

A RIN1 fehérje hatása a dendrittüskék mozgására és morfológiájára

TDK dolgozat

készítette:

Ferenc Katalin

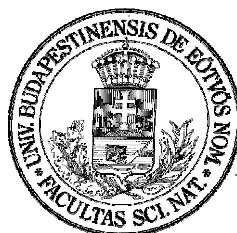
Biológia BSc, 1. félév

témavezető:

Dr. Schlett Katalin
docens

ELTE Élettani és Neurobiológiai Tanszék

2012.



Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	2
Gyakran használt rövidítések jegyzéke	2
Összefoglalás	3
Summary	4
Bevezetés	5
1.1. A dendrittüskék főbb típusai és ezek plaszticitása	6
1.2. A RIN1 fehérje	7
Előzetes eredmények	8
2.1. A RIN1 fehérje szerepe az amigdalában megfigyelhető szinaptikus plaszticitásban.....	8
2.2. A RIN1 fehérje hatása a dendrittüskék morfológiájára és a dendritfa kiterjedésére	8
Saját célkitűzéseim	9
Anyag és módszer	9
4.1. Felhasznált állatok	9
4.2. A tenyésztő edények előkészítése, a kiültetés menete és a sejtek tenyésztése.....	9
4.3. A liposzómás transzfekció	10
4.4. A sejtek fixálása.....	11
4.5. Immuncitokémiai vizsgálatok	11
4.6. Konfokális mikroszkópos felvételek készítése.....	11
4.7. A fixált sejtekről készített mikroszkópos felvételek elemzése.....	12
4.8. Live cell imaging felvétele készítése (Tárnok K. munkája).....	12
4.9. A dendrittüskék mozgékonyságának számítógépes kiértékelése	13
4.10. Statisztikai elemzések	13
Eredmények	14
5.1. A RIN1 fehérje túltermelésének hatására a dendrittüskék stabilabbá válnak	14
5.2. A PSD95 posztszinaptikus és a szinaptofizin preszinaptikus marker appozíciója a tenyészetekben szinapszisok kialakulását jelzi.....	16
Diskusszió	19
Szerzői hozzájárulás	21
Köszönetnyilvánítás	21
Hivatkozásjegyzék.....	21

Gyakran használt rövidítések jegyzéke

EGFP – zöld fluoreszcens fehérje

mCherry – piros fluoreszcens fehérje

LTD – hosszú távú hatékonyság-csökkenés

LTP – hosszú távú potenciórozó hatás (vagy hatékonyság-növekedés)

PSD – posztszinaptikus denzitás

PSD95 – a posztszinaptikus denzitásban lokalizálódó 95 kDa-os fehérje

RIN1 – Ras-Rab interaktor 1 fehérje

Összefoglalás

A központi idegrendszerben az egyes neuronok közötti szinapszisok használatfüggő átrendeződését szinaptikus plaszticitásnak nevezzük. A serkentő szinapszisok általában a dendrittüskéken végződnek, amelyek morfológiája és motilitása a szinaptikus kapcsolat erősségének függvényében változhat. A gyakran használt, megerősödött serkentő szinapszisokban a dendrittüskékre gomba alakú, kiszélesedett fej és közel állandó alak jellemző.

A RIN1 (Ras és Rab interactor 1) fehérje hiánya transzgenikus egerekben az averzív memória javulásához vezetett, amely a neuronális plaszticitás fokozódására utal. TDK munkám során arra keresem a választ, hogy a RIN1 fehérje milyen hatással van a dendrittüskék motilitására és stabilitására. Vizsgálataimat embrionális hippokampális idegsejttenyészeteken végeztem, amelyekben a fluoreszcensen jelölt RIN1 fehérjét, illetve a kontroll, EGFP fehérjét transzfekció segítségével túltermeltettem. A fluoreszcensen jelzett, élő idegsejtekről készült 20 perces képsorozatokon a dendrittüskék morfológiai változásának és motilitásának elemzésével megmutattam, hogy a RIN1 fehérje túltermeltetése a fonalas dendrittüskéket stabilizálta. Fixált sejtekről készült konfokális mikroszkópos képek vizsgálatával bizonyítottam, hogy a RIN1 fehérje túltermeltetése a posztzinaptikus denzitásra jellemző PSD95 állványfehérje lokalizációját is megváltoztatta. Mindez arra utal, hogy a RIN1 fehérje a tüskék érését és stabilizálódását elősegíti, de ezek használatfüggő átalakulását hátráltathatja.

Summary

In the central nervous system, synaptic connections between neurons can change due to learning processes. This use-dependent remodelling is called synaptic plasticity. The excitatory synapses are formed usually between axon terminals and dendritic spines, which are small protrusions along the secondary and tertiary dendritic branches. The morphology and motility of the dendritic spines influence the formation and strength of synaptic connections. The most effective synaptic connections are established on the mushroom spines, which have a large head and relatively stable shape.

The lack of the RIN1 (Ras and Rab interactor 1) protein leads to improved aversive memory and thus, enhanced neuronal plasticity in transgenic animals. During my research work I aimed to investigate RIN1-mediated effects on the motility and stability of dendritic spines. I prepared and cultivated embryonal mouse hippocampal neuronal cultures and transfected the cultivated neurons by EGFP-labelled RIN1 or the control EGFP plasmids. 20 minute-long live cell imaging recordings were made from the secondary and tertiary dendritic branches of living, fluorescently labelled transfected neurons, revealing the motility of dendritic spines in real time. I have analysed the changes in the overall area, the cumulative movement of spine tips as well as the center of mass of the manually outlined spines. These data uniformly proved that the overexpression of RIN1 protein cause decreased motility and enhanced stability of the filopodia-like dendrite spikes.

With confocal microscopy analysis, I showed that the overexpression of RIN1 protein modifies the localization of the PSD95 scaffold protein, which is specific to the postsynaptic density. These results and other published observations suggest that RIN1 protein plays a role in the maturation and stabilization of dendrite spines, but impedes their use-dependent remodelling.

Bevezetés

Az emberi idegrendszerben nagyjából 10^{11} idegsejt található (Azevedo és mtsai., 2009; Hotulainen és Hoogenraad, 2010). Az ezek között kiépülő kapcsolatrendszer hozza létre azt a kezdetben nagymértékben változó, majd idősebb korban stabilabb hálózatot, amit idegrendszernek nevezünk. Az agysejtek hálózatának kapcsolatai használatfüggő módon képesek átalakulni: a sejtek között új kapcsolatok alakulhatnak ki, a meglévő kapcsolatok stabilizálódhatnak vagy széteshetnek. Tanulási folyamatok során az idegrendszeri kapcsolatok átalakulnak; ez a szinaptikus plaszticitás jelensége, aminek mechanizmusa és szabályozása még csak korlátozottan ismert.

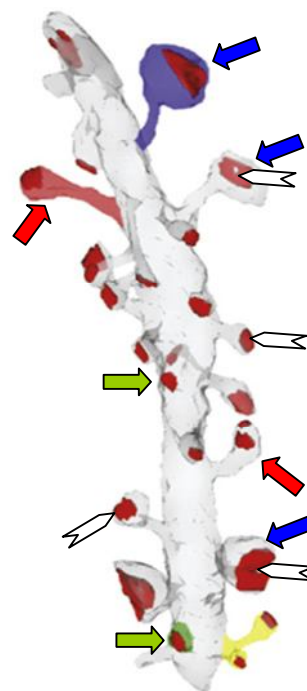
Az idegsejt szomatodendritikus és axonális régiójának membránfehérjéi jelentősen különböznek egymástól, ami az egyes területek eltérő funkciójával magyarázható. A dendritágakon és a sejttesten, illetve az axon-dombon legtöbbször gátló szinapszisok találhatók. A dendritágakon – elsősorban a szekunder és terciér ágakon – az aktin polimerizáció és lokális membránfelhalmozódás eredményeképpen létrejött, ún. dendrittüskék találhatók, amelyeken főleg serkentő szinapszisok végződnek. Az axon terminálisok, illetve az axonális varikozitások a preszinapszist alakítják ki, bennük neurotranszmitterek halmozódnak föl, amelyek ingerület hatására ürülnek.

Az ürített transzmitterek a posztzinapszison gátló vagy serkentő hatást, azaz hiperpolarizációt, illetve hipopolarizációt hozhatnak létre. Ezek térben és időben összegződnek és az axondombon eldől, hogy az axonon elindul-e az ingerület. Ha igen, akkor az axonvarikozitásokba, illetve az axonterminálisokba megérkező akciós potenciál hatására a neurotranszmitterek a szinaptikus részbe ürülnek, így a következő idegsejten ugyanaz játszódhat le, mint az őt megelőzőn. Egy neuron több tízezer szomszédjával tart kapcsolatot és a szomszédaitól kapott bemenetek függvényében dől el, hogy mikor és meddig fog tüzelni.

Mivel a neuronok tüzelési mintázata képezi gondolkodásunk alapját, fontos megérteni, hogy hogyan is működnek az egyes szinapszisok. Munkám során alapvetően a serkentő szinapszisok posztzinaptikus régiójával foglalkoztam.

1.1. A dendrittüskék főbb típusai és ezek plaszticitása

A dendrittüskék a dendritágakon szabályozott aktin-polimerizáció és membrán-fúzió eredményeképpen jönnek létre. Morfológiai bélyegek alapján három típusát különböztetjük el, amelyek mindegyike képes szinapszis kialakítására (1. ábra). Ezek közül az egyik a *zömök tüske*, ami a dendritágon egy apró kidudorodás. A *fonalas tüske* (filopódium) egy hosszú, legtöbbször mozgékony struktúra, amely épp a mozgékonyága miatt a megfelelő¹ axonális partner felkeresésében jelentős szerepet játszik (Yoshihara és mtsai., 2009, Harris és Weinberg, 2012), viszont ugyanezért stabil kapcsolat kialakítására nem, vagy csak korlátozottan alkalmas. Éppen ezért stabil axon - filopódium szinapszis a kifejlett idegrendszerben viszonylag ritkán fordul elő, és a szinaptikus felszín mérete is viszonylag kicsi (ld. 1. ábra). Legnagyobb szinaptikus felszínnel és szinaptikus hatékonysággal a *gomba alakú tüske* rendelkezik (Rácz és Weinberg, 2012), amelyen –épp ezért –a szinapszis határfoka is a legnagyobb. Az ilyen dendrittüskék nyakának átmérője rendszerint kicsi, míg a tüskék feje kiszélesedett. Részben a morfológia, illetve az intracelluláris struktúrák sajátága eredményezi azt, hogy az egyes tüskéken elkülönülve kialakuló membránpotenciál-változás csökkent intenzitással terjed át a dendritszálra (Rácz és Weinberg, 2012).



1. ábra: Egy dendritszakasz elektronmikroszkópos megfigyelések alapján készült háromdimenziós rekonstrukciója. Megfigyelhetők a különböző dendrittüske típusok: a zömök tüske (zöld nyíl), a fonalas tüske (piros nyíl) és a gomba alakú tüske (kék nyíl). Mindhárom tüsketípus képes szinaptikus kapcsolatot létesíteni. A PSD kiterjedése (fehér nyílhegy, illetve pirosas árnyalás) a gomba alakú tüske esetén a legnagyobb. (Newpher és Ehlers, 2009. alapján)

Új fonalas dendrittüske kialakulásához nagyjából 20 perc szükséges, és ha szinapszist nem alakít ki, akkor nagyjából egy óra alatt képes visszahúzódni (Heiman és Shaham, 2009). Ha azonban az axonális partnerét megtalálja, akkor megkezdí a stabilizálódását. Ennek során a posztzinapszisban aktinpolimerizáció révén szélesebbé válik a tüske feje, illetve a posztzinapszis apikális membrándoménjében megnő a ligandum-, illetve feszültség-függő ioncsatornák, neurotranszmitter-receptorok és adhéziós molekulák száma. Az ioncsatornákat,

¹ Itt nem részletezett módon a fonalas tüske kommunikál és „válogat” az axonális partnerei között.

receptorokat és az adhézíós molekulákat az aktinvázhoz különféle állványfehérjék kapcsolják (ilyen pl. a PSD95 fehérje is) (Kim és Sheng, 2011). Az állványfehérjék egyfajta hálózatszerű platformot alakítanak ki, amely a szinaptikus membrántól 10-20 nm-re található (Harris és Weinberg, 2012). Ennek a platformnak, az ehhez asszociálódó szignalizációs fehérjéknek és a receptoroknak az együttese elektronmikroszkópban erősen elektrondenz mátrix, emiatt poszt-szinaptikus denzitásnak (PSD) nevezzük (2. ábra). Épp ezért PSD ritkán fordul elő éretlen, kapcsolattal nem rendelkező tüskében. A preszinapszis membránjába is több adhézíós molekula lokalizálódik, illetve a preszinapszisban megnő a neurotranszmittert tartalmazó vezikulák száma. Mindezek eredményeképpen a szinapszis hatásfoka is nő.



2. ábra. Egy serkentő szinapszis elektronmikroszkópos képe. A preszinapszisban vezikulumok (piros nyíl) halmozódnak fel, a poszt-szinapszisban a poszt-szinaptikus denzitást zöld nyilak jelzik (Harris és Weinberg, 2012 alapján).

Az aktin F, illetve G formája dinamikus egyensúlyban van egymással, vagyis az aktinszálak hossza csak szabályozási faktor hatására változik. A membránfehérjék folyamatosan reciklizálódnak, ezek száma a szinaptikus membránban állandó tehát, amíg valamilyen szabályozó molekula azt meg nem változtatja. Látható, hogy az összes fent leírt folyamat így módon oda és vissza is lejátszódhat, ami a szinaptikus plaszticitás lehetőségét biztosítja.

1.2. A RIN1 fehérje

A RIN1, azaz teljes nevén Ras Rab interactor 1 fehérje a sejtekben szerteágazó jelátviteli funkcióval bíró molekula. A RIN1 fehérje négy doménnel rendelkezik (Ziegler és mtsai., 2010). Az egyik az SH2, amely segítségével egy másik fehérje, az Abl1 és Abl2 foszforilált tirozinjára képes specifikusan kapcsolódni (Hu és mtsai., 2005), így az Abl fehérjékkel való interakciója révén hatással van a citoskeletális átrendeződésre (Ziegler és mtsai., 2010). Található benne egy prolinban gazdag régió (Prolin Rich Region, PRR) is, amely nem állandó térszerkezete miatt nagyfokú változatosságra képes (Williamson és mtsai., 1994). A RIN1 egy Ras-asszociált domént (RA) is tartalmaz, amelyen keresztül a Ras-RAF interakciót képes gátolni (Dhaka és mtsai., 2003), és a foszforilált Erk1/2 mennyiségét is képes csökkenteni (Tall és mtsai., 2001), ezen mechanizmusokon keresztül pedig képes alternatív útvonalakra terelni a RAS-RAF-MEK-ERK jelátviteli útvonalat, amely a géntranszkripciót befolyásolhatja. GEF (guanin nucleotid exchange factor) doménje (Vps9) révén a Rab fehérjéket, különösen a Rab5 fehérjét képes aktiválni, amely a korai

endoszómákhoz kapcsolódva az endocitotikus folyamatokban játszik jelentős szerepet (Tall és mtsai., 2001; Balaji és mtsai., 2012).

Előzetes eredmények

2.1. A RIN1 fehérje szerepe az amigdalában megfigyelhető szinaptikus plaszticitásban

A RIN1 fehérje megjelenése egybevág a szinaptogenezis fő időszakával, legnagyobb mennyiségben a hippocampusban, az amigdalában, a striatumban és a nagyagykéregben fordul elő (Dhaka és mtsai., 2003). RIN1 génhiányos állatok vizsgálatakor megfigyelték, hogy a RIN1 fehérje hiányában a kiváltható LTP mértéke a hippocampusban nem, de az amigdalában szignifikánsan megnövekszik. Ezzel a viselkedési tesztek eredményei is összhangban voltak: a hippocampuszhoz köthető, térbeli tájékozódást vizsgáló tesztekben a RIN1 génhiányos állatok hasonlóan viselkedtek, mint vad típusú társaik. Az amigdalához köthető viselkedések (íz-averzió, félelem kondicionálás) tesztelése során azonban a RIN1 génhiányos állatok szignifikánsan jobban tanultak, mint a kontroll egerek (Dhaka és mtsai., 2003), vagyis a RIN1 fehérje hiánya a neuronális plaszticitást serkentette.

2.2. A RIN1 fehérje hatása a dendrittüskék morfológiájára és a dendritfa kiterjedésére

Bencsik Norbert, a labor egyik munkatársa transzfektált idegsejtenyészetekben, több száz dendrittüske kvantitatív elemzésével megállapította, hogy a RIN1 fehérje túltermeltetése a dendrittüskéket vaskosabbá teszi, és a zömök tüskék rovására a gomba és fonalas tüskék arányát megnöveli. Gulyás Márton, szintén a laborunk munkatársa, pedig Sholl analízissel kimutatta, hogy a RIN1 fehérje túltermeltetése a dendritfát komplexebbé teszi, vagyis a dendritelágazások számát megnöveli.

Saját célkitűzéseim

A 2011 őszén elkezdett TUDOK, illetve a 2012 nyarától megkezdett TDK kutatómunkám során arra kerestem a választ, hogy a RIN1 fehérje milyen hatással lehet a fejlődő, illetve érett dendrittüskék motilitására és stabilizálódására.

1. A RIN1 fehérje túltermeltetésének a dendrittüskék motilitására gyakorolt hatását transzfektált, élő idegsejtek dendrittüskéiről fluoreszcens mikroszkóppal készült felvételeken vizsgáltam. Eredményeimet a kontroll, csak a zöld fluoreszcens fehérjét túltermelő idegsejtek dendrittüskéiből nyert adatokkal hasonlítottam össze.
2. A PSD95, a posztzinaptikus denzitásra jellemző állványfehérje lokalizációját is elemeztem konfokális mikroszkóppal. Az elemzéseim során a szekunder és terciér dendritágakban, illetve a dendrittüskékben vizsgáltam, hogy a RIN1 túltermeltetése a PSD95 lokalizációjára milyen hatással van.
3. A posztzinaptikus denzitás a stabil tüskékre jellemző, amelyek általában alkalmasak szinaptikus kapcsolat kialakítására. Az aktív szinapszis meglétét csak elektronmikroszkópos felvételek bizonyíthatnák egyértelműen, de a fénymikroszkóppal detektálható pre-, illetve posztzinaptikus markerek appozíciója is valószínűsíti a szinaptikus kapcsolatot. Ezért a szinaptofizin, preszinapszisban lokalizálódó fehérjét immuncitokémiai eljárással fluoreszcens mikroszkópban láthatóvá tettem és így vizsgáltam a PSD95, illetve a szinaptofizin együttes lokalizációját.

Anyag és módszer

4.1. Felhasznált állatok

In vitro kísérleteimet primer egér hippocampális idegsejt-tenyészeteken végeztem. A CD1 egereket az ELTE Biológiai Intézet állatházában tartottuk állandó $22\pm 1^\circ\text{C}$ -os hőmérsékleten, 12 órás nappali/esti ciklus mellett. Az állatkísérletek elvégzéséhez a laboratórium minden szükséges engedéllyel rendelkezik.

4.2. A tenyésztő edények előkészítése, a kiültetés menete és a sejtek tenyésztése

A tenyészeteket 0,1%-os Poly-D-Lysinnel és lamininnal (Sigma L2020, 10 $\mu\text{g/ml}$) kezelt, 13 mm-es üveglemezeket tartalmazó 24 lyukú tenyészedényekben neveltem. A kiültetés előtt legkésőbb néhány órával a lyukakat feltöltöttem tápfolyadékkal. A tápfolyadék

összetétele: Neurobasal médium (NB, Invitrogen), 5% FCS (Fetal Calf Serum, vagyis magzati borjú vérszéruma, Biochrom), B27 (meghatározott összetevőjű kiegészítő, Invitrogen), Glutamax (0,5 mM, Gibco), Gentamicin (antibiotikum, 40 µg/ml, Sanofi-Sintelabo), Amphotericin B (gombaölő, 2,5 µg/ml, Sigma).

A vemhes anyát cervikális diszlokációval megöltem, majd a 17-19 napos embriókat steril körülmények között kiemeltem. Az embriókat dekapitáltam, a hippokampuszokat sztereómikroszkóp segítségével kipreparáltam. A hippokampusz darabkákat az előmelegített foszfátpuffer (PBS, 1700µl), Dnáz (0,05%, 100 µl, Sigma), Tripszin-EDTA (0,05%, 200µl, Gibco) keverékkel elegyítettem, majd 15 percig, 37°C-on állni hagytam. A 15 perc lejárta után 1ml FCS-t mértem az elegyre, amely leállítja az emésztést. A keveréket centrifugáltam (10 perc, 25°C-on, 700-800 rpm), majd szuszpendálást követően steril szűrőmembránon (pórusátmérő: 42µm) átszűrtem. A sejtsűrűség számoláshoz Bürker kamrát használtam. A számolás alapján a 24 lyukú tenyésztőedényekbe 5% FCS-NB tápfolyadékban lyukanként $1,5-1,7 \times 10^5$ sejtet ültettem ki.

A kiültetés utáni első nap teljes tápcsere szükséges. Az aljzatsejtek mennyiségétől függően a második vagy harmadik napon 10 µM végkoncentrációjú citosin-arabinofuranosiddal (CAR) kezeltem a tenyészetet, hogy meggátoljam a gliasejtek további osztódását. A negyedik vagy ötödik napon 1/3-os tápcserére került sor, amit FCS-t nem tartozó tápfolyadékkal végeztem. A sejteket a kiültetés után 9 napig 37° C-on, 5%-os CO₂ szint mellett, termosztátban tenyésztettem.

4.3. A liposzómás transzfekció

A plazmidok bejuttatását, azaz a transzfekciót 9 napos tenyészeteken végeztem. A transzfekcióhoz felhasznált plazmidokat a Stuttgarti Egyetem Sejtbiológiai és Immunológiai Intézetében dolgozó Angelika Hausser bocsátotta a laboratóriumunk rendelkezésére. A kívánt mennyiségű plazmidot (pEGFP: 0,3 µg/lyuk; pPSD95-mCherry: 0,8 µg/lyuk; pRIN1-EGFP: 0,5 µg/lyuk) lyukanként 50 µl NB-ban hígítottam. A Lipofectamine 2000 elnevezésű, liposzómás transzfekcióhoz használt reagenst (Invitrogen) 1 µg DNS:2 µl Lipofectamine 2000 arányban, szintén 50 µl NB-ban hígítottam. A két keveréket elegyítettem. A tenyészetek tápját lecseréltem antibiotikum- és szérum-mentes tápfolyadékra, és hozzáadtam a transzfekciós elegyet. 4-6 óra elteltével a transzfekciós tápfolyadékot az eredeti tápfolyadékra visszacsereztem.

4.4. A sejtek fixálása

A fixálást a transzfekció időpontját követő 20-24 órán belül 4%-os paraformaldehid-PBS oldattal (pH 7,4, 20 perc szobahőn) végeztem el a 10 napos (days in vitro; DIV10) tenyészeteken. Az így lefixált tenyészetek egy részét azonnal lefedtem, más részén immunfestést hajtottam végre.

4.5. Immuncitokémiai vizsgálatok

A fixált tenyészeteket 5 percig 0,1% TritonX100-PBS oldattal kezeltem, majd PBS-sel lemostam. A nem specifikus fehérje kötőhelyeket 2% BSA-PBS- NaN_3 oldattal (BSA: marha szérum albumin) másfél órán át, szobahőmérsékleten blokkoltam. A preszinaptikus partner detektálása érdekében a szinaptofizint, egy, a szinaptikus vezikula membránjában lokalizálódó molekulát fluoreszcensen jelöltem. A primer ellenanyag egér anti-szinaptofizin (α -synaptophysin, Sigma), amelyet 2% BSA-PBS- NaN_3 blokkolóban 1:1000 arányban hígítva, 100 μl /csepp térfogatban használtam. A tenyészeteket egy éjszakán át, 4°C-on inkubáltam, majd másnap 3x PBS-mosást végeztem. A szekunder ellenanyag kecskében termeltetett poliklonális, Alexa633 fluorokrómmal jelölt anti-egér immunglobulin (Invitrogen) volt, amit a sejteken 1:300 hígításban, 2% BSA-PBS- NaN_3 blokkolóban oldottam és 100 μl /csepp térfogatban, 1-1,5 órán keresztül szobahőmérsékleten állni hagytam. Ezt követően a lemezeket 3x PBS-sel mostam. Az immunfestett tenyészeteket Mowiol-Dapi nevű, magfestésre is alkalmas lefedő anyaggal fedtem. A tárgylemezeket sötétben, szobahőmérsékleten megszáritottam, majd száradás után 4°C-on tároltam.

4.6. Konfokális mikroszkópos felvételek készítése

A vizsgálatokhoz Olympus FV500 konfokális mikroszkópot és 10x száraz, illetve 60x olajos immerziós objektívet (1,4 NA) használtam. Az EGFP-vel jelölt fehérjét (RIN1-EGFP vagy üres EGFP vektor kontroll) 488 nm-es multiargon, a PSD95-mCherry fehérjét 543 nm-es hélium-neon zöld (HeNeG), az α -synaptophysin-Alexa 633 fehérjekomplexet 633 nm-es hélium-neon piros (HeNeR) lézerrel gerjesztettem. Az emissziós szűrők kiválasztásánál (EGFP: BA505-525; mCherry: BA595-615; Alexa633: BA660IF) ügyeltem arra, hogy az egyes csatornák közötti „áthallást” a lehetőségek szerint kivédjem. Mivel az egyes fluorokrómok gerjesztési és emissziós spektruma, ha kis mértékben is, de óhatatlanul átfed, az egyes csatornákat rétegenként külön-külön detektáltam, vagyis szekvenciális scannelészt végeztem. A minták fakulásának megelőzésére a gerjesztő lézerek intenzitását a lehető legkisebbre állítottam (488 nm: 19%, 543 nm: 27%, 633 nm: 24%), a foton sokszorozón egyformán (PMT) 700 V beállítást alkalmaztam. Az elektronikus erősítést nem alkalmaztam,

az offset-et vagy 0%-ra (EGFP és Alexa 633 jel) vagy 3-4%-ra (mCherry jel) állítottam. A jobb jel-zaj viszony érdekében 2x Kalman filtert is alkalmaztam. A z-síkokban 0,3 – 0,5 mikrométeres vastagságú rétegeket készítettem, majd ezeket projektáltam. A teljes sejtalak megjelenítésénél 12-15, a dendritekre fókuszálva pedig 3-5 z síkban készítettem rétegfelvételeket.

4.7. A fixált sejtekről készített mikroszkópos felvételek elemzése

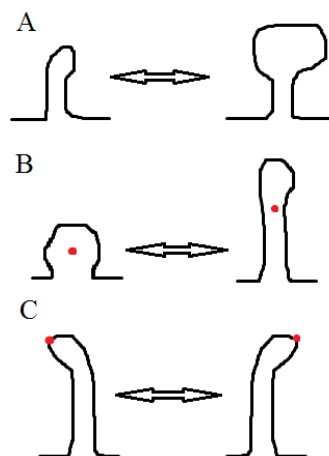
A dendrittüskekről készült mikroszkópos felvételek elemzéséhez az ImageJ nevű számítógépes képelemző programot használtam. Az elemzések során megmértem az adott terciér dendritszakasz hosszát, és megszámláltam a benne található PSD95 tartalmú depozitokat, amelyek a környezettől eltérő, világos foltként látszottak a felvételeken. Ezen kívül szubjektíven, az alábbi bélyegek alapján besoroltam a dendrittüskeket a *fonalas*, *gomba*, illetve *zömök* tüske kategóriák valamelyikébe: a zömök tüske rövid struktúra, szélessége és hosszúsága közel egyező; a fonalas tüske nyak és fejszélessége nagyjából megegyezik, és a hossza mindkettőnél jóval nagyobb; a gomba alakú tüskék fejszélessége nagyobb, mint a nyakszélessége, a hosszuk változó lehet, de mindenképpen nagyobb, mint a tüske nyakának a szélessége. Végül pedig tüsketípusonként megállapítottam a PSD95 tartalmú tüskék arányát is.

4.8. Live cell imaging felvétele készítése (Tárnok K. munkája)

A Stuttgarti Egyetem Sejtbiológiai és Immunológiai Intézetével évek óta fennálló tudományos együttműködés keretein belül a laborunk egyik munkatársa, Tárnok Krisztián, élő és fluoreszcens markerekkel transzfektált idegsejtekről készített mikroszkópos felvételsorozatokot. A hippocampális neuronokat üvegfenekű petricsészében a fent leírt tenyésztési protokollnak megfelelően nevelte, majd a kiültetés után kilenc nappal a kontroll EGFP, vagy pedig a RIN1-EGFP plazmidkonstrukciókkal transzfektálta. A transzfekció utáni 20-24. óra elteltével, fűthető tárgyasztalon, 37°C-on a Zeiss Cell Observer inverz fluoreszcens mikroszkópos rendszerben 60x-os nagyítású objektívvel két másodpercenként ún. time-lapse felvételeket készített. 20 percen keresztül fotózta az egyes sejteket, így mindegyik neuronról összesen 600 kép készült.

4.9. A dendrittüskék mozgékonyságának számítógépes kiértékelése

A live cell imaging felvételek kiértékelésére a labor egyik munkatársa, Gulyás Márton készített egy programot. A program segítségével a dendrittüskéket képkockákként körberajzoltam és a tüskék „hegyét”, azaz a végpontját megjelöltem. Az adatok alapján a program kiszámította a körberajzolt tüske területét négyzetpixelben, a kerületét pixelben, illetve a súlypont és a végpont pixelkoordinátáit. A dendrittüskék alakváltozása rendszerint területváltozással is jár, például megnövekszik a tüske fejének átmérője (2. A ábra). Azonban vannak kismértékű területváltozással járó morfológiai változások, amelyek viszont nagy súlypontelmozdulással járnak. Ilyen például egy rövid, vastag tüske megnyúlása, amely eközben vékonyodik is (2. B ábra). A dendrittüske végpontjának azt a pontot nevezzük, aminek az eléréséhez a tüskén belül haladva a leghosszabb út szükséges. Ezzel az elemzéssel az előzőkön túl mérhettem azt a változást is, amely során egy hosszú, közel állandó területű dendrittüske csak a vége mozog, ami bár intenzív mozgás, de mégis csak kis súlypontelmozduláshoz vezet. Ilyen gyakran előfordul, amikor a filopodium keresi az axonális partnerét. Tehát az ún. integető mozgások detektálása érdekében a végpont elmozdulását követtem nyomon (2. C ábra).



2. ábra: A dendrittüskék mozgását legtöbbször területváltozás követi, ilyen a fej méretének megnövekedése, illetve csökkenése (A). Vannak azonban területváltozással nem járó morfológiai változások, amikről a súlypont elmozdulása ad képet, ilyen a zömök tüske megnyúlása (B). Az integető mozgást az előző kettővel nem, azonban a végpont elmozdulásával nyomon lehet követni.

Két, félidőben fixált tenyészetről, valamint 4 kontroll, EGFP-vel és 4 RIN1-EGFP-vel transzfektált tenyészetéről készített képsorozatot elemeztem, az egyes adatsorokat Excel segítségével összesítettem és értékeltem ki.

4.10. Statisztikai elemzések

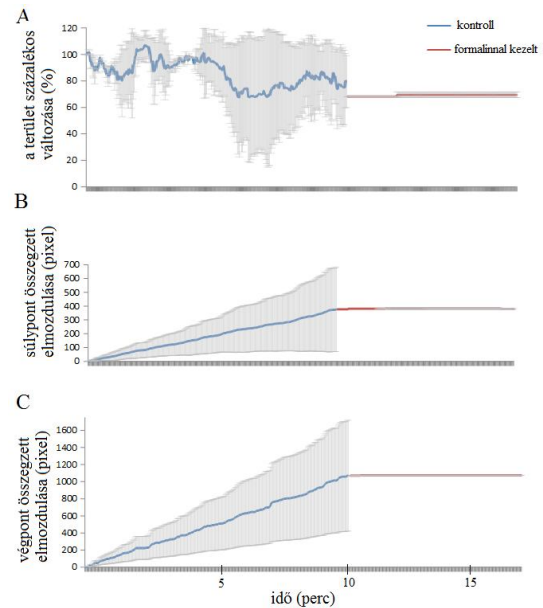
A szignifikancia megállapítására a Student-féle T tesztet használtam. A grafikonokon az átlag és a standard deviáció van feltüntetve.

Eredmények

5.1. A RIN1 fehérje túltermelésének hatására a dendrittüskék stabilabbá válnak

A dendrittüskék alakjukat mind in vivo, mind in vitro körülmények között változtathatják. Előzetes elvárásunk az volt, hogy a már rögzült, stabil szinaptikus kapcsolattal rendelkező tüskék alakja állandóbb lesz, mint a még „keresgélő”, vagy éppen ki- vagy visszafejlődő tüskék alakja. Ennek elemzésére csak olyan kísérletes rendszer lehet alkalmas, amely a dinamikus változások időbeli nyomon követését biztosítani tudja.

A Stuttgarti Egyetem készített live cell imaging felvételek ennek a feltételnek megfelelnek. Az én feladatom az volt, hogy a Tárnok Krisztián által rögzített, 20 perc valós időtartamot lefedő képsorozatot a 4.9. fejezetben leírtaknak megfelelően kiértékeljem. Először azonban meg kellett győződnünk arról, hogy a kísérleti rendszer, illetve a kiértékelte paraméterek a valós, időbeli változásokat valóban tükrözik. Ezért az elemzéseket először olyan tenyészetben végeztem el, amit a felvételsorozat kezdetének 10. percében 4% paraformaldehiddel kezeltek (3. ábra). A paraformaldehid hatására 1 percen belül az élő sejtekben minden mozgás megszűnt (ennyi idő kellett a vizsgált tenyészetben az oldatok lecseréléséhez - ez idő alatt képrögzítés nem történt, így a mozgások leállításának kinetikáját nem tudtam elemezni). A fixálást követően újraindított felvételeken sem a tüskék terület- és kerület változásában, sem a súlypont vagy a végpont elmozdulásában nem kaptam változást (3. ábra).

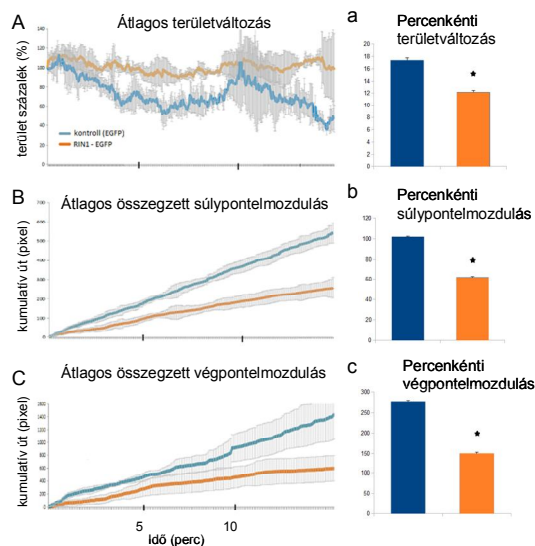


3. ábra. A 10. percben formalinnal kezelt tüskék a kezelés előtt igen, azt követően viszont nem mozogtak. Ezért a fixálás után sem a relatív terület (A), sem a súlypont és a végpont pozíciója (B, C) nem változott. Két mérés átlaga és szórása látható a grafikonokon.

A RIN1 fehérje túltermeltetésére bekövetkező változások elemzéséhez végignéztem az összes rögzített felvételt (15 EGFP és 18 RIN1-EGFP felvételsorozat), majd kiválasztottam azokat, amelyek technikai hibát nem tartalmaztak (azaz pl. nem mozdult el a fókusz sík, a fluoreszcencia állandó szinten maradt), emellett egy szépen kiterült dendritfa szekunder dendritágairól készültek. A felvételek általában több z-síkban készültek, ezek közül azzal dolgoztam, amelyben a vizsgált dendritszakasz képe a legélesebb volt.

Azt tapasztaltam, hogy a kiszélesedett fejjel rendelkező, gomba alakú tüskék is mozognak valamennyire, de a fonalas tüskék a 20 perces vizsgálati idő alatt sokkal mozgékonyabbak voltak. Éppen ezért az elemzéshez minden esetben fonalas tüskét választottam ki. Az Axiovision program segítségével egy-egy dendrittüskét felnagyítottam, majd a kinagyított területeket képsorozatként exportáltam és a 4.9. fejezetben leírtaknak megfelelően elemeztem. Eredményeim alapján a RIN1 fehérje túlexpresszáltatásának hatására a dendrittüskék területe időben kevésbé változik, mint a kontroll sejtek dendrittüskéinek területe (4. A ábra). A kontroll dendrittüskék területváltozásai emellett időben nagyobb fluktuációt is mutattak. Megnéztem az egy perc alatt bekövetkező változásokat is. Ezeket átlaga a RIN1 fehérjét túltermelő, illetve a kontroll sejtek dendrittüskéinek mozgékonyasága között szignifikánsan eltérést mutatott (4. a ábra).

A területváltozásnál megfigyeltekkel összhangban a RIN1-et túltermelő sejtek dendrittüskéinek súly- és végpontjai kisebb időben összegzett elmozdulást² mutattak, mint a kontroll sejtek tüske-súlypontjai (4. B, C ábra). Az egy percre vonatkoztatott, átlagos súly-és



4. ábra. A dendrittüskék motilitásának elemzéséből készült saját eredmények. Négy kontroll és négy RIN1 fehérjét túltermelő idegsejt egy-egy filopodiumának vizsgálatából származó eredmények átlaga és szórása látható a grafikonokon. A RIN1 fehérjét túltermelő sejtek dendrittüskéi az időben kisebb területváltozást mutattak, mint a kontroll sejtek dendrittüskéinek területei (A). A RIN1 fehérjét túltermelő sejtek dendrittüskéi súlypontjainak (B) és végpontjainak (C) összegzett elmozdulása az időben kisebb volt, mint a kontroll sejtek dendrittüskéié. Az oszlopdiagrammok a percenkénti átlagos területváltozást (a), súlypont (b) és végpont (c) elmozdulást ábrázolják. Látható, hogy a RIN1 fehérje túltermeltetése a dendrittüskék mozgását a fenti szempontok alapján szignifikánsan lecsökkentette. * $p < 0,05$

² Összegzett elmozdulásnak nevezzük, amikor az egyes előző képkockához viszonyított, tehát relatív változásokat összegezzük.

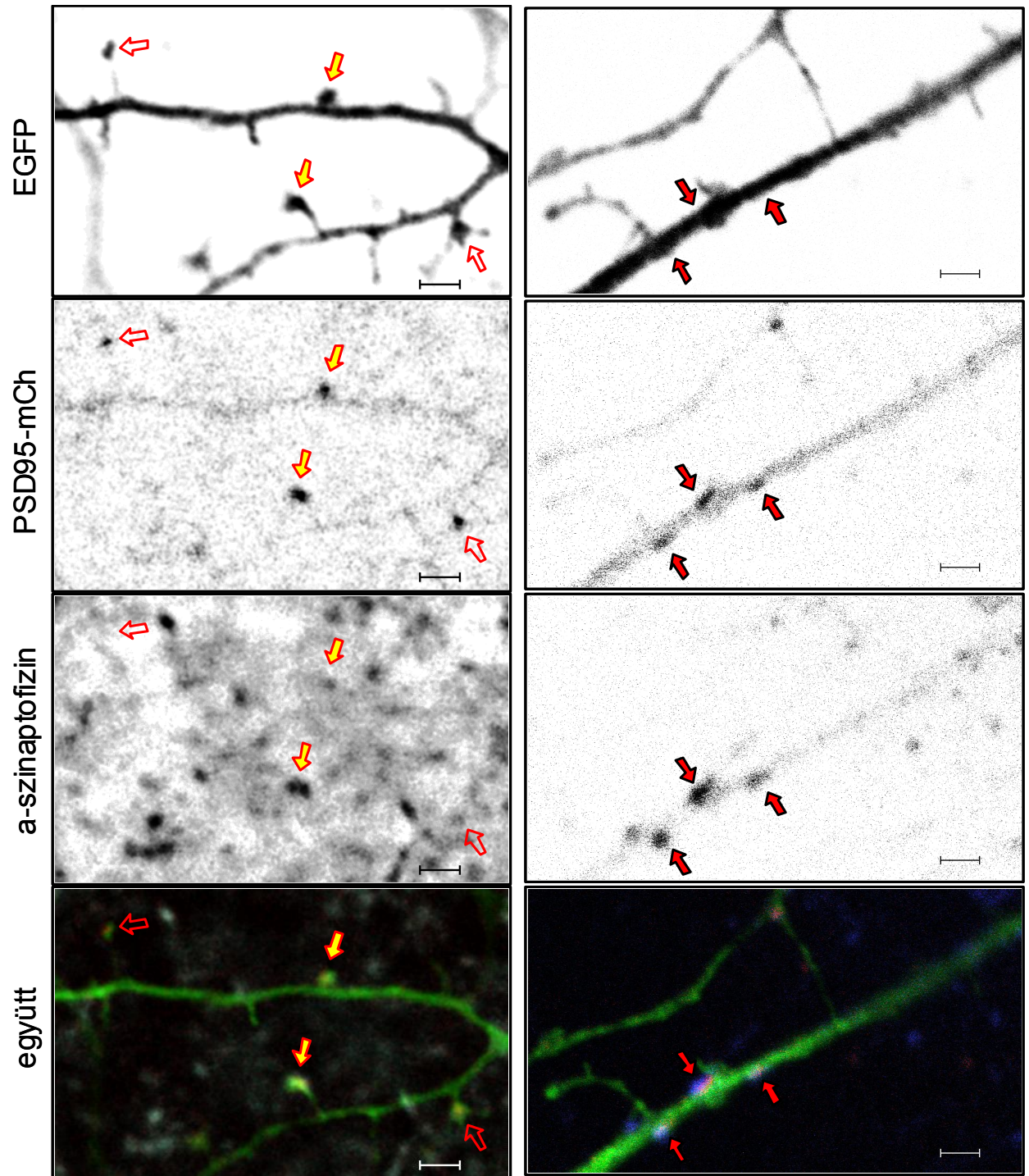
végpontelmozdulás pedig egyaránt szignifikánsan kisebb volt a RIN1 fehérjét túltermelő sejtek denrittüskéinek esetében, mint a kontroll neuronok dendrittüskéinél (4. b, c ábra).

Érdemes megjegyezni, hogy amíg a RIN1 génhiányos és a kontroll állatok hippocampuszhoz köthető funkcióinak végrehajtásában nem tapasztaltak különbséget (Dhaka és mtsai., 2003), eredményeim alapján a RIN1 fehérje túltermeltetése esetén a transzfektált hippocampális idegsejtekben, a dendrittüskék szintjén van morfológiai és motilitásbeli változás.

5.2. A PSD95 posztzinaptikus és a szinaptofizin preszinaptikus marker appozíciója a tenyészetekben szinapszisok kialakulását jelzi

A stabil serkentő szinapszisok egyik általános jele a PSD kialakulása, amely különböző típusú tüskékben általában eltérő arányban található. A posztzinaptikus denzitásban lokalizálódó egyik állványfehérje, a PSD95 megjelenése szinaptikus kapcsolatra utal, amire egy erősen motilis struktúra, mint amilyen a filopódium, kis eséllyel képes. Kísérletes rendszerünkben a preszinaptikus partner közelségét egy preszinaptikus marker, a szinaptofizin fehérje lokalizációja mutatta: a posztzinaptikus denzitás melletti lokalizációja nagy valószínűséggel a szinaptikus kapcsolat kialakulását jelzi.

Mivel az endogén PSD95 fehérjét specifikusan felismerő ellenanyag nem áll rendelkezésünkre, a PSD95 fehérjének az mCherry fehérjéhez kötött változatát transzfekció segítségével túltermeltettem, majd a pirosan fluoreszkáló jel lokalizációját konfokális mikroszkóppal készített felvételeken vizsgáltam. A képeken a három jellemző dendrittüske-struktúra (zömök, fonalas, illetve gomba alakú tüske) mind a RIN1-et túltermelő, mind a kontroll idegsejtek dendritágain megtalálható volt. A szinaptofizin lokalizációjának vizsgálata során azt tapasztaltam, hogy a preszinaptikus marker a fonalas tüskék mellett ritkán, a zömök és gomba alakú tüskék mellett viszont gyakran volt detektálható. Ez a közeli lokalizáció a PSD95-öt tartalmazó tüskék esetében igen gyakori volt (5. ábra).

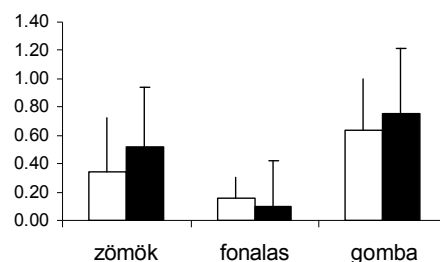


5. ábra. 2 dendritszakasról konfokális mikroszkóppal, 3 csatornán készített fluoreszcens felvételek. Az egymás alatti képek ugyanazt a területet ábrázolják. Az EGFP (felső képek), a PSD95-mCherry (2. sor) és az Alexa633-mal jelzett anti-synaptophysin (3. sor) képeket a jobb láthatóságért invertálva mutatom be. A legalsó sorban a 3 szín együtt látszik (EGFP: zöld, PSD95-mCherry: piros, Alexa633: kék). A mérce 2 μ m. A telt nyilak olyan struktúrákat jeleznek, amelyekben a PSD95 és a synaptophysin jel közeli appozícióját detektáltuk. Ezt mind a gomba alakú (sárga kitöltés), mind pedig a zömök tüskék esetében (piros kitöltés) láttuk. Volt azonban olyan gomba alakú tüske is, amely ugyan PSD95-mCherryt tartalmazott, de a preszinaptikus markert a közelében nem tudtuk detektálni (bal oldali kép, üres nyilak). A fonalas tüskékben a PSD95-mCherry jel nem volt detektálható.

Megfigyeléseimet kvantitatíven is elemeztem, ennek eredményeit mutatja a grafikon (6. ábra). Mind a RIN1-et túltermelő, mind a kontroll idegsejtekre igaz volt, hogy a PSD95-jel mindegyik típusú tüskékben megjelent, de eltérő arányban. A gomba alakú tüskék közel 80%-ában megfigyeltem a PSD95 felhalmozódását, ami a fonalas tüskék esetében alig volt jellemző. A zömök tüskék közel felében a PSD95-mCherry jel is detektálható volt, Eddigi méréseim azt mutatják, hogy a RIN1 fehérjét túltermelő sejtek zömök és gomba alakú tüskéiben ennek aránya valamivel magasabb volt, mint a kontroll, EGFP-vel kotranszfectált idegsejtekben, de a különbség eddigi elemzéseim alapján nem bizonyult szignifikánsnak.

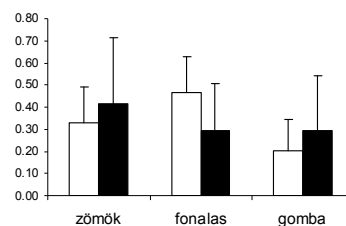
A RIN1 fehérje túltermeltetése a transzfectiótól számított 24 órán belül a dendrittüskék morfológiájára is hatással volt. Eddigi adataim alapján a kontroll sejtek terciér dendritágain leggyakrabban a fonalas tüskék voltak jelen, míg a RIN1-et túltermelő neuronok terciér dendritágain viszont a gomba alakú tüske volt a leggyakoribb, egyúttal megnőtt a zömök tüskék aránya is (7. ábra). A nagy szórások miatt a különbségek még nem szignifikánsak.

PSD95 tartalmú tüskék aránya



6. ábra. A PSD95-mCherry depozitok arányának vizsgálata kontroll (fehér oszlopok), illetve a RIN1 fehérjét túltermelő (fekete oszlopok) dendritekben. Az idegsejtek terciér dendritágain lévő, PSD95-mCherry szignált tartalmazó dendrittüskék átlagos aránya a tüsketípusok szerint. A RIN1 fehérje túltermeltetése esetén a zömök tüskékben némileg megnő a PSD tartalom. (n=520)

tüske-típusok megoszlásának aránya



7. ábra: A kontroll (fehér oszlop) és a RIN1-et túltermelő (fekete oszlop) idegsejtek terciér dendritágain megtalálható tüskék típusának eloszlása. A grafikonon az átlag és a szórás van feltüntetve (n=520)

Diszkusszió

A dendrittüskék morfológiai változásainak és motilitásának kutatása élő szervezetekben technikailag igen nehéz, ezért mi sejtenyészeteken végeztük a vizsgálatainkat. A sejtenyészetekben az idegsejtek motilitásának vizsgálatára a live cell imaging módszer alkalmas, amihez szintén komoly technikai háttér szükséges. Sajnos, a rögzített képsorozatok elemzése sem gyorsan kivitelezhető feladat: az általam elemzett két fixált, illetve a 4 kontroll és a 4 RIN1 fehérjét túltermelő sejt egy-egy dendrittüskéjéről rögzített, 600 képkockából álló sorozatok elemzése összesen 6000 képkocka kiértékelését jelentette.

A dendrittüskék morfológiáját és egyes fehérjék lokalizációját fixált preparátumokon is lehet vizsgálni. Ez esetben adott időpillanatokban rögzítjük a sejtek morfológiai állapotát, ami a jellemző dendrittüske morfológia megállapítására lehetőséget biztosít. A kezelések vagy pl. a RIN1 túltermeltetésének hatását is elemezhetjük, de ezekben a fixált rendszerekben a változások dinamikájára, azaz pl. arra, hogy a gomba alakú tüskék milyen struktúrákból és milyen gyorsan alakultak ki, nem kaphatunk választ.

Kísérletes rendszerünkben a RIN1 fehérje túltermeltetése miatti morfológiai és motilitásbeli változásokat vizsgáltam. A sejtekben a PSD95 fehérje túltermeltetése szintén hatással van a tüskék morfológiájára és a szinaptikus plaszticitásra. Állványfehérje, így érthető, hogy túlexpresszáltatása a tüskék stabilitását növeli (Zhang és mtsai., 2012). Épp ezért a RIN1 és PSD95 fehérjékkel kotranszfektált neuronok kontrollja a PSD95 fehérjével transzfektált neuron volt.

Eredményeim azt mutatják, hogy a RIN1 fehérje túltermeltetésének hatására a neuronok dendrittüskéinek morfológiája megváltozik. Eddigi méréseim azt mutatták, hogy a zömök tüskék rovására némileg megnő a filopodiális és gomba alakú tüskék aránya, ami Bencsik Norbert jóval nagyobb adatszámmon alapuló, így statisztikailag szignifikáns eredményeivel összhangban áll. A gomba és a zömök tüskékkel szemben gyakran szinaptofizin jelet is láttam, ami arra utal, hogy ezekben a struktúrákban már valódi szinapszisok is kialakulhattak – a preszinaptikus partner legalábbis ehhez kellő közelségbe kerülhetett. Ahhoz mindenképpen további elemzésekre van szükségem, hogy a RIN1 túltermeltetés és a szinaptikus kapcsolatok kialakítása közötti összefüggést vizsgálhassam. A live cell imaging felvételsorozatok alapján azt a következtetést mindenesetre levonhattam, hogy a RIN1 megnövekedett mennyisége a fonális tüskék mozgékonyágát csökkentette, ami

a szinapszis kialakulásának és/vagy stabilizálódásának lehetőségét is megnövelte.

A RIN1 fehérje a tüskék motilitásának és morfológiájának megváltoztatását, stabilizálását, és a dendritfa elágazásai számának növekedését feltételezhetően – legalábbis részben – az aktin-polimerizációra gyakorolt hatása révén fejthette ki (Hotulainen és Hoogenraad, 2010). Bár nem zárhatjuk ki a lehetőséget, hogy a RIN1 fehérje a vezikuláris transzportfolyamatok megváltoztatásán keresztül is hat (Deininger és mtsai., 2008; Balaji és mtsai., 2012), feltételezhetjük, hogy a dendrittüskék megvastagodását és mozgékonyságának csökkenését elsősorban az aktin váz szerkezetében bekövetkező változások, így az aktin váz flexibilitásának csökkenése okozza. Ennek bizonyítására ún. FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) kísérleteket tervezünk végezni. Ennek során a neuronokban az aktin monomereket transzfekció segítségével fluoreszcensen jelöljük, majd az idegsejt egy dendrittüskéjét addig gerjesztjük a konfokális mikroszkóp lézerével, míg az összes fluoreszcens fehérje „ki nem ég”. Méréseink során a fluoreszcens jel visszaállásának dinamikáját vizsgáljuk majd, ami az aktin monomerek transzportjának és az aktinpolimerizációnak a sebességén múlik. Tehát, ha az aktinpolimerizációt befolyásolja a RIN1 fehérje túltermeltetése, akkor az így bekövetkező változást is ki tudjuk mutatni.

A RIN1 fehérjének a PSD95 fehérje lokalizációjára gyakorolt hatásáról egyelőre még csak előzetes eredményem van. Megfigyeléseim alapján a RIN1 túltermeltetése a PSD95 fehérje tartalmú zömök és gomba alakú tüskék arányát némileg megnövelte, ami utalhat arra, hogy az eleve is stabilabb tüskékben a RIN1 túltermeltetése a PSD kialakulását és így a PSD95 fehérje felhalmozódását serkentheti.

Mindezek alapján azt mondhatjuk, hogy a RIN1 fehérje túltermeltetése feltehetően elősegíti a szinaptikus kapcsolatok kialakulását és stabilizálja a már kialakult kapcsolatokat. Ez az „előny” viszont a külső hatásokhoz, stimulusokhoz való alkalmazkodás képességét, vagyis a szinaptikus plaszticitást csökkenti. Ez az eredmény összhangban van azzal a már korábban említett megfigyeléssel (2.1. fejezet), hogy a RIN1 fehérje hiánya a szinaptikus plaszticitást növelte. Egyúttal ki is egészíti, hiszen megmutatja, hogy a posztzinaptikus komponens morfológiai és motilitásbeli változása okozza a szinaptikus plaszticitásban bekövetkező változásokat.

Szerzői hozzájárulás

- Számítógépes kiértékelő program segítségével nagyjából 6000 képkocka elemzésével vizsgáltam a fonalas dendrittüskék motilitását, az adatokat kiértékeltem.
- Elsajátítottam a hippocampális idegsejtenyészet készítésének és fenntartásának technikáit.
- Liposzomális transzfekció segítségével az EGFP, illetve a RIN1 fehérje EGFP-vel és a PSD95 mCherry-vel jelzett változatát túltermeltettem neuronokban.
- Immuncitokémiai eljárással detektáltam a preszinaptikus szinaptofizin marker jelenlétét. A fluoreszcensen jelzett egyes fehérjék lokalizációját konfokális mikroszkóp segítségével detektáltam, az adatokat kiértékeltem.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom az ELTE Élettani és Neurobiológiai Tanszék laboratóriumában dolgozó munkatársaimnak, Tárnok Krisztiánnak, aki a live cell imaging felvételeket készítette és minden kérdésemre kimerítően válaszolt, Gulyás Mártonnak, aki a kiértékelő számítógépes programot írta, és Bencsik Norbertnek, aki megosztotta velem az eredményeit. Legfőképpen pedig Schlett Katalinnak szeretném megköszönni a munkáját, aki amellett, hogy elsősorban segítette és felügyelte a kísérletes munkámat, a dolgozatomat is lektorálta.

Hivatkozásjegyzék

- Azevedo, F. a C., Carvalho, L. R. B., Grinberg, L. T., Farfel, J. M., Ferretti, R. E. L., Leite, R. E. P., Jacob Filho, W., et al. (2009). Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *The Journal of comparative neurology*, 513(5), 532–41. doi:10.1002/cne.21974
- Balaji, K., Mooser, C., & Janson, C. (2012). RIN1 Orchestrates the Activation of RAB5 GTPases and ABL Tyrosine Kinases to Determine EGFR Fate. *Journal of Cell Science*, 2012 Sep 12. [Epub ahead of print] Retrieved from <http://jcs.biologists.org/content/early/2012/08/27/jcs.113688.short>
- Deininger K., Eder M., Kramer E. R., Zieglgänsberger W., Dodt H. U., Dornmair K., Colicelli J., Klein R. (2008) The Rab5 guanylate exchange factor Rin1 regulates endocytosis of the EphA4 receptor in mature excitatory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(34):12539-44. doi: 10.1073/pnas.0801174105.
- Dhaka, A., Costa, R. M., Hu, H., Irvin, D. K., Patel, A., Kornblum, H. I., Silva, A. J., et al. (2003). The RAS effector RIN1 modulates the formation of aversive memories. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(3), 748–57. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12574403>

- Harris, K. M., & Weinberg, R. J. (2012). Ultrastructure of synapses in the mammalian brain. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(5). doi:10.1101/cshperspect.a005587
- Heiman, M., & Shaham, S. (2010). Twigs into branches: how a filopodium becomes a dendrite. *Current opinion in neurobiology*, 20(1), 86–91. doi:10.1016/j.conb.2009.10.016
- Hotulainen, P., & Hoogenraad, C. C. (2010). Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *The Journal of cell biology*, 189(4), 619–29. doi:10.1083/jcb.201003008
- Hu, H., Bliss, J. M., Wang, Y., & Colicelli, J. (2005). RIN1 is an ABL tyrosine kinase activator and a regulator of epithelial-cell adhesion and migration. *Current biology : CB*, 15(9), 815–23. doi:10.1016/j.cub.2005.03.049
- Newpher T. M. & Ehlers M. D. (2009) Spine microdomains for postsynaptic signaling and plasticity. *Trends Cell Biol.* 19(5):218-27. doi: 10.1016/j.tcb.2009.02.004.
- Rácz, B., & Weinberg, R. J. (2012). Microdomains in Forebrain Spines: an Ultrastructural Perspective. *Molecular neurobiology*. doi:10.1007/s12035-012-8345-y
- Sheng, M., & Kim, E. (2011). The postsynaptic organization of synapses. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(12). doi:10.1101/cshperspect.a005678
- Tall, G. G., Barbieri, M. a, Stahl, P. D., & Horazdovsky, B. F. (2001). Ras-activated endocytosis is mediated by the Rab5 guanine nucleotide exchange activity of RIN1. *Developmental cell*, 1(1), 73–82. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11703925>
- Williamson, M. P. (1994). The structure and function of proline-rich regions in proteins. *The Biochemical journal*, 297: 249–60. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1137821&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Yoshihara, Y., De Roo, M., & Muller, D. (2009). Dendritic spine formation and stabilization. *Current opinion in neurobiology*, 19(2), 146–53. doi:10.1016/j.conb.2009.05.013
- Zhang, P., & Lisman, J. E. (2012). Activity-dependent regulation of synaptic strength by PSD-95 in CA1 neurons. *Journal of neurophysiology*, 107(4), 1058–66. doi:10.1152/jn.00526.2011
- Ziegler, S., Eiseler, T., Scholz, R.-P., Beck, A., Link, G., & Hausser, A. (2011). A novel protein kinase D phosphorylation site in the tumor suppressor Rab interactor 1 is critical for coordination of cell migration. *Molecular biology of the cell*, 22(5), 570–80. doi:10.1091/mbc.E10-05-0427