cognition. *Front Hum Neurosci*, 7, 340.
- GROVE, M., DEMYANENKO, G., ECHARRI, A., ZIPFEL, P. A., QUIROZ, M. E., RODRIGUIZ, R. M., PLAYFORD, M., MARTENSEN, S. A., ROBINSON, M. R., WETSEL, W. C., MANESS, P. F. & PENDERGAST, A. M. 2004. ABI2-deficient mice exhibit defective cell migration, aberrant dendritic spine morphogenesis, and deficits in learning and memory. *Mol Cell Biol*, 24, 10905-22.
- GU, Z., JIANG, Q., FU, A. K., IP, N. Y. & YAN, Z. 2005. Regulation of NMDA receptors by neuregulin signaling in prefrontal cortex. *J Neurosci*, 25, 4974-84.

- GUNGABISSOON, R. A. & BAMBURG, J. R. 2003. Regulation of growth cone actin dynamics by ADF/cofilin. *J Histochem Cytochem*, 51, 411-20.
- HADITSCH, U., LEONE, D. P., FARINELLI, M., CHROSTEK-GRASHOFF, A., BRAKEBUSCH, C., MANSUY, I. M., MCCONNELL, S. K. & PALMER, T. D. 2009. A central role for the small GTPase Rac1 in hippocampal plasticity and spatial learning and memory. *Mol Cell Neurosci*, 41, 409-19.
- HAECKEL, A., AHUJA, R., GUNDELINGER, E. D., QUALMANN, B. & KESSELS, M. M. 2008. The actin-binding protein Abp1 controls dendritic spine morphology and is important for spine head and synapse formation. *J Neurosci*, 28, 10031-44.
- HALPAIN, S. 2000. Actin and the agile spine: how and why do dendritic spines dance? *Trends Neurosci*, 23, 141-6.
- HALPAIN, S., HIPOLITO, A. & SAFFER, L. 1998. Regulation of F-actin stability in dendritic spines by glutamate receptors and calcineurin. *J Neurosci*, 18, 9835-44.
- HAN, K., HOLDER, J. L., JR., SCHAAF, C. P., LU, H., CHEN, H., KANG, H., TANG, J., WU, Z., HAO, S., CHEUNG, S. W., YU, P., SUN, H., BREMAN, A. M., PATEL, A., LU, H. C. & ZOGHBI, H. Y. 2013. SHANK3 overexpression causes manic-like behaviour with unique pharmacogenetic properties. *Nature*, 503, 72-7.
- HANCOCK, C. R., HAN, D. H., HIGASHIDA, K., KIM, S. H. & HOLLOSZY, J. O. 2011. Does calorie restriction induce mitochondrial biogenesis? A reevaluation. *FASEB J*, 25, 785-91.
- HANSE, E., TAIRA, T., LAURI, S. & GROC, L. 2009. Glutamate synapse in developing brain: an integrative perspective beyond the silent state. *Trends Neurosci*, 32, 532-7.
- HARRIS, K. M., JENSEN, F. E. & TSAO, B. 1992. Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *J Neurosci*, 12, 2685-705.
- HARRIS, K. M. & STEVENS, J. K. 1989. Dendritic spines of CA 1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *J Neurosci*, 9, 2982-97.
- HARRIS, K. M. & WEINBERG, R. J. 2012. Ultrastructure of synapses in the mammalian brain. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4.
- HARVEY, C. D. & SVOBODA, K. 2007. Locally dynamic synaptic learning rules in pyramidal neuron dendrites. *Nature*, 450, 1195-200.
- HASHIMOTO, T. & WATANABE, S. 2005. Chronic food restriction enhances memory in mice--analysis with matched drive levels. *Neuroreport*, 16, 1129-33.
- HAYASHI-TAKAGI, A., TAKAKI, M., GRAZIANE, N., SESHADRI, S., MURDOCH, H., DUNLOP, A. J., MAKINO, Y., SESHADRI, A. J., ISHIZUKA, K., SRIVASTAVA, D. P., XIE, Z., BARABAN, J. M., HOUSLAY, M. D., TOMODA, T., BRANDON, N. J., KAMIYA, A., YAN, Z., PENZES, P. & SAWA, A. 2010. Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1) regulates spines of the glutamate synapse via Rac1. *Nat Neurosci*, 13, 327-32.
- HAYASHI, M. K., AMES, H. M. & HAYASHI, Y. 2006. Tetrameric hub structure of postsynaptic scaffolding protein homer. *J Neurosci*, 26, 8492-501.
- HAYASHI, Y. & MAJEWSKA, A. K. 2005. Dendritic spine geometry: functional implication and regulation. *Neuron*, 46, 529-32.
- HAZAI, D., SZUDOCZKI, R., DING, J., SODERLING, S. H., WEINBERG, R. J., SOTONYI, P. & RACZ, B. 2013. Ultrastructural abnormalities in CA1 hippocampus caused by deletion of the actin regulator WAVE-1. *PloS one*, 8, e75248.
- HE, Y., JANSSEN, W. G., ROTHSTEIN, J. D. & MORRISON, J. H. 2000. Differential synaptic localization of the glutamate transporter EAAC1 and glutamate receptor subunit GluR2 in the rat hippocampus. *J Comp Neurol*, 418, 255-69.
- HEASMAN, S. J. & RIDLEY, A. J. 2008. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 690-701.
- HEINE, M., GROC, L., FRISCHKNECHT, R., BEIQUÉ, J. C., LOUNIS, B., RUMBAUGH, G., HUGANIR, R. L., COGNÉ, L. & CHOQUET, D. 2008. Surface mobility of postsynaptic AMPARs tunes synaptic transmission. *Science*, 320, 201-5.
- HELGESON, L. A. & NOLEN, B. J. 2013. Mechanism of synergistic activation of Arp2/3 complex by cortactin and N-WASP. *eLife*, 2, e00884.
- HERCULANO-HOUZEL, S. 2012. The remarkable, yet not extraordinary, human brain as a scaled-up primate brain and its associated cost. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109 Suppl 1, 10661-8.
- HERCULANO-HOUZEL, S., MOTA, B. & LENT, R. 2006. Cellular scaling rules for rodent brains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 12138-43.

- HERING, H. & SHENG, M. 2003. Activity-dependent redistribution and essential role of cortactin in dendritic spine morphogenesis. *J Neurosci*, 23, 11759-69.
- HONKURA, N., MATSUZAKI, M., NOGUCHI, J., ELLIS-DAVIES, G. C. R. & KASAI, H. 2008. The subspline organization of actin fibers regulates the structure and plasticity of dendritic spines. *Neuron*, 57, 719-729.
- HORI, N., HIROTSU, I., DAVIS, P. J. & CARPENTER, D. O. 1992. Long-term potentiation is lost in aged rats but preserved by calorie restriction. *Neuroreport*, 3, 1085-8.
- HORNE, E. A. & DELL'ACQUA, M. L. 2007. Phospholipase C is required for changes in postsynaptic structure and function associated with NMDA receptor-dependent long-term depression. *Journal of Neuroscience*, 27, 3523-3534.
- HOTULAINEN, P., LLANO, O., SMIRNOV, S., TANHUANPAA, K., FAIX, J., RIVERA, C. & LAPPALAINEN, P. 2009. Defining mechanisms of actin polymerization and depolymerization during dendritic spine morphogenesis. *Journal of Cell Biology*, 185, 323-339.
- HUSI, H. & GRANT, S. G. 2001. Isolation of 2000-kDa complexes of N-methyl-D-aspartate receptor and postsynaptic density 95 from mouse brain. *Journal of neurochemistry*, 77, 281-91.
- HYMAN, S. E. 2014. Perspective: Revealing molecular secrets. *Nature*, 508, S20.
- IDROBO, F., NANDY, K., MOSTOFSKY, D. I., BLATT, L. & NANDY, L. 1987. Dietary restriction: effects on radial maze learning and lipofuscin pigment deposition in the hippocampus and frontal cortex. *Arch Gerontol Geriatr*, 6, 355-62.
- IOSSIFOV, I., O'ROAK, B. J., SANDERS, S. J., RONEMUS, M., KRUMM, N., LEVY, D., STESSMAN, H. A., WITHERSPOON, K. T., VIVES, L., PATTERSON, K. E., SMITH, J. D., PAEPER, B., NICKERSON, D. A., DEA, J., DONG, S., GONZALEZ, L. E., MANDELL, J. D., MANE, S. M., MURTHA, M. T., SULLIVAN, C. A., WALKER, M. F., WAQAR, Z., WEI, L., WILLSEY, A. J., YAMROM, B., LEE, Y. H., GRABOWSKA, E., DALKIC, E., WANG, Z., MARKS, S., ANDREWS, P., LEOTTA, A., KENDALL, J., HAKKER, I., ROSENBAUM, J., MA, B., RODGERS, L., TROGE, J., NARZISI, G., YOON, S., SCHATZ, M. C., YE, K., MCCOMBIE, W. R., SHENDURE, J., EICHLER, E. E., STATE, M. W. & WIGLER, M. 2014. The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. *Nature*, 515, 216-21.
- ITO, H., MORISHITA, R., SHINODA, T., IWAMOTO, I., SUDO, K., OKAMOTO, K. & NAGATA, K. 2010. Dysbindin-1, a schizophrenia-related molecule, is involved in the regulation of neuronal dendritic development. *Mol Psychiatry*, 15, 969.
- ITO, M. 1998. The cerebellum: from structure to control. *Trends in cognitive sciences*, 2, 371.
- ITO, M., YAMAGUCHI, K., NAGAO, S. & YAMAZAKI, T. 2014. Long-term depression as a model of cerebellar plasticity. *Prog Brain Res*, 210, 1-30.
- IZEDDIN, I., SPECHT, C. G., LELEK, M., DARZACQ, X., TRILLER, A., ZIMMER, C. & DAHAN, M. 2011. Super-resolution dynamic imaging of dendritic spines using a low-affinity photoconvertible actin probe. *PLoS One*, 6, e15611.
- JONAS, O. & DUSCHL, C. 2010. Force propagation and force generation in cells. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 67, 555-63.
- JONES, T. A., KLINTSOVA, A. Y., KILMAN, V. L., SIREVAAG, A. M. & GREENOUGH, W. T. 1997. Induction of multiple synapses by experience in the visual cortex of adult rats. *Neurobiol Learn Mem*, 68, 13-20.
- JORDAN, B. A., FERNHOLZ, B. D., BOUSSAC, M., XU, C., GRIGOREAN, G., ZIFF, E. B. & NEUBERT, T. A. 2004. Identification and verification of novel rodent postsynaptic density proteins. *Mol Cell Proteomics*, 3, 857-71.
- JORNTELL, H. & HANSEL, C. 2006. Synaptic memories upside down: bidirectional plasticity at cerebellar parallel fiber-Purkinje cell synapses. *Neuron*, 52, 227-38.
- JUNG, M., KIM, D. & MUN, J. Y. 2020. Direct Visualization of Actin Filaments and Actin-Binding Proteins in Neuronal Cells. *Front Cell Dev Biol*, 8, 588556.
- JURGENSEN, S. & CASTILLO, P. E. 2015. Selective Dysregulation of Hippocampal Inhibition in the Mouse Lacking Autism Candidate Gene CNTNAP2. *J Neurosci*, 35, 14681-7.
- KAKSONEN, M., TORET, C. P. & DRUBIN, D. G. 2006. Harnessing actin dynamics for clathrin-mediated endocytosis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 7, 404-14.
- KANDEL, E. R. 2013. Principles of neural science. 5th ed. New York: McGraw-Hill.
- KASAI, H., HAYAMA, T., ISHIKAWA, M., WATANABE, S., YAGISHITA, S. & NOGUCHI, J. 2010. Learning rules and persistence of dendritic spines. *Eur J Neurosci*, 32, 241-9.
- KENNEDY, M. J. & EHLERS, M. D. 2006. Organelles and trafficking machinery for postsynaptic plasticity. *Annual review of neuroscience*, 29, 325-62.
- KERR, J. M. & BLANPIED, T. A. 2012. Subsynaptic AMPA receptor distribution is acutely regulated by actin-driven reorganization of the postsynaptic density. *J Neurosci*, 32, 658-73.

- KESSELS, M. M., SCHWINTZER, L., SCHLOBINSKI, D. & QUALMANN, B. 2011. Controlling actin cytoskeletal organization and dynamics during neuronal morphogenesis. *Eur J Cell Biol*, 90, 926-33.
- KHARAZIA, V. N. & WEINBERG, R. J. 1997. Tangential synaptic distribution of NMDA and AMPA receptors in rat neocortex. *Neuroscience letters*, 238, 41-4.
- KIEHART, D. P. & FRANKE, J. D. 2002. Actin dynamics: the arp2/3 complex branches out. *Curr Biol*, 12, R557-9.
- KIM, I. H., RACZ, B., WANG, H., BURIANEK, L., WEINBERG, R., YASUDA, R., WETSEL, W. C. & SODERLING, S. H. 2013. Disruption of Arp2/3 results in asymmetric structural plasticity of dendritic spines and progressive synaptic and behavioral abnormalities. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 33, 6081-92.
- KIM, I. H., ROSSI, M. A., ARYAL, D. K., RACZ, B., KIM, N., UEZU, A., WANG, F., WETSEL, W. C., WEINBERG, R. J., YIN, H. & SODERLING, S. H. 2015. Spine pruning drives antipsychotic-sensitive locomotion via circuit control of striatal dopamine. *Nat Neurosci*, 18, 883-91.
- KIM, J. W., PARK, K., KANG, R. J., GONZALES, E. L. T., KIM, D. G., OH, H. A., SEUNG, H., KO, M. J., KWON, K. J., KIM, K. C., LEE, S. H., CHUNG, C. & SHIN, C. Y. 2019. Pharmacological modulation of AMPA receptor rescues social impairments in animal models of autism. *Neuropsychopharmacology*, 44, 314-323.
- KIM, S., BURETTE, A., CHUNG, H. S., KWON, S.-K., WOO, J., LEE, H. W., KIM, K., KIM, H., WEINBERG, R. J. & KIM, E. 2006a. NGL family PSD-95-interacting adhesion molecules regulate excitatory synapse formation. *Nature neuroscience*, 9, 1294-301.
- KIM, Y., SUNG, J. Y., CEGLIA, I., LEE, K. W., AHN, J. H., HALFORD, J. M., KIM, A. M., KWAK, S. P., PARK, J. B., HO RYU, S., SCHENCK, A., BARDONI, B., SCOTT, J. D., NAIRN, A. C. & GREENGARD, P. 2006b. Phosphorylation of WAVE1 regulates actin polymerization and dendritic spine morphology. *Nature*, 442, 814-7.
- KIROV, G., POCKLINGTON, A. J., HOLMANS, P., IVANOV, D., IKEDA, M., RUDERFER, D., MORAN, J., CHAMBERT, K., TONCHEVA, D., GEORGIEVA, L., GROZEVA, D., FJODOROVA, M., WOLLERTON, R., REES, E., NIKOLOV, I., VAN DE LAGEMAAT, L. N., BAYES, A., FERNANDEZ, E., OLASON, P. I., BOTTCHE, Y., KOMIYAMA, N. H., COLLINS, M. O., CHOUDHARY, J., STEFANSSON, K., STEFANSSON, H., GRANT, S. G., PURCELL, S., SKLAR, P., O'DONOVAN, M. C. & OWEN, M. J. 2012. De novo CNV analysis implicates specific abnormalities of postsynaptic signalling complexes in the pathogenesis of schizophrenia. *Mol Psychiatry*, 17, 142-53.
- KNOTT, G. W., HOLTMAAT, A., WILBRECHT, L., WELKER, E. & SVOBODA, K. 2006. Spine growth precedes synapse formation in the adult neocortex in vivo. *Nat Neurosci*, 9, 1117-24.
- KOLESKE, A. J. 2013. Molecular mechanisms of dendrite stability. *Nat Rev Neurosci*, 14, 536-50.
- KOROBOVA, F. & SVITKINA, T. 2010. Molecular architecture of synaptic actin cytoskeleton in hippocampal neurons reveals a mechanism of dendritic spine morphogenesis. *Mol Biol Cell*, 21, 165-76.
- KRISHNAN, A., ZHANG, R., YAO, V., THEESFELD, C. L., WONG, A. K., TADYCH, A., VOLFOVSKY, N., PACKER, A., LASH, A. & TROYANSKAYA, O. G. 2016. Genome-wide prediction and functional characterization of the genetic basis of autism spectrum disorder. *Nat Neurosci*, 19, 1454-1462.
- KRUCHTEN, A. E. & MCNIVEN, M. A. 2006. Dynamin as a mover and pincher during cell migration and invasion. *Journal of cell science*, 119, 1683-90.
- KRUEGER, E. W., ORTH, J. D., CAO, H. & MCNIVEN, M. A. 2003. A dynamin-cortactin-Arp2/3 complex mediates actin reorganization in growth factor-stimulated cells. *Mol Biol Cell*, 14, 1085-96.
- LAMBERT, A. J., WANG, B., YARDLEY, J., EDWARDS, J. & MERRY, B. J. 2004. The effect of aging and caloric restriction on mitochondrial protein density and oxygen consumption. *Exp Gerontol*, 39, 289-95.
- LARUELLE, M., ABI-DARGHAM, A., VAN DYCK, C. H., GIL, R., D'SOUZA, C. D., ERDOS, J., MCCANCE, E., ROSENBLATT, W., FINGADO, C., ZOGHBI, S. S., BALDWIN, R. M., SEIBYL, J. P., KRYSTAL, J. H., CHARNEY, D. S. & INNIS, R. B. 1996. Single photon emission computerized tomography imaging of amphetamine-induced dopamine release in drug-free schizophrenic subjects. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 9235-40.
- LAZARO, M. T., TAXIDIS, J., SHUMAN, T., BACHMUTSKY, I., IKRAR, T., SANTOS, R., MARCELLO, G. M., MYLAVARAPU, A., CHANDRA, S., FOREMAN, A., GOLI, R., TRAN, D., SHARMA, N., AZHDAM, M., DONG, H. M., CHOE, K. Y., PENAGARIKANO, O., MASMANIDIS, S. C., RACZ, B., XU, X. M., GESCHWIND, D. H. & GOLSHANI, P. 2019. Reduced Prefrontal Synaptic Connectivity and Disturbed Oscillatory Population Dynamics in the CNTNAP2 Model of Autism. *Cell Reports*, 27, 2567-+.
- LEE-HOEFELICH, S. T., CAUSING, C. G., PODKOWA, M., ZHAO, X., WRANA, J. L. & ATTISANO, L. 2004. Activation of LIMK1 by binding to the BMP receptor, BMPRII, regulates BMP-dependent dendritogenesis. *EMBO J*, 23, 4792-801.
- LEE, K. J., KIM, H. & RHYU, I. J. 2005. The roles of dendritic spine shapes in Purkinje cells. *Cerebellum*, 4, 97-104.
- LEE, S. H., DECANDIA, T. R., RIPKE, S., YANG, J., SCHIZOPHRENIA PSYCHIATRIC GENOME-WIDE ASSOCIATION STUDY, C., INTERNATIONAL SCHIZOPHRENIA, C., MOLECULAR GENETICS OF SCHIZOPHRENIA, C., SULLIVAN, P. F., GODDARD, M. E., KELLER, M. C., VISSCHER, P. M. & WRAY, N. R. 2012. Estimating the



- proportion of variation in susceptibility to schizophrenia captured by common SNPs. *Nat Genet*, 44, 247-50.
- LENA, J. Y., BAMBURG, J. R., RABIE, A. & FAIVRE-SARRAILH, C. 1991. Actin-depolymerizing factor (ADF) in the cerebellum of the developing rat: a quantitative and immunocytochemical study. *J Neurosci Res*, 30, 18-27.
- LEPPA, V. M., KRAVITZ, S. N., MARTIN, C. L., ANDRIEUX, J., LE CAIGNEC, C., MARTIN-COIGNARD, D., DYBUNCIO, C., SANDERS, S. J., LOWE, J. K., CANTOR, R. M. & GESCHWIND, D. H. 2016. Rare Inherited and De Novo CNVs Reveal Complex Contributions to ASD Risk in Multiplex Families. *Am J Hum Genet*, 99, 540-554.
- LI, K. W., HORNSHAW, M. P., VAN DER SCHORS, R. C., WATSON, R., TATE, S., CASSETTA, B., JIMENEZ, C. R., GOUWENBERG, Y., GUNDELFINGER, E. D., SMALLA, K. H. & SMIT, A. B. 2004. Proteomics analysis of rat brain postsynaptic density. Implications of the diverse protein functional groups for the integration of synaptic physiology. *J Biol Chem*, 279, 987-1002.
- LI, L., WANG, Z. & ZUO, Z. 2013. Chronic intermittent fasting improves cognitive functions and brain structures in mice. *PLoS One*, 8, e66069.
- LIMA CALDEIRA, G., PECA, J. & CARVALHO, A. L. 2019. New insights on synaptic dysfunction in neuropsychiatric disorders. *Curr Opin Neurobiol*, 57, 62-70.
- LIN, H., HUGANIR, R. & LIAO, D. 2004. Temporal dynamics of NMDA receptor-induced changes in spine morphology and AMPA receptor recruitment to spines. *Biochem Biophys Res Commun*, 316, 501-11.
- LISKA, A., BERTERO, A., GOMOLKA, R., SABBIONI, M., GALBUSERA, A., BARSOTTI, N., PANZERI, S., SCATTONI, M. L., PASQUALETTI, M. & GOZZI, A. 2018. Homozygous Loss of Autism-Risk Gene CNTNAP2 Results in Reduced Local and Long-Range Prefrontal Functional Connectivity. *Cereb Cortex*, 28, 1141-1153.
- LIU, D., PITTA, M. & MATTSON, M. P. 2008. Preventing NAD(+) depletion protects neurons against excitotoxicity: bioenergetic effects of mild mitochondrial uncoupling and caloric restriction. *Ann N Y Acad Sci*, 1147, 275-82.
- LORINCZ, A., NOTOMI, T., TAMAS, G., SHIGEMOTO, R. & NUSSER, Z. 2002. Polarized and compartment-dependent distribution of HCN1 in pyramidal cell dendrites. *Nat Neurosci*, 5, 1185-93.
- LU, J., HELTON, T. D., BLANPIED, T. A., RACZ, B., NEWPHER, T. M., WEINBERG, R. J. & EHLERS, M. D. 2007. Postsynaptic positioning of endocytic zones and AMPA receptor cycling by physical coupling of dynamin-3 to Homer. *Neuron*, 55, 874-89.
- LUSCHER, C. & MALENKA, R. C. 2012. NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4.
- LUSCHER, C., XIA, H., BEATTIE, E. C., CARROLL, R. C., VON ZASTROW, M., MALENKA, R. C. & NICOLL, R. A. 1999. Role of AMPA receptor cycling in synaptic transmission and plasticity. *Neuron*, 24, 649-58.
- LYNCH, M. A. 2004. Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev*, 84, 87-136.
- MACHESKY, L. M. & INSALL, R. H. 1998. Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr Biol*, 8, 1347-56.
- MAKINO, H. & MALINOW, R. 2009. AMPA receptor incorporation into synapses during LTP: the role of lateral movement and exocytosis. *Neuron*, 64, 381-90.
- MALDONADO-BAEZ, L. & WENDLAND, B. 2006. Endocytic adaptors: recruiters, coordinators and regulators. *Trends in cell biology*, 16, 505-13.
- MALHOTRA, D. & SEBAT, J. 2012. CNVs: harbingers of a rare variant revolution in psychiatric genetics. *Cell*, 148, 1223-41.
- MARKHAM, J. A. & FIFKOVA, E. 1986. Actin filament organization within dendrites and dendritic spines during development. *Brain Res*, 392, 263-9.
- MARRA, V., BURDEN, J. J., THORPE, J. R., SMITH, I. T., SMITH, S. L., HAUSSER, M., BRANCO, T. & STARAS, K. 2012. A preferentially segregated recycling vesicle pool of limited size supports neurotransmission in native central synapses. *Neuron*, 76, 579-89.
- MARTIN, A. C., WELCH, M. D. & DRUBIN, D. G. 2006. Arp2/3 ATP hydrolysis-catalysed branch dissociation is critical for endocytic force generation. *Nat Cell Biol*, 8, 826-33.
- MARTINEZ, M. C., OCHIISHI, T., MAJEWSKI, M. & KOSIK, K. S. 2003. Dual regulation of neuronal morphogenesis by a delta-catenin-cortactin complex and Rho. *The Journal of cell biology*, 162, 99-111.
- MASORO, E. J. 2001. Physiology of aging. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*, 11 Suppl, S218-22.
- MATSUZAKI, M., ELLIS-DAVIES, G. C., 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, 1086-92.
- MATSUZAKI, M., HONKURA, N., ELLIS-DAVIES, G. C. & KASAI, H. 2004. Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature*, 429, 761-6.

- MATTSON, M. P. 2010. The impact of dietary energy intake on cognitive aging. *Front Aging Neurosci*, 2, 5.
- MATUS, A. 2000. Actin-based plasticity in dendritic spines. *Science*, 290, 754-8.
- MATUS, A. 2005. Growth of dendritic spines: a continuing story. *Curr Opin Neurobiol*, 15, 67-72.
- MAY, R. C. 2001. The Arp2/3 complex: a central regulator of the actin cytoskeleton. *Cell Mol Life Sci*, 58, 1607-26.
- MCCARROLL, S. A. & HYMAN, S. E. 2013. Progress in the genetics of polygenic brain disorders: significant new challenges for neurobiology. *Neuron*, 80, 578-87.
- MCINTOSH, A. M., OWENS, D. C., MOORHEAD, W. J., WHALLEY, H. C., STANFIELD, A. C., HALL, J., JOHNSTONE, E. C. & LAWRIE, S. M. 2011. Longitudinal volume reductions in people at high genetic risk of schizophrenia as they develop psychosis. *Biol Psychiatry*, 69, 953-8.
- MCKINNEY, R. A. 2010. Excitatory amino acid involvement in dendritic spine formation, maintenance and remodelling. *J Physiol*, 588, 107-16.
- MEGIAS, M., EMRI, Z., FREUND, T. F. & GULYAS, A. I. 2001. Total number and distribution of inhibitory and excitatory synapses on hippocampal CA1 pyramidal cells. *Neuroscience*, 102, 527-40.
- MENG, Y., TAKAHASHI, H., MENG, J., ZHANG, Y., LU, G., ASRAR, S., NAKAMURA, T. & JIA, Z. 2004. Regulation of ADF/cofilin phosphorylation and synaptic function by LIM-kinase. *Neuropharmacology*, 47, 746-54.
- MENG, Y., ZHANG, Y., TREGOUBOV, V., JANUS, C., CRUZ, L., JACKSON, M., LU, W. Y., MACDONALD, J. F., WANG, J. Y., FALLS, D. L. & JIA, Z. 2002. Abnormal spine morphology and enhanced LTP in LIMK-1 knockout mice. *Neuron*, 35, 121-33.
- MERRIFIELD, C. J., FELDMAN, M. E., WAN, L. & ALMERS, W. 2002. Imaging actin and dynamin recruitment during invagination of single clathrin-coated pits. *Nat Cell Biol*, 4, 691-8.
- MEYER, G. & FELDMAN, E. L. 2002. Signaling mechanisms that regulate actin-based motility processes in the nervous system. *J Neurochem*, 83, 490-503.
- MIKI, H. & TAKENAWA, T. 2003. Regulation of actin dynamics by WASP family proteins. *J Biochem*, 134, 309-13.
- MORETTO, E. & PASSAFARO, M. 2018. Recent Findings on AMPA Receptor Recycling. *Front Cell Neurosci*, 12, 286.
- MORISHITA, W., MARIE, H. & MALENKA, R. C. 2005. Distinct triggering and expression mechanisms underlie LTD of AMPA and NMDA synaptic responses. *Nat Neurosci*, 8, 1043-50.
- MORIYAMA, K., NISHIDA, E., YONEZAWA, N., SAKAI, H., MATSUMOTO, S., IIDA, K. & YAHARA, I. 1990. Destrin, a mammalian actin-depolymerizing protein, is closely related to cofilin. Cloning and expression of porcine brain destrin cDNA. *The Journal of biological chemistry*, 265, 5768-73.
- MOUSAVI, S. A., MALEROD, L., BERG, T. & KJEKEN, R. 2004. Clathrin-dependent endocytosis. *The Biochemical journal*, 377, 1-16.
- MULKEY, R. M., ENDO, S., SHENOLIKAR, S. & MALENKA, R. C. 1994. Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression. *Nature*, 369, 486-8.
- MULLINS, R. D. & POLLARD, T. D. 1999. Structure and function of the Arp2/3 complex. *Curr Opin Struct Biol*, 9, 244-9.
- MULLINS, R. D., STAFFORD, W. F. & POLLARD, T. D. 1997. Structure, subunit topology, and actin-binding activity of the Arp2/3 complex from *Acanthamoeba*. *J Cell Biol*, 136, 331-43.
- MURAKOSHI, H., WANG, H. & YASUDA, R. 2011. Local, persistent activation of Rho GTPases during plasticity of single dendritic spines. *Nature*, 472, 100-4.
- MURAKOSHI, H. & YASUDA, R. 2012. Postsynaptic signaling during plasticity of dendritic spines. *Trends Neurosci*, 35, 135-43.
- MURRAY, S., TULLOCH, A., GOLD, M. S. & AVENA, N. M. 2014. Hormonal and neural mechanisms of food reward, eating behaviour and obesity. *Nat Rev Endocrinol*, 10, 540-52.
- NAISBITT, S., KIM, E., TU, J. C., XIAO, B., SALA, C., VALTSCHANOFF, J., WEINBERG, R. J., WORLEY, P. F. & SHENG, M. 1999. Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin. *Neuron*, 23, 569-82.
- NAKAMURA, Y., WOOD, C. L., PATTON, A. P., JAAFARI, N., HENLEY, J. M., MELLOR, J. R. & HANLEY, J. G. 2011. PICK1 inhibition of the Arp2/3 complex controls dendritic spine size and synaptic plasticity. *Embo Journal*, 30, 719-730.
- NAKAYAMA, A. Y., HARMS, M. B. & LUO, L. 2000. Small GTPases Rac and Rho in the maintenance of dendritic spines and branches in hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci*, 20, 5329-38.
- NEBL, G., MEUER, S. C. & SAMSTAG, Y. 1996. Dephosphorylation of serine 3 regulates nuclear translocation of cofilin. *J Biol Chem*, 271, 26276-80.
- NEUHOFF, H., ROEPER, J. & SCHWEIZER, M. 1999. Activity-dependent formation of perforated synapses in cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci*, 11, 4241-50.

- NEUHOFF, H., SASSOE-POGNETTO, M., PANZANELLI, P., MAAS, C., WITKE, W. & KNEUSSEL, M. 2005. The actin-binding protein profilin I is localized at synaptic sites in an activity-regulated manner. *Eur J Neurosci*, 21, 15-25.
- NICHOLSON, D. A., CAHILL, M. E., TULISIAK, C. T., GEINISMAN, Y. & PENZES, P. 2012. Spatially restricted actin-regulatory signaling contributes to synapse morphology. *J Neurochem*.
- NIKONENKO, I., JOURDAIN, P., ALBERI, S., TONI, N. & MULLER, D. 2002. Activity-induced changes of spine morphology. *Hippocampus*, 12, 585-91.
- NOGUCHI, J., MATSUZAKI, M., ELLIS-DAVIES, G. C. & KASAI, H. 2005. Spine-neck geometry determines NMDA receptor-dependent Ca<sup>2+</sup> signaling in dendrites. *Neuron*, 46, 609-22.
- NOGUCHI, J., NAGAOKA, A., HAYAMA, T., UCAR, H., YAGISHITA, S., TAKAHASHI, N. & KASAI, H. 2019. Bidirectional in vivo structural dendritic spine plasticity revealed by two-photon glutamate uncaging in the mouse neocortex. *Sci Rep*, 9, 13922.
- NOZUMI, M., NAKAGAWA, H., MIKI, H., TAKENAWA, T. & MIYAMOTO, S. 2003. Differential localization of WAVE isoforms in filopodia and lamellipodia of the neuronal growth cone. *J Cell Sci*, 116, 239-46.
- NUSSER, Z., LUJAN, R., LAUBE, G., ROBERTS, J. D. B., MOLNAR, E. & SOMOGYI, P. 1998. Cell type and pathway dependence of synaptic AMPA receptor number and variability in the hippocampus. *Neuron*, 21, 545-559.
- O'ROAK, B. J., VIVES, L., FU, W., EGERTSON, J. D., STANAWAY, I. B., PHELPS, I. G., CARVILL, G., KUMAR, A., LEE, C., ANKENMAN, K., MUNSON, J., HIATT, J. B., TURNER, E. H., LEVY, R., O'DAY, D. R., KRUMM, N., COE, B. P., MARTIN, B. K., BORENSTEIN, E., NICKERSON, D. A., MEFFORD, H. C., DOHERTY, D., AKEY, J. M., BERNIER, R., EICHLER, E. E. & SHENDURE, J. 2012. Multiplex targeted sequencing identifies recurrently mutated genes in autism spectrum disorders. *Science*, 338, 1619-22.
- O'ROURKE, N. A., WEILER, N. C., MICHEVA, K. D. & SMITH, S. J. 2012. Deep molecular diversity of mammalian synapses: why it matters and how to measure it. *Nat Rev Neurosci*, 13, 365-79.
- OKAMOTO, K., NAGAI, T., MIYAWAKI, A. & HAYASHI, Y. 2004. Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity. *Nat Neurosci*, 7, 1104-12.
- OKAMOTO, P. M., TRIPET, B., LITOWSKI, J., HODGES, R. S. & VALLEE, R. B. 1999. Multiple distinct coiled-coils are involved in dynamin self-assembly. *J Biol Chem*, 274, 10277-86.
- PAK, D. T., YANG, S., RUDOLPH-CORREIA, S., KIM, E. & SHENG, M. 2001. Regulation of dendritic spine morphology by SPAR, a PSD-95-associated RapGAP. *Neuron*, 31, 289-303.
- PARIKSHAK, N. N., LUO, R., ZHANG, A., WON, H., LOWE, J. K., CHANDRAN, V., HORVATH, S. & GESCHWIND, D. H. 2013. Integrative functional genomic analyses implicate specific molecular pathways and circuits in autism. *Cell*, 155, 1008-21.
- PARK, E., NA, M., CHOI, J., KIM, S., LEE, J. R., YOON, J., PARK, D., SHENG, M. & KIM, E. 2003. The Shank family of postsynaptic density proteins interacts with and promotes synaptic accumulation of the beta PIX guanine nucleotide exchange factor for Rac1 and Cdc42. *J Biol Chem*, 278, 19220-9.
- PARK, M., PENICK, E. C., EDWARDS, J. G., KAUER, J. A. & EHLERS, M. D. 2004a. Recycling endosomes supply AMPA receptors for LTP. *Science*, 305, 1972-5.
- PARK, M., PENICK, E. C., EDWARDS, J. G., KAUER, J. A. & EHLERS, M. D. 2004b. Recycling endosomes supply AMPA receptors for LTP. *Science (New York, N Y)*, 305, 1972-5.
- PARK, M., SALGADO, J. M., OSTROFF, L., HELTON, T. D., ROBINSON, C. G., HARRIS, K. M. & EHLERS, M. D. 2006. Plasticity-induced growth of dendritic spines by exocytic trafficking from recycling endosomes. *Neuron*, 52, 817-30.
- PENAGARIKANO, O., ABRAHAMS, B. S., HERMAN, E. I., WINDEN, K. D., GDALYAHU, A., DONG, H., SONNENBLICK, L. I., GRUVER, R., ALMAJANO, J., BRAGIN, A., GOLSHANI, P., TRACHTENBERG, J. T., PELES, E. & GESCHWIND, D. H. 2011. Absence of CNTNAP2 leads to epilepsy, neuronal migration abnormalities, and core autism-related deficits. *Cell*, 147, 235-46.
- PENG, J., KIM, M. J., CHENG, D., DUONG, D. M., GYGI, S. P. & SHENG, M. 2004. Semiquantitative proteomic analysis of rat forebrain postsynaptic density fractions by mass spectrometry. *The Journal of biological chemistry*, 279, 21003-11.
- PENZES, P. & CAHILL, M. E. 2012. Deconstructing signal transduction pathways that regulate the actin cytoskeleton in dendritic spines. *Cytoskeleton (Hoboken)*.
- PENZES, P., CAHILL, M. E., JONES, K. A., VANLEEUEWEN, J. E. & WOOLFREY, K. M. 2011. Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci*, 14, 285-93.
- PENZES, P. & RAFALOVICH, I. 2012. Regulation of the actin cytoskeleton in dendritic spines. *Adv Exp Med Biol*, 970, 81-95.

- PEREZ-OTANO, I. & EHLERS, M. D. 2004. Learning from NMDA receptor trafficking: clues to the development and maturation of glutamatergic synapses. *Neurosignals*, 13, 175-89.
- PHEND, K. D., RUSTIONI, A. & WEINBERG, R. J. 1995. An osmium-free method of epon embedment that preserves both ultrastructure and antigenicity for post-embedding immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem*, 43, 283-92.
- PIOCHON, C., IRINOPOULOU, T., BRUSCIANO, D., BAILLY, Y., MARIANI, J. & LEVENES, C. 2007. NMDA receptor contribution to the climbing fiber response in the adult mouse Purkinje cell. *J Neurosci*, 27, 10797-809.
- PIOCHON, C., LEVENES, C., OHTSUKI, G. & HANSEL, C. 2010. Purkinje cell NMDA receptors assume a key role in synaptic gain control in the mature cerebellum. *J Neurosci*, 30, 15330-5.
- PITON, A., GAUTHIER, J., HAMDAN, F. F., LAFRENIERE, R. G., YANG, Y., HENRION, E., LAURENT, S., NOREAU, A., THIBODEAU, P., KAREMERA, L., SPIEGELMAN, D., KUKU, F., DUGUAY, J., DESTROISMAISONS, L., JOLIVET, P., COTE, M., LACHAPPELLE, K., DIALLO, O., RAYMOND, A., MARINEAU, C., CHAMPAGNE, N., XIONG, L., GASPAS, C., RIVIERE, J. B., TARABEUX, J., COSSETTE, P., KREBS, M. O., RAPOPORT, J. L., ADDINGTON, A., DELISI, L. E., MOTTRON, L., JOOBER, R., FOMBONNE, E., DRAPEAU, P. & ROULEAU, G. A. 2011. Systematic resequencing of X-chromosome synaptic genes in autism spectrum disorder and schizophrenia. *Mol Psychiatry*, 16, 867-80.
- POLIAK, S., GOLLAN, L., MARTINEZ, R., CUSTER, A., EINHEBER, S., SALZER, J. L., TRIMMER, J. S., SHRAGER, P. & PELES, E. 1999. Caspr2, a new member of the neurexin superfamily, is localized at the juxtaparanodes of myelinated axons and associates with K<sup>+</sup> channels. *Neuron*, 24, 1037-47.
- POLIAK, S., GOLLAN, L., SALOMON, D., BERGLUND, E. O., OHARA, R., RANSCHT, B. & PELES, E. 2001. Localization of Caspr2 in myelinated nerves depends on axon-glia interactions and the generation of barriers along the axon. *J Neurosci*, 21, 7568-75.
- POLIAK, S., SALOMON, D., ELHANANY, H., SABANAY, H., KIERNAN, B., PEVNY, L., STEWART, C. L., XU, X., CHIU, S. Y., SHRAGER, P., FURLEY, A. J. & PELES, E. 2003. Juxtaparanodal clustering of Shaker-like K<sup>+</sup> channels in myelinated axons depends on Caspr2 and TAG-1. *J Cell Biol*, 162, 1149-60.
- POLLARD, T. D. 2007. Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 36, 451-77.
- POLLARD, T. D. & BORISY, G. G. 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, 112, 453-65.
- POOT, M., BEYER, V., SCHWAAB, I., DAMATOVA, N., VAN'T SLOT, R., PROTHERO, J., HOLDER, S. E. & HAAF, T. 2010. Disruption of CNTNAP2 and additional structural genome changes in a boy with speech delay and autism spectrum disorder. *Neurogenetics*, 11, 81-9.
- PRAEFCKE, G. J. K. & MCMAHON, H. T. 2004. The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nature reviews Molecular cell biology*, 5, 133-47.
- PROEPPER, C., STEINESTEL, K., SCHMEISSER, M. J., HEINRICH, J., STEINESTEL, J., BOCKMANN, J., LIEBAU, S. & BOECKERS, T. M. 2011. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein k interacts with Abi-1 at postsynaptic sites and modulates dendritic spine morphology. *PLoS One*, 6, e27045.
- PURCELL, S. M., MORAN, J. L., FROMER, M., RUDERFER, D., SOLOVIEFF, N., ROUSSOS, P., O'DUSHLAINE, C., CHAMBERT, K., BERGEN, S. E., KAHLER, A., DUNCAN, L., STAHL, E., GENOVESE, G., FERNANDEZ, E., COLLINS, M. O., KOMIYAMA, N. H., CHOUDHARY, J. S., MAGNUSSON, P. K., BANKS, E., SHAKIR, K., GARIMELLA, K., FENNEL, T., DEPRISTO, M., GRANT, S. G., HAGGARTY, S. J., GABRIEL, S., SCOLNICK, E. M., LANDER, E. S., HULTMAN, C. M., SULLIVAN, P. F., MCCARROLL, S. A. & SKLAR, P. 2014. A polygenic burden of rare disruptive mutations in schizophrenia. *Nature*, 506, 185-90.
- RACCA, C., STEPHENSON, F. A., STREIT, P., ROBERTS, J. D. & SOMOGYI, P. 2000. NMDA receptor content of synapses in stratum radiatum of the hippocampal CA1 area. *J Neurosci*, 20, 2512-22.
- RACZ, B., BLANPIED, T. A., EHLERS, M. D. & WEINBERG, R. J. 2004. Lateral organization of endocytic machinery in dendritic spines. *Nature neuroscience*, 7, 917-8.
- RACZ, B. & WEINBERG, R. J. 2004. The subcellular organization of cortactin in hippocampus. *J Neurosci*, 24, 10310-7.
- RACZ, B. & WEINBERG, R. J. 2006. Spatial organization of cofilin in dendritic spines. *Neuroscience*, 138, 447-56.
- RACZ, B. & WEINBERG, R. J. 2008. Organization of the Arp2/3 complex in hippocampal spines. *J Neurosci*, 28, 5654-5659.
- RACZ, B. & WEINBERG, R. J. 2013. Microdomains in forebrain spines: an ultrastructural perspective. *Molecular neurobiology*, 47, 77-89.
- RAMAKERS, G. J., WOLFER, D., ROSENBERGER, G., KUCHENBECKER, K., KREIENKAMP, H. J., PRANGE-KIEL, J., RUNE, G., RICHTER, K., LANGNAESE, K., MASNEUF, S., BOSL, M. R., FISCHER, K. D., KRUGERS, H. J., LIPP, H. P., VAN GALEN, E. & KUTSCHE, K. 2012. Dysregulation of Rho GTPases in the alphaPix/Arhgef6 mouse model

- of X-linked intellectual disability is paralleled by impaired structural and synaptic plasticity and cognitive deficits. *Hum Mol Genet*, 21, 268-86.
- RAMÓN Y CAJAL, S. 1952. *Neuronismo o reticularismo; las pruebas objetivas de la unidad anatomica de las celulas nerviosas*, Madrid,, Consejo Superior de Investigaciones Cientificas, Instituto Ramon y Cajal.
- RAO, A. & CRAIG, A. M. 2000. Signaling between the actin cytoskeleton and the postsynaptic density of dendritic spines. *Hippocampus*, 10, 527-41.
- REDCAY, E., MORAN, J. M., MAVROS, P. L., TAGER-FLUSBERG, H., GABRIELI, J. D. & WHITFIELD-GABRIELI, S. 2013. Intrinsic functional network organization in high-functioning adolescents with autism spectrum disorder. *Front Hum Neurosci*, 7, 573.
- RIBEIRO, L. F., CATARINO, T., SANTOS, S. D., BENOIST, M., VAN LEEUWEN, J. F., ESTEBAN, J. A. & CARVALHO, A. L. 2014. Ghrelin triggers the synaptic incorporation of AMPA receptors in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, E149-58.
- ROBINSON, R. C., TURBEDSKY, K., KAISER, D. A., MARCHAND, J. B., HIGGS, H. N., CHOE, S. & POLLARD, T. D. 2001. Crystal structure of Arp2/3 complex. *Science*, 294, 1679-84.
- ROCCA, D. L., MARTIN, S., JENKINS, E. L. & HANLEY, J. G. 2008. Inhibition of Arp2/3-mediated actin polymerization by PICK1 regulates neuronal morphology and AMPA receptor endocytosis. *Nat Cell Biol*, 10, 259-71.
- ROELANDSE, M., WELMAN, A., WAGNER, U., HAGMANN, J. & MATUS, A. 2003. Focal motility determines the geometry of dendritic spines. *Neuroscience*, 121, 39-49.
- ROMANO, V., DE PROPRIIS, L., BOSMAN, L. W., WARNAAR, P., TEN BRINKE, M. M., LINDEMAN, S., JU, C., VELAUTHAPILLAI, A., SPANKE, J. K., MIDDENDORP GUERRA, E., HOOGLAND, T. M., NEGRELLO, M., D'ANGELO, E. & DE ZEEUW, C. I. 2018. Potentiation of cerebellar Purkinje cells facilitates whisker reflex adaptation through increased simple spike activity. *eLife*, 7.
- ROSENDALE, M., JULLIE, D., CHOQUET, D. & PERRAIS, D. 2017. Spatial and Temporal Regulation of Receptor Endocytosis in Neuronal Dendrites Revealed by Imaging of Single Vesicle Formation. *Cell Rep*, 18, 1840-1847.
- RUSSELL, T. A., BLIZINSKY, K. D., COBIA, D. J., CAHILL, M. E., XIE, Z., SWEET, R. A., DUAN, J., GEJMAN, P. V., WANG, L., CSERNANSKY, J. G. & PENZES, P. 2014. A sequence variant in human KALRN impairs protein function and coincides with reduced cortical thickness. *Nat Commun*, 5, 4858.
- RUST, M. B. 2015. ADF/cofilin: a crucial regulator of synapse physiology and behavior. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 72, 3521-9.
- RYO, Y., MIYAWAKI, A., FURUICHI, T. & MIKOSHIBA, K. 1993. Expression of the metabotropic glutamate receptor mGluR1 alpha and the ionotropic glutamate receptor GluR1 in the brain during the postnatal development of normal mouse and in the cerebellum from mutant mice. *Journal of neuroscience research*, 36, 19-32.
- SALA, C., PIECH, V., WILSON, N. R., PASSAFARO, M., LIU, G. & SHENG, M. 2001. Regulation of dendritic spine morphology and synaptic function by Shank and Homer. *Neuron*, 31, 115-30.
- SANDERS, S. J., MURTHA, M. T., GUPTA, A. R., MURDOCH, J. D., RAUBESON, M. J., WILLSEY, A. J., ERCAN-SENCICEK, A. G., DILULLO, N. M., PARIKSHAK, N. N., STEIN, J. L., WALKER, M. F., OBER, G. T., TERAN, N. A., SONG, Y., EL-FISHAWY, P., MURTHA, R. C., CHOI, M., OVERTON, J. D., BJORNSON, R. D., CARRIERO, N. J., MEYER, K. A., BILGUVAR, K., MANE, S. M., SESTAN, N., LIFTON, R. P., GUNEL, M., ROEDER, K., GESCHWIND, D. H., DEVLIN, B. & STATE, M. W. 2012. De novo mutations revealed by whole-exome sequencing are strongly associated with autism. *Nature*, 485, 237-41.
- SANHUEZA, M., FERNANDEZ-VILLALOBOS, G., STEIN, I. S., KASUMOVA, G., ZHANG, P., BAYER, K. U., OTMAKHOV, N., HELL, J. W. & LISMAN, J. 2011. Role of the CaMKII/NMDA receptor complex in the maintenance of synaptic strength. *J Neurosci*, 31, 9170-8.
- SCHAFFER, D. A. 2004. Regulating actin dynamics at membranes: a focus on dynamin. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 5, 463-9.
- SCHENCK, A., QURASHI, A., CARRERA, P., BARDONI, B., DIEBOLD, C., SCHEJTER, E., MANDEL, J. L. & GIANGRANDE, A. 2004. WAVE/SCAR, a multifunctional complex coordinating different aspects of neuronal connectivity. *Dev Biol*, 274, 260-70.
- SCHNEIDER, C. A., RASBAND, W. S. & ELICEIRI, K. W. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*, 9, 671-5.
- SCHUBERT, V. & DOTTI, C. G. 2007. Transmitting on actin: synaptic control of dendritic architecture. *J Cell Sci*, 120, 205-12.
- SCOTT-VAN ZEELAND, A. A., ABRAHAMS, B. S., ALVAREZ-RETUERTO, A. I., SONNENBLICK, L. I., RUDIE, J. D., GHAHREMANI, D., MUMFORD, J. A., POLDRACK, R. A., DAPRETTO, M., GESCHWIND, D. H. &

- BOOKHEIMER, S. Y. 2010. Altered functional connectivity in frontal lobe circuits is associated with variation in the autism risk gene CNTNAP2. *Sci Transl Med*, 2, 56ra80.
- SDRULLA, A. D. & LINDEN, D. J. 2007. Double dissociation between long-term depression and dendritic spine morphology in cerebellar Purkinje cells. *Nat Neurosci*, 10, 546-8.
- SELIMBEYOGLU, A., KIM, C. K., INOUE, M., LEE, S. Y., HONG, A. S. O., KAUVAR, I., RAMAKRISHNAN, C., FENNO, L. E., DAVIDSON, T. J., WRIGHT, M. & DEISSEROTH, K. 2017. Modulation of prefrontal cortex excitation/inhibition balance rescues social behavior in CNTNAP2-deficient mice. *Sci Transl Med*, 9.
- SHAW, A. E., MINAMIDE, L. S., BILL, C. L., FUNK, J. D., MAITI, S. & BAMBURG, J. R. 2004. Cross-reactivity of antibodies to actin-depolymerizing factor/cofilin family proteins and identification of the major epitope recognized by a mammalian actin-depolymerizing factor/cofilin antibody. *Electrophoresis*, 25, 2611-20.
- SHENG, M. & HOOGENRAAD, C. C. 2007. The postsynaptic architecture of excitatory synapses: A more quantitative view. *Annual Review of Biochemistry*.
- SHUIB, S., MCMULLAN, D., RATTENBERRY, E., BARBER, R. M., RAHMAN, F., ZATYKA, M., CHAPMAN, C., MACDONALD, F., LATIF, F., DAVISON, V. & MAHER, E. R. 2009. Microarray based analysis of 3p25-p26 deletions (3p- syndrome). *Am J Med Genet A*, 149A, 2099-105.
- SIMON, C. M., HEPBURN, I., CHEN, W. & DE SCHUTTER, E. 2014. The role of dendritic spine morphology in the compartmentalization and delivery of surface receptors. *J Comput Neurosci*, 36, 483-97.
- SIRAJUDDIN, M., FARKASOVSKY, M., HAUER, F., KUHLMANN, D., MACARA, I. G., WEYAND, M., STARK, H. & WITTINGHOFER, A. 2007. Structural insight into filament formation by mammalian septins. *Nature*, 449, 311-+.
- SMART, F. M. & HALPAIN, S. 2000. Regulation of dendritic spine stability. *Hippocampus*, 10, 542-54.
- SMYTHE, E. & AYSCOUGH, K. R. 2006. Actin regulation in endocytosis. *J Cell Sci*, 119, 4589-98.
- SODERLING, S. H., GUIRE, E. S., KAECH, S., WHITE, J., ZHANG, F., SCHUTZ, K., LANGEBERG, L. K., BANKER, G., RABER, J. & SCOTT, J. D. 2007. A WAVE-1 and WRP signaling complex regulates spine density, synaptic plasticity, and memory. *J Neurosci*, 27, 355-65.
- SODERLING, S. H., LANGEBERG, L. K., SODERLING, J. A., DAVEE, S. M., SIMERLY, R., RABER, J. & SCOTT, J. D. 2003. Loss of WAVE-1 causes sensorimotor retardation and reduced learning and memory in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 1723-8.
- SODERLING, S. H. & SCOTT, J. D. 2006. WAVE signalling: from biochemistry to biology. *Biochem Soc Trans*, 34, 73-6.
- SORRA, K. E., FIALA, J. C. & HARRIS, K. M. 1998. Critical assessment of the involvement of perforations, spinules, and spine branching in hippocampal synapse formation. *J Comp Neurol*, 398, 225-40.
- SORRA, K. E. & HARRIS, K. M. 2000. Overview on the structure, composition, function, development, and plasticity of hippocampal dendritic spines. *Hippocampus*, 10, 501-11.
- SPILLANE, M., KETSCHER, A., JONES, S. L., KOROBOVA, F., MARSICK, B., LANIER, L., SVITKINA, T. & GALLO, G. 2011. The actin nucleating Arp2/3 complex contributes to the formation of axonal filopodia and branches through the regulation of actin patch precursors to filopodia. *Dev Neurobiol*.
- STAR, E. N., KWIATKOWSKI, D. J. & MURTHY, V. N. 2002. Rapid turnover of actin in dendritic spines and its regulation by activity. *Nat Neurosci*, 5, 239-46.
- STAVOE, A. K., NELSON, J. C., MARTINEZ-VELAZQUEZ, L. A., KLEIN, M., SAMUEL, A. D. & COLON-RAMOS, D. A. 2012. Synaptic vesicle clustering requires a distinct MIG-10/Lamellipodin isoform and ABI-1 downstream from Netrin. *Genes Dev*, 26, 2206-21.
- STERGIAKOULI, E., HAMSHERE, M., HOLMANS, P., LANGLEY, K., ZAHARIEVA, I., DE, C. G., PSYCHIATRIC, G. C., HAWI, Z., KENT, L., GILL, M., WILLIAMS, N., OWEN, M. J., O'DONOVAN, M. & THAPAR, A. 2012. Investigating the contribution of common genetic variants to the risk and pathogenesis of ADHD. *Am J Psychiatry*, 169, 186-94.
- STERIO, D. C. 1984. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc*, 134, 127-36.
- STEWART, J., MITCHELL, J. & KALANT, N. 1989. The effects of life-long food restriction on spatial memory in young and aged Fischer 344 rats measured in the eight-arm radial and the Morris water mazes. *Neurobiol Aging*, 10, 669-75.
- STEWART, M. G., MEDVEDEV, N. I., POPOV, V. I., SCHOEPFER, R., DAVIES, H. A., MURPHY, K., DALLERAC, G. M., KRAEV, I. V. & RODRIGUEZ, J. J. 2005. Chemically induced long-term potentiation increases the number of perforated and complex postsynaptic densities but does not alter dendritic spine volume in CA1 of adult mouse hippocampal slices. *Eur J Neurosci*, 21, 3368-78.

- STRAUSS, K. A., PUFFENBERGER, E. G., HUENTELMAN, M. J., GOTTLIEB, S., DOBRIN, S. E., PAROD, J. M., STEPHAN, D. A. & MORTON, D. H. 2006. Recessive symptomatic focal epilepsy and mutant contactin-associated protein-like 2. *N Engl J Med*, 354, 1370-7.
- SUN, D., PHILLIPS, L., VELAKOULIS, D., YUNG, A., MCGORRY, P. D., WOOD, S. J., VAN ERP, T. G., THOMPSON, P. M., TOGA, A. W., CANNON, T. D. & PANTELIS, C. 2009. Progressive brain structural changes mapped as psychosis develops in 'at risk' individuals. *Schizophr Res*, 108, 85-92.
- SUN, Y., LEONG, N. T., WONG, T. & DRUBIN, D. G. 2015. A Pan1/End3/Sla1 complex links Arp2/3-mediated actin assembly to sites of clathrin-mediated endocytosis. *Mol Biol Cell*, 26, 3841-56.
- SVITKINA, T. M. & BORISY, G. G. 1999. Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J Cell Biol*, 145, 1009-26.
- SVOBODA, K., TANK, D. W. & DENK, W. 1996. Direct measurement of coupling between dendritic spines and shafts. *Science*, 272, 716-9.
- SZABO, L. E., MARCELLO, G. M., SUTH, M., SOTONYI, P. & RACZ, B. 2021. Distribution of cortactin in cerebellar Purkinje cell spines. *Sci Rep*, 11, 1375.
- TADA, T. & SHENG, M. 2006. Molecular mechanisms of dendritic spine morphogenesis. *Curr Opin Neurobiol*, 16, 95-101.
- TADA, T., SIMONETTA, A., BATTERTON, M., KINOSHITA, M., EDBAUER, D. & SHENG, M. 2007. Role of Septin cytoskeleton in spine morphogenesis and dendrite development in neurons. *Curr Biol*, 17, 1752-8.
- TAHIROVIC, S., HELLAL, F., NEUKIRCHEN, D., HINDGES, R., GARVALOV, B. K., FLYNN, K. C., STRADAL, T. E., CHROSTEK-GRASHOFF, A., BRAKEBUSCH, C. & BRADKE, F. 2010. Rac1 regulates neuronal polarization through the WAVE complex. *J Neurosci*, 30, 6930-43.
- TAKENAWA, T. & SUETSUGU, S. 2007. The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 37-48.
- TAKIZAWA, P. A., DERISI, J. L., WILHELM, J. E. & VALE, R. D. 2000. Plasma membrane compartmentalization in yeast by messenger RNA transport and a septin diffusion barrier. *Science*, 290, 341-344.
- TAKUMI, Y., RAMIREZ-LEON, V., LAAKE, P., RINVIK, E. & OTTERSEN, O. P. 1999. Different modes of expression of AMPA and NMDA receptors in hippocampal synapses. *Nat Neurosci*, 2, 618-24.
- TANAKA-TAKIGUCHI, Y., KINOSHITA, M. & TAKIGUCHI, K. 2009. Septin-Mediated Uniform Bracing of Phospholipid Membranes. *Current Biology*, 19, 140-145.
- TARDIN, C., COGNET, L., BATS, C., LOUNIS, B. & CHOQUET, D. 2003. Direct imaging of lateral movements of AMPA receptors inside synapses. *The EMBO journal*, 22, 4656-65.
- TASHIRO, A., MINDEN, A. & YUSTE, R. 2000. Regulation of dendritic spine morphology by the rho family of small GTPases: antagonistic roles of Rac and Rho. *Cereb Cortex*, 10, 927-38.
- TATAVARTY, V., KIM, E. J., RODIONOV, V. & YU, J. 2009. Investigating sub-spine actin dynamics in rat hippocampal neurons with super-resolution optical imaging. *PLoS One*, 4, e7724.
- TAYLOR, M. J., PERRAIS, D. & MERRIFIELD, C. J. 2011. A high precision survey of the molecular dynamics of mammalian clathrin-mediated endocytosis. *PLoS Biol*, 9, e1000604.
- TENDILLA-BELTRAN, H., ANTONIO VAZQUEZ-ROQUE, R., JUDITH VAZQUEZ-HERNANDEZ, A., GARCES-RAMIREZ, L. & FLORES, G. 2019. Exploring the Dendritic Spine Pathology in a Schizophrenia-related Neurodevelopmental Animal Model. *Neuroscience*, 396, 36-45.
- TERRY-LORENZO, R. T., ROADCAP, D. W., OTSUKA, T., BLANPIED, T. A., ZAMORANO, P. L., GARNER, C. C., SHENOLIKAR, S. & EHLERS, M. D. 2005. Neurabin/protein phosphatase-1 complex regulates dendritic spine morphogenesis and maturation. *Mol Biol Cell*, 16, 2349-62.
- TOLIAS, K. F., DUMAN, J. G. & UM, K. 2011. Control of synapse development and plasticity by Rho GTPase regulatory proteins. *Prog Neurobiol*, 94, 133-48.
- TONI, N., BUCHS, P. A., NIKONENKO, I., BRON, C. R. & MULLER, D. 1999. LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite. *Nature*, 402, 421-5.
- TONI, N., BUCHS, P. A., NIKONENKO, I., POVILAITITE, P., PARISI, L. & MULLER, D. 2001. Remodeling of synaptic membranes after induction of long-term potentiation. *J Neurosci*, 21, 6245-51.
- TOSHIMA, J., TOSHIMA, J. Y., MARTIN, A. C. & DRUBIN, D. G. 2005. Phosphoregulation of Arp2/3-dependent actin assembly during receptor-mediated endocytosis. *Nat Cell Biol*, 7, 246-54.
- TRACHTENBERG, J. T., CHEN, B. E., KNOTT, G. W., FENG, G., SANES, J. R., WELKER, E. & SVOBODA, K. 2002. Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature*, 420, 788-94.
- TRILLER, A. & CHOQUET, D. 2005. Surface trafficking of receptors between synaptic and extrasynaptic membranes: and yet they do move! *Trends in neurosciences*, 28, 133-9.
- TRILLER, A. & CHOQUET, D. 2008. New concepts in synaptic biology derived from single-molecule imaging. *Neuron*, 59, 359-74.

- TU, J. C., XIAO, B., NAISBITT, S., YUAN, J. P., PETRALIA, R. S., BRAKEMAN, P., DOAN, A., AAKALU, V. K., LANAHAN, A. A., SHENG, M. & WORLEY, P. F. 1999. Coupling of mGluR/Homer and PSD-95 complexes by the Shank family of postsynaptic density proteins. *Neuron*, 23, 583-92.
- ULTANIR, S. K., KIM, J. E., HALL, B. J., DEERINCK, T., ELLISMAN, M. & GHOSH, A. 2007. Regulation of spine morphology and spine density by NMDA receptor signaling in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 19553-8.
- VAAGS, A. K., BOWDIN, S., SMITH, M. L., GILBERT-DUSSARDIER, B., BROCKE-HOLMEFJORD, K. S., SINOPOLI, K., GILLES, C., HAALAND, T. B., VINCENT-DELORME, C., LAGRUE, E., HARBUZ, R., WALKER, S., MARSHALL, C. R., HOUGE, G., KALSCHUEUR, V. M., SCHERER, S. W. & MINASSIAN, B. A. 2014. Absent CNKSR2 causes seizures and intellectual, attention, and language deficits. *Ann Neurol*, 76, 758-64.
- VALLEJO, D., LINDSAY, C. B., GONZALEZ-BILLAULT, C. & INESTROSA, N. C. 2021. Wnt5a modulates dendritic spine dynamics through the regulation of Cofilin via small Rho GTPase activity in hippocampal neurons. *J Neurochem*, 158, 673-693.
- VALTSCHANOFF, J. G. & WEINBERG, R. J. 2001. Laminar organization of the NMDA receptor complex within the postsynaptic density. *J Neurosci*, 21, 1211-7.
- VAN DEN BUUSE, M. 2010. Modeling the positive symptoms of schizophrenia in genetically modified mice: pharmacology and methodology aspects. *Schizophr Bull*, 36, 246-70.
- VAREA, O., MARTIN-DE-SAAVEDRA, M. D., KOPEIKINA, K. J., SCHURMANN, B., FLEMING, H. J., FAWCETT-PATEL, J. M., BACH, A., JANG, S., PELES, E., KIM, E. & PENZES, P. 2015. Synaptic abnormalities and cytoplasmic glutamate receptor aggregates in contactin associated protein-like 2/Caspr2 knockout neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, 6176-81.
- VOINEAGU, I., WANG, X., JOHNSTON, P., LOWE, J. K., TIAN, Y., HORVATH, S., MILL, J., CANTOR, R. M., BLENCOWE, B. J. & GESCHWIND, D. H. 2011. Transcriptomic analysis of autistic brain reveals convergent molecular pathology. *Nature*, 474, 380-4.
- WALIKONIS, R. S., JENSEN, O. N., MANN, M., PROVANCE, D. W., JR., MERCER, J. A. & KENNEDY, M. B. 2000. Identification of proteins in the postsynaptic density fraction by mass spectrometry. *J Neurosci*, 20, 4069-80.
- WALLACE, W. & BEAR, M. F. 2004. A morphological correlate of synaptic scaling in visual cortex. *J Neurosci*, 24, 6928-38.
- WANG, Y., SHIBASAKI, F. & MIZUNO, K. 2005. Calcium signal-induced cofilin dephosphorylation is mediated by Slingshot via calcineurin. *J Biol Chem*, 280, 12683-9.
- WEAVER, A. M., KARGINOV, A. V., KINLEY, A. W., WEED, S. A., LI, Y., PARSONS, J. T. & COOPER, J. A. 2001. Cortactin promotes and stabilizes Arp2/3-induced actin filament network formation. *Curr Biol*, 11, 370-4.
- WEED, S. A., KARGINOV, A. V., SCHAFER, D. A., WEAVER, A. M., KINLEY, A. W., COOPER, J. A. & PARSONS, J. T. 2000. Cortactin localization to sites of actin assembly in lamellipodia requires interactions with F-actin and the Arp2/3 complex. *J Cell Biol*, 151, 29-40.
- WEED, S. A. & PARSONS, J. T. 2001. Cortactin: coupling membrane dynamics to cortical actin assembly. *Oncogene*, 20, 6418-34.
- WEGNER, A. M., NEBHAN, C. A., HU, L., MAJUMDAR, D., MEIER, K. M., WEAVER, A. M. & WEBB, D. J. 2008. N-wasp and the arp2/3 complex are critical regulators of actin in the development of dendritic spines and synapses. *J Biol Chem*, 283, 15912-20.
- WEINDRUCH, R. & SOHAL, R. S. 1997. Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Caloric intake and aging. *N Engl J Med*, 337, 986-94.
- WENDHOLT, D., SPILKER, C., SCHMITT, A., DOLNIK, A., SMALLA, K. H., PROEPPER, C., BOCKMANN, J., SOBUE, K., GUNDELFINGER, E. D., KREUTZ, M. R. & BOECKERS, T. M. 2006. ProSAP-interacting protein 1 (ProSAPiP1), a novel protein of the postsynaptic density that links the spine-associated Rap-Gap (SPAR) to the scaffolding protein ProSAP2/Shank3. *J Biol Chem*, 281, 13805-13816.
- WHEAL, H. V., CHEN, Y., MITCHELL, J., SCHACHNER, M., MAERZ, W., WIELAND, H., VAN ROSSUM, D. & KIRSCH, J. 1998. Molecular mechanisms that underlie structural and functional changes at the postsynaptic membrane during synaptic plasticity. *Progress in neurobiology*, 55, 611-40.
- WITTE, A. V., FOBKER, M., GELLNER, R., KNECHT, S. & FLOEL, A. 2009. Caloric restriction improves memory in elderly humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 1255-60.
- WON, H., MAH, W., KIM, E., KIM, J. W., HAHM, E. K., KIM, M. H., CHO, S., KIM, J., JANG, H., CHO, S. C., KIM, B. N., SHIN, M. S., SEO, J., JEONG, J., CHOI, S. Y., KIM, D., KANG, C. & KIM, E. 2011. GIT1 is associated with ADHD in humans and ADHD-like behaviors in mice. *Nat Med*, 17, 566-72.
- WU, H. & PARSONS, J. T. 1993. Cortactin, an 80/85-kilodalton pp60src substrate, is a filamentous actin-binding protein enriched in the cell cortex. *J Cell Biol*, 120, 1417-26.



- WYSZYNSKI, M., KHARAZIA, V., SHANGHVI, R., RAO, A., BEGGS, A. H., CRAIG, A. M., WEINBERG, R. & SHENG, M. 1998. Differential regional expression and ultrastructural localization of alpha-actinin-2, a putative NMDA receptor-anchoring protein, in rat brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 18, 1383-92.
- XIE, Y., VESSEY, J. P., KONECNA, A., DAHM, R., MACCHI, P. & KIEBLER, M. A. 2007. The GTP-binding protein Septin 7 is critical for dendrite branching and dendritic-spine morphology. *Curr Biol*, 17, 1746-51.
- YIZHAR, O., FENNO, L. E., PRIGGE, M., SCHNEIDER, F., DAVIDSON, T. J., O'SHEA, D. J., SOHAL, V. S., GOSHEN, I., FINKELSTEIN, J., PAZ, J. T., STEHFEST, K., FUDIM, R., RAMAKRISHNAN, C., HUGUENARD, J. R., HEGEMANN, P. & DEISSEROTH, K. 2011. Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction. *Nature*, 477, 171-8.
- YONEZAWA, N., NISHIDA, E., KOYASU, S., MAEKAWA, S., OHTA, Y., YAHARA, I. & SAKAI, H. 1987. Distribution among tissues and intracellular localization of cofilin, a 21kDa actin-binding protein. *Cell Struct Funct*, 12, 443-52.
- YOSHIMURA, Y., YAMAUCHI, Y., SHINKAWA, T., TAOKA, M., DONAI, H., TAKAHASHI, N., ISOBE, T. & YAMAUCHI, T. 2004. Molecular constituents of the postsynaptic density fraction revealed by proteomic analysis using multidimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of neurochemistry*, 88, 759-68.
- ZHANG, J. S., KONG, C., XIE, H., MCPHERSON, P. S., GRINSTEIN, S. & TRIMBLE, W. S. 1999. Phosphatidyl inositol polyphosphate binding to the mammalian septin H5 is modulated by GTP. *Current Biology*, 9, 1458-1467.
- ZHOU, Q., HOMMA, K. J. & POO, M.-M. 2004. Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron*, 44, 749-57.
- ZHOU, Q., XIAO, M. & NICOLL, R. A. 2001. Contribution of cytoskeleton to the internalization of AMPA receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 1261-6.
- ZUO, X., ZHANG, J., ZHANG, Y., HSU, S. C., ZHOU, D. & GUO, W. 2006. Exo70 interacts with the Arp2/3 complex and regulates cell migration. *Nat Cell Biol*, 8, 1383-8.
- ZUO, Y., LIN, A., CHANG, P. & GAN, W. B. 2005. Development of long-term dendritic spine stability in diverse regions of cerebral cortex. *Neuron*, 46, 181-9.