

XXXI. OTDK Biológia Szekció

A Caskin1 fehérje hatása a dendrittüskék morfológiájára

Készítette:

Pusztai Szilvia Anna

Biológia BSc, 7. félév

Témavezető:

Dr. Schlett Katalin, egyetemi docens

Élettani és Neurobiológiai Tanszék

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM

TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR, BIOLÓGIAI INTÉZET



Budapest, 2012

Tartalomjegyzék

TARTALOMJEGYZÉK	2
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
ÖSSZEFOGLALÁS	4
BEVEZETÉS.....	5
A dendrittüskék	5
A posztzinaptikus denzitás	6
A CASK és a Caskin1 állványfehérje	7
CÉLKITŰZÉSEK.....	8
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	9
Sejtkultúrák.....	9
Transzfekció	9
Immuncitokémia.....	10
Mikroszkópia	11
A transzfektált idegsejtek dendrittüskéinek morfológiai elemzése	11
Statisztika.....	12
EREDMÉNYEK.....	13
Egér embrionális hippokampális idegsejttenyészetek a Caskin 1 idegrendszeri hatásánál vizsgálatára	13
A Caskin1 elsősorban szomatodendritikusan lokalizálódik	14
A PSD95 állványfehérje és a Caskin1 együtt lokalizálódik	16
A Caskin1 fehérje túltermeltetése a gomba alakú tüskék arányát megnövelte.....	17
A Caskin1-et túltermelő tüskék vajon kialakítanak-e szinaptikus kapcsolatokat?.....	19
DISZKUSSZIÓ	22
Hogyan hat a Caskin1 túltermeltetése a dendrittüskék morfológiájára?	22
Mi befolyásolhatja a Caskin1 felhalmozódását a dendrittüskékben?	23
Milyen hatást fejthet ki a Caskin1 a szinapszisokban?	24
SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS	25
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	25
IRODALOMJEGYZÉK.....	26

Rövidítések jegyzéke

Abi2: Abl-kötő fehérje-2

ANK: ankirin ismétlődés

CaM: kalcium-kalmodulin dependens protein

CASK: kalcium/kalmodulin-dependens szerin protein kináz

Caskin1: Cask kötő fehérje-1

EGFP: zöld fluoreszcens fehérje

LTP: hosszú távú hatékonyság-növekedés

MAGUK: membrán-asszociált guanilát kináz

PSD: posztzinaptikus denzitás

PSD95: a posztzinaptikus denzitásban lokalizálódó 95 kDa-os fehérje

PDZ: PSD-95, Dlg, ZO-1/2

SAM: steril alfa motívum

SH3: Src homológia 3

V5 tag: a Simian Vírus 5 P és V fehérjéjének C terminális szekvenciája
(GKPIPNNLLGLDST)

WAVE: WASP család verprolin homológia fehérje

Összefoglalás

A serkentő agyi szinapszisok többsége dendrittüskéken végződik. A dendrittüskék három típusát különböztetjük meg: a még kapcsolatkereső, hosszú „fonalas”, az érett szinapszisokra jellemző, stabil „gomba”, illetve a rövid, „zömök” tüskéket. Különböző stimulusok hatására a dendrittüskék morfológiája megváltozhat - mindez szoros kapcsolatban áll a szinaptikus plaszticitással, ezáltal a tanulási folyamatokkal és a hosszú távú memória kialakulásával is.

A Caskin1 (Cask-interaktív1 fehérje) csak a neuronokban fejeződik ki és a posztzinaptikus denzitásban (PSD) is expresszálódik. A Caskin1 szerkezetét tekintve „scaffold”, azaz állványfehérje, N-terminálisán számos fehérje- fehérje interakciós doménnel rendelkezik, C-terminálisa pedig rendezetlen szerkezetű. Molekuláris kapcsolóként működhet, de a PSD ultrastruktúrájának kialakításában betöltött szerepe pontosan még nem ismert.

TDK munkám során a Caskin1 fehérje dendrittüskék morfológiájára gyakorolt hatását vizsgáltam egér hippocampális idegsejteken. A Caskin1 fehérjét transzfekció segítségével túltermeltettem az idegsejteken. A kotranszfektált EGFP fluoreszcencia alapján konfokális felvételeken elemeztem a dendrittüskék alakját. Eredményeim alapján a Caskin1 mennyiségének növelése a gomba típusú, érett tüskék arányának fokozódásához vezetett. A Caskin1 a dendrittüskék morfológiabeli változásában azáltal játszhat szerepet, hogy a sejtfelszíni receptorok és az aktin-citoszkeleton között közvetíthet.

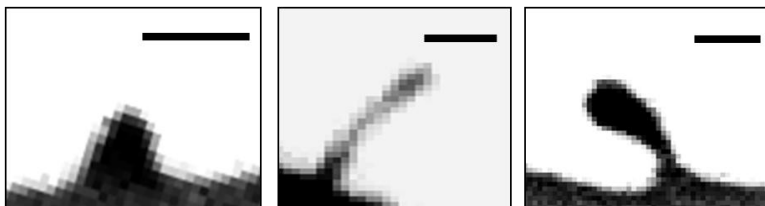
Bevezetés

Az idegrendszer felépítését és működését tekintve is a legbonyolultabb rendszer az élő szervezetben, működésének megértése napjaink intenzíven kutatott területe. A szinapszisok folyamatos változásra való képességét, vagyis azt, hogy használatfüggő módon átalakulhatnak, szinaptikus plaszticitásnak nevezzük. E sajátságának köszönhető a környezethez való alkalmazkodás, a tanulásra való képesség és a hosszú távú memória kialakulása is.

A dendrittüskék

A központi idegrendszerben a serkentő agyi szinapszisok többsége dendrittüskéken végződik. A serkentő szinapszisok morfológiai változásra való képessége az egyik legfontosabb sejtes mechanizmusa a szinaptikus plaszticitásnak. Az abnormális tüskestruktúrák gyakran neurológiai betegségekkel hozhatók összefüggésbe (Yoshiara és mtsai., 2009). Számos neuropszichiátriai betegség jár a dendrittüskék méret-, alak-, vagy számbeli változásával. Ezekben az esetekben az információáramlás sérül, gyengül a neuronális összeköttetés és a szinaptikus plaszticitás. Autizmus esetében a dendrittüskék morfológiai rendellenességei a szociális-kognitív funkciók gyengüléséhez vezetnek. A schizofréniára jellemző a szürkeállomány csökkenése, melyhez hozzájárulnak a tüskesűrűségbeli változások. Az Alzheimer-kórban szenvedőknél számos agyterületen (hippokampuszban és kortexben is) megfigyeltek dendrittüske szám csökkenést (Penzes és mtsai., 2011).

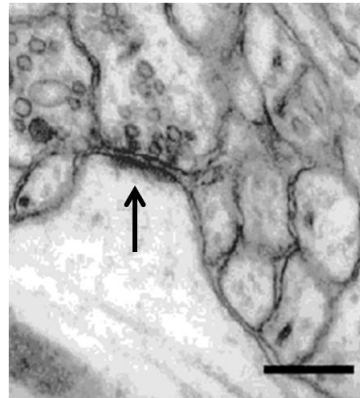
A dendrittüskék a korai posztnatális fejlődés során alakulnak ki és a tanulási folyamatok során formálódnak, morfológiájuk folyamatosan változik, még felnőtt korban is. Morfológiai sajátosságok alapján a dendrittüskék három típusát különböztetjük meg: a zömök, a fonalas és gomba alakú tüskéket (1. ábra). A dendritágon egy kezdeti kidudorodásként alakul ki a zömök tüske. Az aktin váz hossznövekedésével hosszú, kapcsolatkereső fonalas struktúra fejlődik. A szinapszis stabilizálódása során a tüske feje kiszélesedik és kialakul a gomba alakú struktúra, melyben megjelenik az érett, stabil tüskékre jellemző posztszinaptikus denzitás (PSD; Harris és Weinberg, 2012).



1. ábra. A transzfektált idegsejteken megfigyelhető dendrittüskék típusai: zömök (bal kép, mérce 0,2 μm), fonalas (középső kép, mérce 0,5 μm) és gomba alakú (jobb kép, mérce 0,2 μm) tüske.

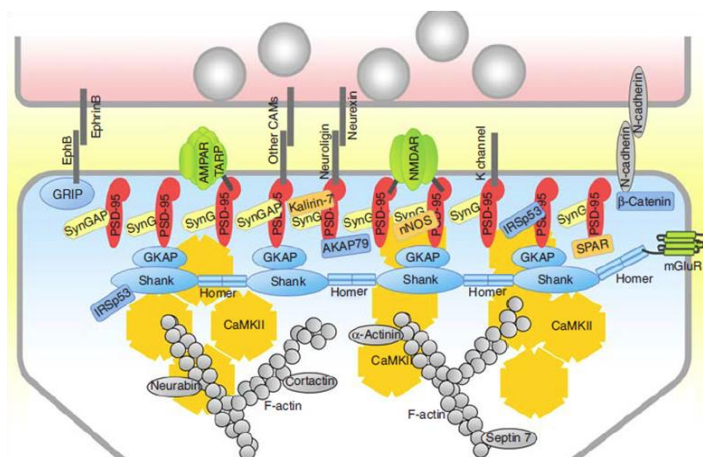
A posztszinaptikus denzitás

A posztszinaptikus denzitás egy elektrondenz megvastagodás ~35-50 nm-el a plazmamembrán alatt (2. ábra). A PSD a preszinaptikus membránnal szemben helyezkedik el, ami a transzsinaptikus kapcsolatot biztosítja. Fontos szerepe van a



2. ábra. A kémiai serkentő szinapszistról készült elektronmikroszkópos képen, a preszinaptikus vezikulák felhalmozódási területével szemben látható a posztszinaptikus denzitás (fekete nyíl). A mérce 0,3 μm . (Nimchinsky 2002)

preszinapszis felől érkező információ feldolgozásában, továbbításában. A PSD sokféle receptort, állványfehérjét, szignalizációs komplexet tartalmaz, melyek nélkülözhetetlenek a szinaptikus jelátvitelhez és a szinaptikus plaszticitáshoz (Sheng és Kim, 2011). A receptorok egy fehérjemátrixhoz kapcsolódnak, mely állványfehérjéket, aktinkötő fehérjéket és szignalizációs molekulákat tartalmaz (3. ábra). Az összetett fehérje-fehérje interakciós doméneket tartalmazó állványfehérjék egyfajta strukturális vázat alakítanak ki a posztszinaptikus denzitásban, így összeköttetést biztosítanak a receptorok, asszociációs fehérjék, valamint az aktin vázrendszer között. Az állványfehérjék által lokálisan kialakított molekuláris hálózatok így a szinaptikus plaszticitásban fontos szerepet játszó szignalizációs komplexként tudnak működni (Harris és Weinberg, 2012).



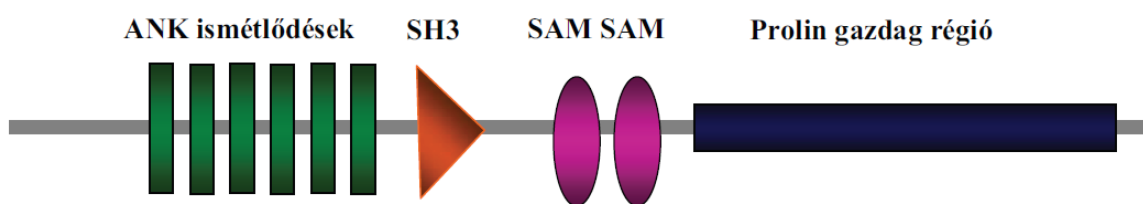
3. ábra. A neurotransmitter receptorok és transz-szinaptikus adhéziós molekulák alatt egy sűrű fehérjemátrix helyezkedik el, mely állványfehérjéket, aktinkötő fehérjéket, szignalizációs molekulákat tartalmaz (Sheng és Kim, 2011).

A CASK és a Caskin1 állványfehérje

A Caskin (Cask interaktív) fehérjét a CASK (calcium/calmodulin-dependens szerin protein kináz) kötőpartnereként fedezték fel (Tabuchi és mtsai., 2002). A CASK állványfehérje a membrán-asszociált guanilát kináz (MAGUK) fehérjecsaládba tartozik. N terminálisán található a CaM kináz domén. Középső szakaszán egy PDZ (PSD-95, Dlg, ZO-1/2) domén és egy SH3 (Src homológia 3) domén helyezkedik el, C terminálisán guanilát kináz domén található. A CASK fehérje kis mértékben minden szövetben detektálható, de az agyban fejeződik ki leginkább. Az idegsejtekben mind a pre-, mind a poszt-szinaptikus oldalon megtalálható (Südhof és mtsai., 1996).

A Caskin állványfehérje N-terminálisán hatszoros ankirin ismétlődés, egy SH3 domén és két steril alfa motívum (SAM) található (4. ábra). Ezt egy prolingazdag régió követi, végül egy rövid, evolúciósan konzervált C-terminális domén helyezkedik el (Tabuchi és mtsai., 2002). A hosszú prolingazdag régió rendezetlen szerkezetű, vagyis ez a szakasz nem rendelkezik másodlagos és harmadlagos szerkezettel. A rendezetlen szerkezet számos funkcionális előnyt jelent és megnövekedett interakciós kapacitást biztosít (Balázs, 2009; Tompa és mtsai., 2009). A Caskin domén-szerkezetében hasonlít a Shank poszt-szinaptikus állványfehérjéhez, ám ez a hasonlóság nem evolúciós kapcsolaton alapszik, hanem oka valószínűleg a funkcionális hasonlóság lehet (Tabuchi és mtsai., 2002).

A Caskin SH3 és SAM doménjei közti szakaszával kapcsolódik a Cask fehérje CaM kináz doménjéhez, a Mint1-gyel versengve. Jelenleg két izoformáját, a Caskin1-t és a Caskin2-t ismerjük, melyek a C-terminális régióban különböznek.

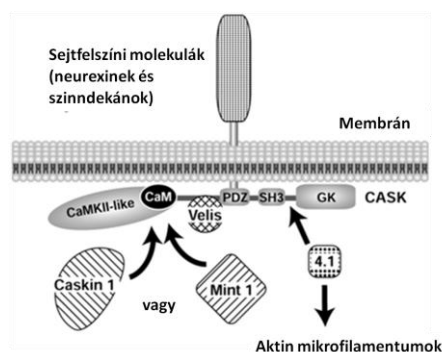


4. ábra. A Caskin1 fehérje doménszerkezete. (Balázs, 2009).

A Caskin1 fehérje csak az agyban, a szinaptikus területeken feldúsulva fejeződik ki (Tabuchi és mtsai., 2002). Habár a Caskin1 az idegrendszerben fejeződik ki a legnagyobb mennyiségben, pontos funkciójáról, pre- vagy poszt-szinaptikus szerepéről eddig csak találgatások születtek (Tabuchi és mtsai., 2002; Balázs, 2009).

A Caskin1 a preszinaptikus zónába lokalizálódik és számos preszinaptikus fehérjéhez kötődik (Tabuchi és mtsai., 2002; Balázs, 2009). A szindekánokat és neurexineket a CASK fehérjén keresztül kihorgonyozza (Tabuchi és mtsai., 2002). A synaptotagminnal alkotott

interakcióján keresztül részt vehet a szinaptikus vezikulák dokkolásában, mivel a Caskin1 fehérje molekulák SAM doménjeiken keresztül polimerizálódva egyfajta állványrendszert alakítanak ki (Stafford és mtsai., 2011). A Caskin1-nek szerepe lehet a Caskin1-Mint1 komplex kialakulásában és szabályozásában is, mivel a Caskin1 a Mint1-el verseng a Mint1/CASK/neurexin, illetve a Caskin1/CASK/ neurexin komplex kialakulásáért (Tabuchi és mtsai., 2002; Balázs, 2009; Stafford és mtsai., 2011).



5. ábra. A Caskin1 a Mint1-el versengve a sejt felszíni molekulákat a CASK fehérjén keresztül kihorgonyozza. (Tabuchi 2002.)

Célkitűzések

Mivel a Caskin1 az idegrendszer működésére kifejtett hatásáról még csak korlátozott ismereteink vannak, TDK munkám során a Caskin1 idegsejtekben betöltött szerepét vizsgáltam, elsősorban a poszt-szinaptikus területekre koncentrálni. Az endogén Caskin1 immuncitokémiai detektálására sajnos nem létezik megfelelő ellenanyag, ezért a V5 tag-gel jelölt¹ Caskin1 fehérjét egér embrionális idegsejttenyészetekben transzfekció segítségével túltermeltettem, majd a transzfektált idegsejtekben anti-V5 immuncitokémia segítségével detektáltam.

- Elemeztem a túltermeltetett Caskin1 fehérje intracelluláris eloszlását, azaz az axonális, illetve a szomatodendrális jelenlétet.
- Konfokális mikroszkópos felvételeken azt is elemeztem, hogy a PSD95 poszt-szinaptikus állványfehérje és a túltermeltetett Caskin1 vajon együtt lokalizálódik-e.
- Arra is kerestem a választ, hogy a Caskin1 túltermeltetése hatással van-e a dendrittüskék morfológiájára.
- Vizsgáltam, hogy a Caskin1-et túltermelő tüskék vajon szinaptikus kapcsolatokat kialakítanak-e.

¹ A V5 epitóp tag a Simian Vírus 5 P és V fehérjéjének C terminális szekvenciája (GKPIPPLLGLDST), amely anti-V5 ellenanyag segítségével jól detektálható – így a V5 tag-gel fúzionált Caskin1 fehérje a túltermeltetést követően az anti-V5 ellenanyaggal már specifikusan kimutatható.

Anyagok és módszerek

Sejtkultúrák

A primer hippocampális idegsejt-tenyészeteket készítéséhez 17-18 napos CD1 egérembriókat használtam. A hippocampusok agyból történő izolálását, illetve a sejtek disszociáltatását a leírt protokollnak (Czöndör és mtsai., 2009) megfelelően végeztem. A poli-D-lizinnel és lamininnal bevont felszínű üveglemezeket tartalmazó 24 lyukú sejtenyésztő lemezekbe lyukanként $1,5-1,7 \times 10^5$ sejtet ültettem ki. A sejteket 5% FCS-t tartalmazó Neurobasal-B27 (Invitrogen) mediumban inkubáltam. A tápfolyadék összetétele: 5% FCS, 0,5 mM Glutamax, 40 $\mu\text{g/ml}$ Gentamicin, 2,5 $\mu\text{g/ml}$ Amphotericin B. A kiültetést követő napon (DIV1) a tápot frissre cseréltem. A gliális osztódás leállítására a sejteket a második-harmadik napon (DIV2-3) 10 μM végkoncentrációjú cytosin-arabinofuranosiddal (CAR) kezeltem. A kiültetést követő negyedik vagy ötödik napon a sejtek felülúszójának egyharmadát friss, FCS-mentes tápra cseréltem. A sejteket 10 napig 37°C-on, 5%-os CO_2 szint mellett, szövettenyésztő inkubátorban növesztettem.

Transzfekció

A hippocampális tenyészeteket a tenyésztés kilencedik napján (DIV 9) 1 μg plazmid DNS : 2 μl Lipofectamine 2000 (Invitrogen) arányban és a gyártó útmutatásai szerint transzfektáltam. A kontroll kísérletekhez az EGFP-vektorból 0,3 $\mu\text{g/lyuk}$ mennyiséget használtam. A Caskin1 fehérje túltermeltetésekor az EGFP-vektorból 0,3 $\mu\text{g/lyuk}$, a Casin-V5 plazmidból pedig 0,5 $\mu\text{g/lyuk}$ mennyiséget használtam. Ezekben a kísérletekben az átíródó EGFP (zöld fluoreszcens fehérje) a citoplazmában egyenletesen eloszlott, így a teljes idegsejtet és a dendrittüskéket is megjelenítette. A túltermeltetett Caskin1 fehérjét anti-V5 immuncitokémia segítségével detektáltam (ld. lent).

A PSD95 fehérje túltermeltetésekor a pEGFP-N1-PSD95 plazmidból 0,7 $\mu\text{g/lyuk}$, a Caskin-V5 konstrukcióból pedig 0,5 $\mu\text{g/lyuk}$ mennyiséget használtam. A teljes dendritfa kirajzoltatásához hármas kotranszfekciót is alkalmaztam – ebben az esetben a pEGFP-N1-PSD95 plazmidot 0,6 $\mu\text{g/lyuk}$, a Caskin-V5 konstrukciót 0,4 $\mu\text{g/lyuk}$, a pmCherry-C1-Vektort pedig 0,3 $\mu\text{g/lyuk}$ mennyiségben alkalmaztam. A túltermeltetett és EGFP-vel kapcsolt PSD95 fehérje előszeretettel gyűlik fel a poszt-szinaptikus denzitás területén, míg a gerjesztést követően piros fényt emittáló mCherry fehérje egyenletesen oszlik el az idegsejt-tenyészetekben. A Caskin-V5 konstrukciót Buday Lászlótól (MTA Enzimológiai Intézet)

kaptuk, a többi konstrukció A. Hausser laboratóriumából (Stuttgarteri Egyetem, Sejtbiológiai és Immunológiai Intézete) származik.

Immuncitokémia

Az üveglemezre letapadt és transzfektált tenyészeteket 24 órával a transzfektálás után 4%-os, PBS-ben oldott paraformaldehiddel 20 percig fixáltam. A permeabilizálást 0,1% TritonX100-PBS oldattal végeztem 5 percig szobahőmérsékleten. A blokkolást 2% BSA-PBS- NaN_3 oldattal minimum egy órán át szobahőmérsékleten végeztem, vagy a fixált sejteket egy-két éjszakán át 4°C-on a blokkolóban hagytam. Az elsődleges ellenanyagokat 2% BSA-PBS- NaN_3 blokkolóban, a megfelelő arányban hígítva, 100 μl /csepp térfogatban alkalmaztam egy éjszakán át, 4°C-on.

A primer hippokampális idegsejttenyészetekben az asztroglia sejtek detektálásakor *anti-GFAP* (gliális fibrilláris savas fehérje; monoklonális egér IgG, Sigma) elsődleges ellenanyagot alkalmaztam 1:2000 arányban hígítva. Az idegsejtek dendritjeit *anti-MAP2* (mikrotubulus asszociált fehérje-2; monoklonális egér IgG, Sigma) immuncitokémiával jelöltem (1:1000). Mindkét elsődleges ellenanyagot A546 fluorokrómmal jelölt anti-egér IgG másodlagos ellenanyaggal tettem láthatóvá.

A Caskin1 fehérje túltermeltetésekor *anti-V5* primer ellenanyagot alkalmaztam 1:000 hígításban (Invitrogen; egér monoklonális IgG). Másnap 3x PBS-mosást követően a fixált sejtekre a kecskében termeltetett, Alexa 546 vagy a hármas kotranszfekció esetén Alexa 633 fluorokrómmal jelölt anti-egér IgG ellenanyag (Invitrogen) került.

A szinaptikus kapcsolatok detektálásához preszinaptikus markerként *anti-vezikuláris glutamát transzportert (VGLUT2)* alkalmaztam. Az anti-VGLUT2 nyúlban termelt poliklonális elsődleges ellenanyagot (Sigma, 1:5000), Alexa546 fluorokrómmal jelzett, anti-nyúl kecskében termelt szekunder ellenanyaggal (Invitrogen) detektáltam.

A másodlagos ellenanyagot 1:500 (Alexa 546), illetve 1:300 (Alexa 633) hígításban, 2% BSA-PBS- NaN_3 blokkolóban oldottam és 100 μl /csepp térfogatban, 1-1,5 órán keresztül szobahőmérsékleten állni hagytam. 3x PBS mosást követően a tenyészeteket Mowiol-Dapi nevű, magfestésre is alkalmas lefedő anyaggal fedtem, majd sötétben és szobahőn megszáritottam. A száradást követően a tenyészeteket 4°C-on, sötétben tartottam.

A másodlagos ellenanyagok specifikus kötődésének ellenőrzésére az immunfestést úgy is elvégeztem, hogy a fixált testvértenyészeteken a primer ellenanyagokat nem alkalmaztam. Az ilyen „kontroll” tenyészetekben fluoreszcens jelet nem detektáltam.

Primer ellenanyag	Detektált fehérje	Ig típusa	gyártó	hígítás
anti-GFAP	gliális fibrilláris savas fehérje	egér monoklonális IgG	Sigma	1:2000
anti-MAP2	mikrotubulus asszociált fehérje-2	egér monoklonális IgG	Sigma	1:1000
anti-V5	Caskin V5-tag	egér monoklonális IgG	Invitrogen	1:1000
anti-VGLUT2	vezikuláris glutamát transzporter	nyúl poliklonális IgG	Sigma	1:5000

1. táblázat. A felhasznált primer ellenanyagok összefoglalása.

Mikroszkópia

Olympus FluoView 500 konfokális lézer scanning mikroszkóppal készítettem a felvételeket az idegsejtekről. 10x száraz és 60x immerzió olajos objektíveket használtam. Az EGFP fluorokrómot 488 nm-es multiargon lézerrel gerjesztettem. A V5-taggel jelölt Caskin1 fehérjét az Alexa 546 fluorokrómmal történő jelölés esetén az 543 nm-es, az Alexa 633 jelölés esetén pedig a 633 nm-es hélium-neon lézerrel gerjesztettem. Az EGFP jel detektálásakor a BA505-525, az Alexa 546 jel esetén a BA560-600, az Alexa 633 jel esetén pedig a BA660IF emissziós szűrőket alkalmaztam. Az egyes csatornák közötti „áthallás” minimalizálásáért a látótereket egységes beállítások mellett és szekvenciális scannelés segítségével, azaz csatornánként külön-külön fotóztam. A kontroll EGFP kezelt mintáknál a következő beállításokat alkalmaztam: PMT: 640 V, gain 3,5x, offset 0%, lézerintenzitás 15%. A Caskin1 túltermeltetett mintáknál pedig PMT: 770 V, gain 5,5x, offset 2%, lézerintenzitás 18% beállításokkal dolgoztam. A zaj csökkentés érdekében 2x Kalman filtert is alkalmaztam.

A szekunder és terciér dendritágakról 2,5x nagyítással, 0,3 mikrométeres vastagságú rétegfelvételeket készítettem. A Z síkok kiválasztásánál törekedtem arra, hogy megtaláljam az alsó és felső határt, amely a dendrittűskék 3D-s kiterjedését lefedi, ezért kb. 6-7 Z síkban készítettem a rétegfelvételeket.

A transzfektált idegsejtek dendrittűskéinek morfológiai elemzése

A több Z síkban készült felvételeket az ImageJ program segítségével, a Standard deviations (STD) algoritmust alkalmazva egy síkra projektáltam. Így a dendrittűskék 3D-s struktúrájáról egy 2D-s vetületi képeket kaptam. A projekció következtében fellépő torzulás mértéke elhanyagolható volt, ráadásul mind a kontroll, mind a Caskin1-et túltermelő sejtek esetében hasonló torzulást okozhatott.

Az elemzések során a dendrittüskék szubjektív besorolása a zömök, a fonalas vagy a gomba kategóriákba a következő bélyegeken alapult: a zömök tüske rövid, szélessége és hosszúsága közel egyenlő; a fonalas tüske hosszú, nyak és fejszélessége nagyjából megegyezik; a gomba alakú tüskék fejszélessége nagyobb, mint a nyakszélessége és hossza nagyobb, mint a tüske nyakának a szélessége. Az egyes tüskék hosszát, fejszélességét, valamint nyakszélességét emellett az ImageJ program segítségével század mikrométeres pontossággal is meghatároztam.

Összesen két független tenyészetben is elemeztem a dendrittüskéket. A kiértékelt dendrittüskék adatait az 1. táblázat foglalja össze.

1. tenyészet	kiértékelt idegsejt (db)	kiértékelt szekunder szakaszok (db)	kiértékelt tercier szakaszok (db)	lemért tüskék (db)
kontroll	6	7	9	290
Caskin1-V5 túltermelő	8	7	12	262
2. tenyészet	kiértékelt idegsejt (db)	kiértékelt szekunder szakaszok (db)	kiértékelt tercier szakaszok (db)	lemért tüskék (db)
kontroll	9	8	9	271
Caskin1-V5 túltermelő	9	6	8	236

2. táblázat. A dendrittüskék morfológiai elemzéséhez kiértékelt idegsejtek, illetve tercier és szekunder dendritszakaszok száma, valamint a morfológiailag jellemzett tüskék mennyisége.

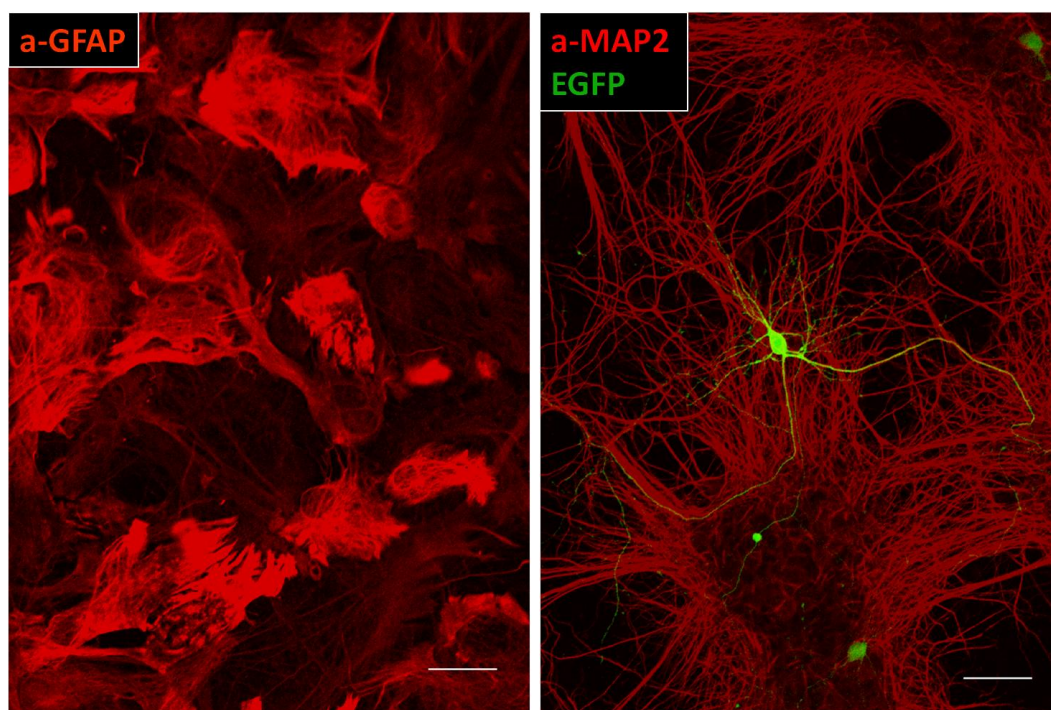
Statisztika

A statisztikai elemzéseket az SPSS statisztikai programmal és Excel segítségével végeztem. A két független tenyészet adatait T-próbával hasonlítottam össze. Az egyes tüskék egyedi paramétereinek összehasonlítását (tüske hossz, fejszélesség, nyakszélesség) az egy utas ANOVA módszerrel végeztem.

Eredmények

Egér embrionális hippocampális idegsejttenyészetek a Caskin 1 idegrendszeri hatásának vizsgálatára

A Caskin1 fehérje túltermeltetésének hatását primer hippocampális idegsejttenyészeteken vizsgáltam. A 17-18. embrionális napon izolált egér embriók agyszövetéből a tenyésztés 2. hetére a tenyésztési aljzatként szolgáló üveglemezekre sűrű asztroglia sejtréteg alakul ki, amit anti-GFAP (gliális fibrilláris savas fehérje) immunfestéssel tettem láthatóvá (6. ábra). Az aljzatsejtek konfluens szőnyege fölött találhatóak az idegsejtek, amelyek nyúlványaikon keresztül dús idegsejt-hálózatot alakítanak ki. Az akár több ezer idegsejtből álló idegsejt-csoportosulásokat a neuronok dendritjeiben lokalizálódó MAP2 (mikrotubulus asszociált fehérje-2) immuncitokémiával jelöltem (6. ábra). Az ilyen sűrű nyúlványhálózatokban az egyedi sejtek, vagy akár a dendritágak morfológiai azonosítása szinte kivitelezhetetlen feladat lenne. Mivel a liposzómás transzfekció idegsejttenyészetekben csak igen kis hatékonysággal működik ($<0,1\%$ transzfekciós gyakoriság), a transzfektált tenyészetekben a zöld fluoreszcens fehérjével transzfektált egyedi idegsejtek azonban már jól azonosíthatóak, nyúlványrendszerük egyértelműen elkülöníthető (6. ábra).



6. ábra. Primer hippocampális idegsejttenyészetéről készített konfokális mikroszkópos felvételek. A bal oldali képen asztroglia sejtek láthatóak. A jobb oldali képen a dús idegsejthálózat felett az egyedi transzfektált neuronok jól elkülönülnek. A mérce 50 μm .

A Caskin1 elsősorban szomatodendritikusan lokalizálódik

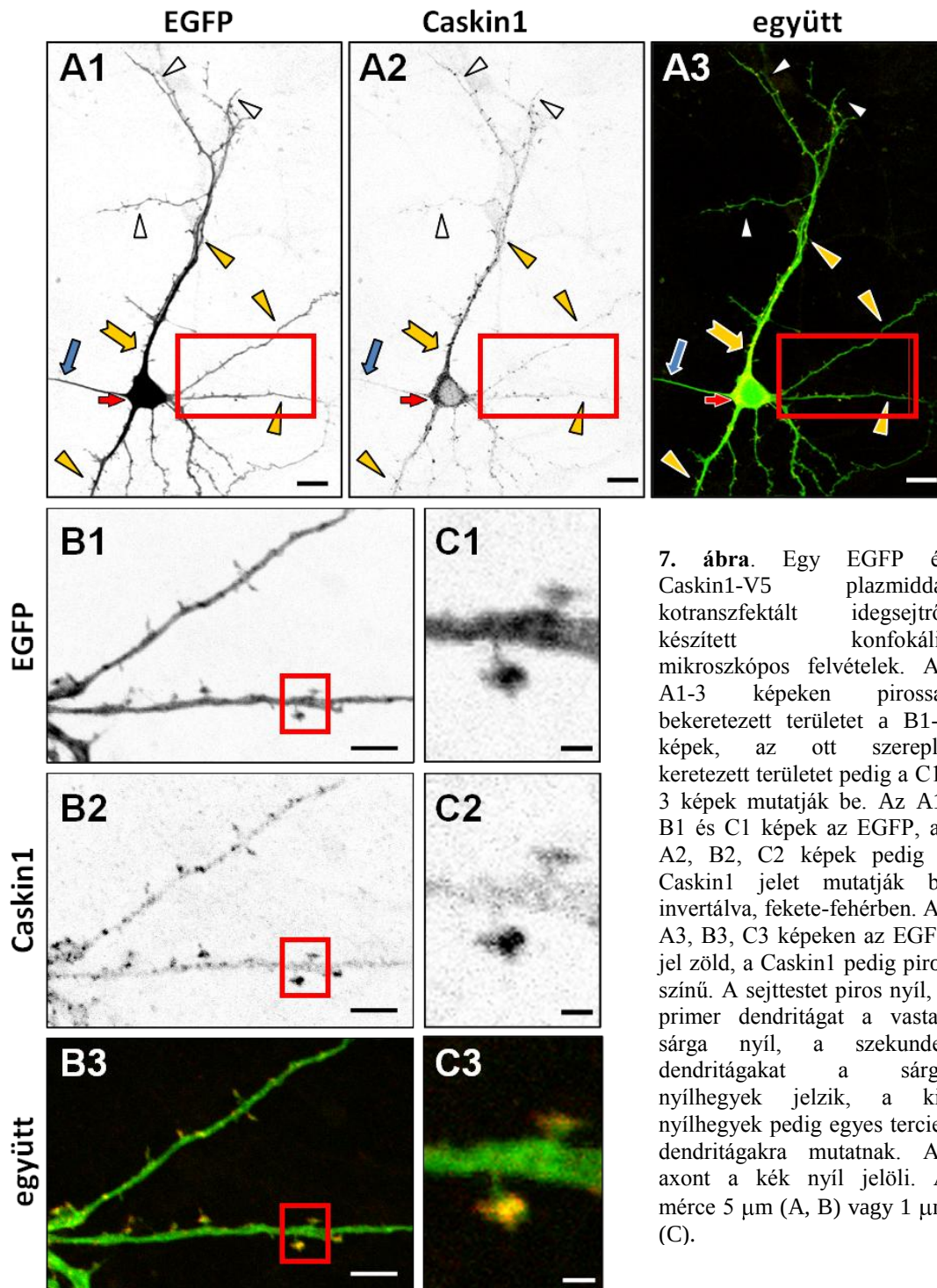
Mivel az endogén Caskin1 sejten belüli lokalizációjának megfigyelésére megfelelő ellenanyag nem áll rendelkezésre, ezért a Caskin1 fehérjét a hippocampális idegsejttenyészetekben transzfekcióval túltermeltettem. A Buday Lászlótól (MTA Enzimológiai Intézet) kapott expressziós plazmidban a Caskin1-et V5 jelöléssel látták el, így a túltermeltetett fehérjét anti-V5 immunfestés segítségével tudtam detektálni. Fluoreszcens jelölést alkalmazva, konfokális mikroszkóppal vizsgáltam, hogy a Caskin1 a transzfektált idegsejteken belül hol lokalizálódik.

A konfokális mikroszkópos felvételek készítésénél ügyeltem arra, hogy a transzfektált idegsejtek közül csak piramis-sejteket válasszak ki – a tenyészetekben ugyanis ezek mellett interneuronok is előfordulnak, amelyek morfológiája és dendrittüske-sűrűsége, -alakja nagyon különböző lehet. A kiválasztási kritériumok a következők voltak: 1) a piramis alakú sejttestből a dendritek aszimmetrikusan ágaznak el, 2) jól elkülönül a primer dendritág, 3) hosszú és kiterjedt a dendritfa és 4) sem az axon, sem a dendritfa nem degradálódott. Az egyes nyúlvány-típusokat némi gyakorlattal már könnyen el tudtam különíteni: a sejttesten és a proximalis primer dendriteken nem jellemző a dendrittüskék jelenléte, míg a distalis dendritágakon sűrűn elhelyezkedő dendrittüskék találhatók. A dendritágak emellett viszonylag rövidek (a dendritfa a szómától mért maximális kiterjedése a 300 μm -t nem haladja meg), eredési helyüktől kiindulva átmérőjük csökken és villásan ágaznak el. Az axon általában a sejttestből vagy a primer dendrit kiindulási pontjához közel ered, igen hosszú (akár 500 μm -nél is hosszabb), közel egyenes vastagságú és rajta dendrittüskék nem figyelhetők meg (7. A ábra).

A konfokális mikroszkópos felvételek alapján a túltermeltetett Caskin1 elsősorban szomatodendritikusan lokalizálódik, az axonban detektálható jel jóval halványabb volt (7. A ábra). A Caskin1 a sejttest citoplazmájában nagy mennyiségben jelen volt, a sejtmagban nem expresszáldott (7. A ábra, piros nyíl). A Caskin1 jel a dendritfát szépen kirajzolta, a vékonyabb dendriteken elhelyezkedő tüskékben pontszerűen felhalmozódott (7. B, C ábra). A szekunder és terciér dendritágakban egyaránt megfigyelhetők voltak Caskin1 depozitok (7. B ábra).

Az erős Caskin1 felhalmozódások arányát az egyes tüsketípusokban kvantitatív módon is elemeztem. Az EGFP és Caskin1-V5 plazmidokkal kotranszfektált idegsejtekben a szekunder és terciér dendritágokról konfokális mikroszkóppal 0,3 μm vastagságú rétegfelvételeket készítettem, majd az egyes dendritszakaszokon található és az EGFP

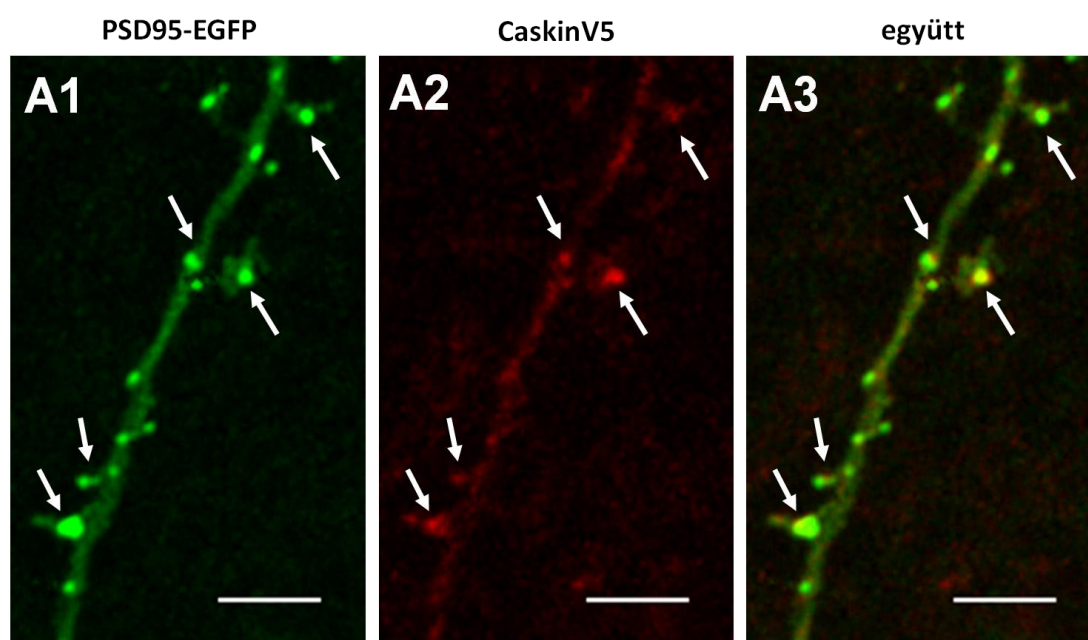
fluoreszcencia alapján szépen kirajzolódó dendrittüskéket a három morfológiai kategória valamelyikébe (zömök, fonalas, gomba) besoroltam. A morfológiai besorolást követően azt is rögzítettem, hogy az adott tüskék fejében a Caskin1 felhalmozódik-e. Összesen 273 dendrittüske vizsgálatával azt tapasztaltam, hogy a fonalas tüskék fejében is előfordulnak Caskin1 depozitok (22%), de a Caskin1 elsősorban a stabilabb, gomba alakú (43%) és zömök (35%) tüskék fejében halmozódik fel.



A PSD95 állványfehérje és a Caskin1 együtt lokalizálódik

A serkentő szinapszisok kialakulását jól jelzi a posztszinapszisban a PSD megjelenése. Ennek jelenlétét elektronmikroszkópos vizsgálatokkal lehetne egyértelműen bizonyítani, de ennek hiányában fénymikroszkópos vizsgálatokat tudtam csak végezni. Mivel nem áll rendelkezésünkre olyan ellenanyag, amely az egér endogén PSD95 fehérjét specifikusan tudná detektálni, ezért vizsgálataimhoz az EGFP-vel jelzett PSD95 fehérje transzfekciót követő túltermeltetését választottam. A teljes dendritfa, illetve a dendrittüskék alakjának kirajzolásához az idegsejtekbe üres mCherry vektort is kotranszfektáltam, amely a pirosan fluoreszkáló mCherry fehérje egyenletes, citoplazmás eloszlásával járt. A V5-Caskin1 plazmidról átíródó Caskin1 fehérjét pedig Alexa633 fluorokrómmal előhívott anti-V5 immuncitokémia segítségével detektáltam.

A hármasan kotranszfektált idegsejtekben vizsgáltam, hogy a serkentő szinapszisokra jellemző PSD95 állványfehérje és a Caskin1 együtt lokalizálódik-e. A zöld fluoreszcens fehérjével jelzett PSD95 a dendritágban és a dendrittüskék fejében is jelen volt, míg a Caskin1 jel alapvetően a dendrittüskék fejében halmozódott fel. A mikroszkópos felvételek alapján (8. ábra) egyértelmű volt, hogy számos tüske fejében a PSD95 és a Caskin1 együtt lokalizálódik.

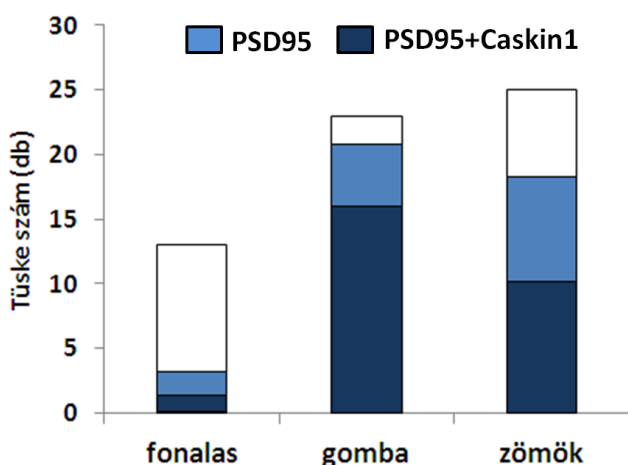


8. ábra. Hármasan kotranszfektált idegsejt tercier dendritszakaszáról készült a konfokális mikroszkópos felvétel. Az A1 képen a zöld fluoreszcens fehérjével jelzett PSD95 felhalmozódásokra mutatnak a fehér nyilak. Az A2 ábrán a Caskin1 depozitok láthatóak, a jobb láthatóság kedvéért a Caskin1-t piros színnel jelenítettem meg. Az A3 képen együtt látható a két csatorna. A mérce 5 μ m.

Ezt a megfigyelést kvantitatív elemzéssel, összesen 61, a tercier dendritágakon található dendrittüske vizsgálatával is alátámasztottam. A dendrittüskéket a zömök, a fonalas vagy a gomba kategóriába besoroltam, majd meghatároztam, hogy az adott tüskében a PSD95, illetve

a Caskin1 jel detektálható-e. Az elemzett dendrit tüskék közül a PSD95 a gomba alakú tüskék 91%-ában, a zömök tüskék 72%-ában volt jelen, míg a fonalas dendrittüskék esetében csak 23%-ban. A Caskin1 felhalmozódás is főként a gomba alakú (70%) és zömök (40%) tüskékre volt jellemző, a fonalas tüskék fejében csak elvétve (8%) fordult elő (9. ábra).

Adataim tehát azt mutatják, hogy mind a két állványfehérje a stabilabb, gomba alakú és zömök tüskék fejében halmozódik fel, a mozgékonyabb fonalas tüskékre viszont ez nem jellemző. Fontos azt is kiemelni, hogy a mikroszkópos felvételek elemzésénél egyetlen esetben sem találtam úgy Caskin1 felhalmozódást, hogy a PSD95 fehérje ne lett volna nagyobb mennyiségben jelen, vagyis a Caskin1 felhalmozódása a PSD95 fehérje felhalmozódással egybeesett.



9. ábra. A PSD95 és a Caskin1 felhalmozódások aránya az egyes tüske-típusokban. Világos kék szín a csak PSD95 felhalmozódást, sötétkék szín pedig a PSD95 és Caskin1 felhalmozódást is tartalmazó tüskéket jelöli. A fehér terület a PSD95 vagy Caskin1 nélküli dendrittüskék arányát jelöli. Csak Caskin1-et tartalmazó tüskéket nem detektáltam.

A Caskin1 fehérje túlermelletése a gomba alakú tüskék arányát megnövelte

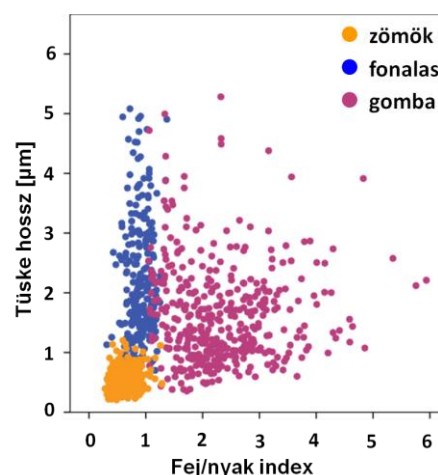
A mikroszkópos felvételek kvantitatív elemzésével azt is vizsgáltam, hogy a Caskin1 fehérje túlermelletése milyen hatással van a dendrittüskék morfológiájára. Az Anyag és módszer fejezetben is ismertetett morfológiai kritériumok alapján két független tenyészetből összesen 15 kontroll és 17, a Caskin1-et túlermelő piramissejtről készítettem felvételt, ezekből pedig összesen 1063 tüske paramétereit határoztam meg (ld. 1. táblázat).

A dendrittüskék szubjektív besorolásának helyességét a részletes, az egyes tüskék hosszának, fejszélességének, valamint nyakszélességének meghatározásán alapuló kvantitatív elemzéssel is igazoltam. Az ún. fej/nyak index, illetve a tüskehossz segítségével bizonyítottam, hogy a szubjektíven elkülönített kategóriák a lemerített paramétereik alapján numerikusan is elkülönülnek (10. ábra). A fej/nyak arány zömök és fonalas tüskék esetében ugyanis kisebb 1-nél vagy közel 1, a gomba alakú tüske esetében pedig nagyobb, mint 1. A zömök és a fonalas tüskék között pedig a hossz alapján tudtam különbséget tenni: a fonalas

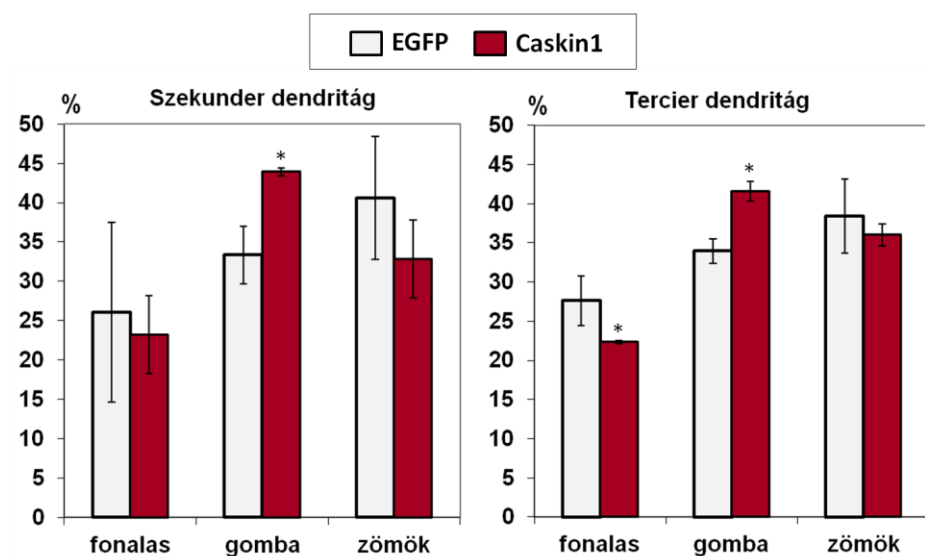
tüskék hosszúsága a 0,8 μm -t általában meghaladta, míg a zömök tüskék ennél rövidebbek voltak.

A kontroll és a Caskin1-et túltermelő dendrittüskék morfológiai paramétereit az SPSS program segítségével hasonlítottam össze egy utas ANOVA analízissel. A két független tényezőben mind a szekunder, mind a terciér dendritszakaszokon elhelyezkedő dendrittüskék esetében is azt tapasztaltam, hogy a Caskin1 túltermeltetés hatására a gomba típusú tüskék aránya szignifikánsan

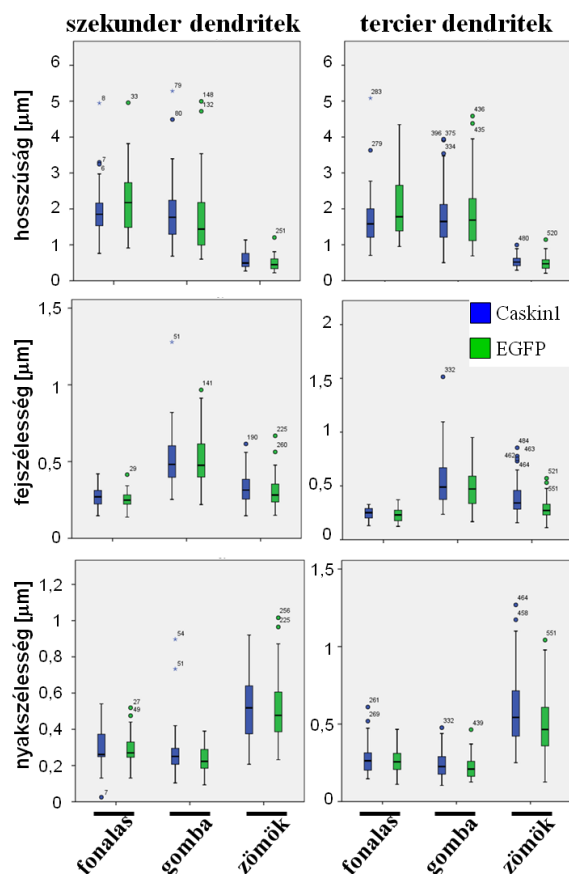
megnőtt, míg a terciér dendritszakaszokon a fonalas tüskék aránya szignifikánsan lecsökkent (11. ábra). A tüskék egyedi paramétereiben, vagyis a hosszban, a fej- vagy a nyakszélességben szignifikáns változást nem figyeltem meg (12. ábra).



10. ábra. A szubjektíven besorolt tüske-típusok a fej/nyak index, illetve a hossz alapján egyértelműen elkülönülnek.



11. ábra. A kontroll, EGFP-vel, illetve a Caskin1-V5 konstrukcióval transzfektált idegsejtek szekunder és terciér dendritszakaszain megfigyelhető tüske-típusok gyakorisága. Az adatok két kísérletsorozatból, 1063 tüske elemzéséből származnak.



12. ábra. A kontroll, EGFP-vel, illetve a Caskin1 konstrukcióval transzfektált idegsejtek szekunder és terciér dendritszakaszain megfigyelhető tüske-típusok morfológiai jellemzői között nincs szignifikáns különbség. A box plotokban a vízszintes vonal a mediánt, a box plotok az alsó és felső kvartilist, a bajuszok pedig a minimum és a maximum értéket jelzik. Az egyedi pontok a kiugró (outlayer) értékeket jelzik. A kék szín a Caskin1-t túltermelő, míg a zöld szín a kontroll, EGFP-vel transzfektált idegsejtek adatait jeleníti meg.

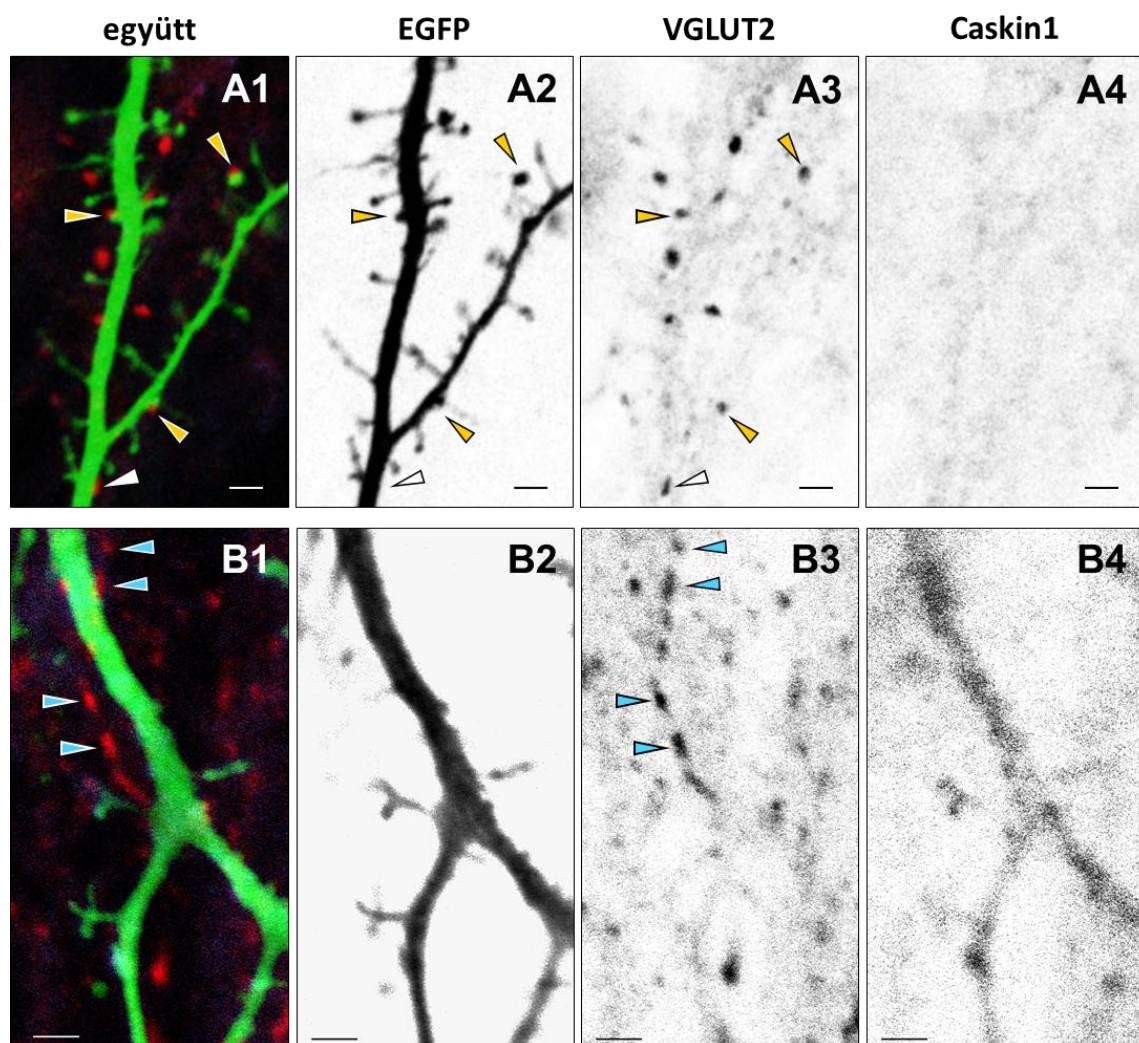
A Caskin1-et túltermelő tüskék vajon kialakítanak-e szinaptikus kapcsolatokat?

A Caskin1 túltermeltetése a transzfekciót követő 24 órán belül a fonalas tüskék rovására megnövelte a szélesebb fejjel rendelkező, gomba alakú tüskék arányát. Mivel a gomba alakú tüskék általában az érett, stabil szinapszisokra jellemzőek, feltételezhető, hogy a túltermeltetett Caskin1 fehérje egy szinapszist stabilizáló, esetleg a szinapszis érését elősegítő hatást váltott ki. Ezért azt is vizsgáltam, hogy a Caskin1-et túltermelő tüskék vajon szinaptikus kapcsolatokat kialakítanak-e.

A szinapszisok meglétét természetesen csak elektronmikroszkópos elemzésekkel lehetne egyértelműen bizonyítani, hiszen a fénymikroszkópos vizsgálatok nem biztosítják az ultrastruktúrák elkülönítéséhez szükséges felbontást. A szinaptikus kapcsolatok általánosan elfogadott predikciójára azonban létezik egy fénymikroszkópos módszer is: ha a posztzinaptikus marker közvetlen közelében egy preszinaptikus markert is lokalizálni lehet (azaz a fluoreszcens jelek közeli appozícióját lehet megfigyelni), a szinaptikus kapcsolat már feltételezhető.

Ezekhez a vizsgálatokhoz zöld fluoreszcens fehérjével és CaskinV5 plazmiddal kotranszfektált idegsejtek mikroszkópos felvételein elemeztem, hogy a Caskin1 fehérjét

túlexpresszázó tüske közvetlen közelében megfigyelhető-e preszinaptikus marker. A túltermeltetett Caskin1 fehérjét a szokásos módon, anti-V5 immunfestéssel és Alexa633 fluorokrómmal tettem láthatóvá. Preszinaptikus markerként a rendelkezésünkre álló, a preszinaptikus terminálisokat egyöntetűen jelölő szinapszin1 vagy a szinaptofizin fehérje elleni ellenanyagot sajnos nem tudtam használni, mivel ezek ugyanúgy egérben voltak termeltetve, mint az anti-V5 ellenanyag, ami aspecifikus festődést is okozhatott volna. A kettős immunfestés során ezért a nyúlban termeltetett, anti-vezikuláris glutamát transzporter (VGLUT2) ellenanyagot alkalmaztam, ami a glutamaterg axon terminálisokban specifikusan felhalmozódó fehérje. Az anti-VGLUT2 jelet Alexa546 fluorokrómmal jelzett szekunder ellenanyaggal detektáltam.



13. ábra. Konfokális mikroszkópos felvétel EGFP és Caskin1-V5 plazmidaal kotranszfectált és VGLUT2 ellenanyaggal festett idegsejtek dendritágairól. A színes képeken az EGFP jel zöld, a VGLUT2 jel piros, a Caskin1-V5 jel pedig kék színnel van feltüntetve. Az egyedi csatornák invertálva, fekete-fehér színben vannak bemutatva. A mércé 2 μ m.

A1-A4: egy Caskin1 fehérjét csak gyengén expresszázó idegsejt dendritágáról készített felvétel. A sárga nyílhegyek a transzfectált idegsejt dendrittűskéin végződő glutamaterg terminálisokat jelölik. A fehér nyílhegy pedig egy dendritágon végződő VGLUT2 markert jelöl.

B1-B4: egy erős Caskin1 pozitivitást mutató idegsejt tercier dendritágáról készített felvétel. A kék nyílhegyek gyöngysorszerűen elhelyezkedő, glutamaterg terminálisokra mutatnak. A Caskin1-pozitív dendrittűskék közvetlen közelében a VGLUT2 markert nem tudtam detektálni.

A tenyészetekben a VGLUT2 immunfestés a glutamáterg terminálisokat pontszerűen jelölte (13. ábra). Többször láttam gyöngysor-szerűen elhelyezkedő VGLUT2 jeleket, amelyek valószínűleg egy glutamáterg axon varikozitásainak felelnek meg (13. B ábra, kék nyilak). Eddigi vizsgálataim során 4, erős Caskin1 pozitivitást mutató idegsejt dendritfáját elemezve sem találtam olyan Caskin1-pozitív dendrittüskét, ami közvetlen közelében egyértelműen lokalizálódott volna a glutamáterg terminálisokat jelölő, preszinaptikus VGLUT2 marker (13. B ábra). Egy olyan esetben azonban, ahol a vizsgált transzfektált idegsejtben csak nagyon gyengén expresszáldott a Caskin1 fehérje, több gomba alakú és zömök tüske feje mellett is egyértelműen detektálható volt a preszinaptikus marker (13. A ábra, sárga nyilak). Természetesen annak a kérdésnek a megválaszolásához, hogy a Caskin1 befolyásolja-e a szinapszisok kialakulását, további idegsejtek elemzésére is szükség lesz. A fénymikroszkópos elemzések mellett az elektronmikroszkópos felvételek készítése és kiértékelése is folyamatban van.

Diszkusszió

A Caskin1 fehérje neuronális funkciójáról közvetlen kísérletes adatok még nem állnak rendelkezésre. Az eddigi publikációkban a feltételezett pre- és/vagy posztszinaptikus funkcióit csak következtetések szintjén tárgyalták (ld. bevezetés; Tabuchi és mtsai., 2002; Balázs, 2009; Stafford és mtsai., 2011).

A Caskin1 poliklonális ellenanyag immunfestésre nem, csak Western blot detekcióra használható megbízhatóan (Buday L. és Schlett K. megfigyelései). A Caskin1 idegsejtekben betöltött funkciójának megértéséhez mindenképpen nagy segítséget nyújtana, ha az endogén fehérje lokalizációját is tudnánk vizsgálni. Sajnos, az immuncitokémiai detekcióra alkalmas ellenanyag nem áll rendelkezésünkre, így csak a transzfekcióval bejuttatott és túltermeltetett Caskin1 hatását és lokalizációját tudtam vizsgálni.

Mivel az endogén Caskin1 fehérjét megbízhatóan kimutató és immuncitokémiára is használható ellenanyag nem áll rendelkezésre, a V5 tag-gel ellátott Caskin1 fehérjét termeltettem túl az idegsejtekkel². A transzfektált idegsejtekben a Caskin1 elsősorban a szomatodendritikus területeken, főleg a dendritekben és a dendrittüskékben halmozódott fel. Az immuncitokémiai detekció megbízhatóságát az is jelzi, hogy a túltermeltetett Caskin1 fehérjét a sejtmagban – ahol az endogén Caskin1 állvány fehérje nem fordul elő - soha nem detektáltam. Gyenge Caskin1 jelet, illetve pötty-szerű lokalizációt az axonokban is megfigyelhettem. Ennek alapján nem zárható ki, hogy a tenyészetekben a Caskin1 túltermeltetése az axonokra is hatással volt, de jelen munkám során a dendrittüskék elemzésével a Caskin1 posztszinaptikus hatásaira koncentráltam.

Hogyan hat a Caskin1 túltermeltetése a dendrittüskék morfológiájára?

Az eddig elvégzett elemzéseim alapján a Caskin1 túltermeltetése a dendrittüskék morfológiájára is hatással volt, hiszen a széles fejjel rendelkező, gomba alakú tüskék aránya megnőtt, míg a mozgékony, fonalas tüskék aránya csökkent. A gomba alakú tüskék az érett, stabil szinapszisokra jellemzőek, szinaptikus hatékonyságuk a zömök, illetve a fonalas tüskékhez képest nagyobb (Harris, 1999; Nimchinsky és mtsai., 2002; Arellano és mtsai., 2007; Sheng és Kim, 2011; Harris és Weinberg, 2012). A szinapszis stabilizálódásakor a dendrittüske jellegzetes strukturális változáson megy keresztül. A tüskefej kiszélesedik, megjelenik az érett, stabil tüskékre jellemző posztszinaptikus denzitás. A posztszinaptikus membránban a glutamáterg receptorok száma megnő. A nagyobb fej mind a szinaptikus

² Balázs Annamária doktori dolgozatában bizonyítja, hogy a V5 tag a Caskin1 fehérje funkcionális sajátosságait nem befolyásolja, de a fúziós fehérjét immuncitokémiai módszerekkel detektálhatóvá teszi.

felszín növelésén, mind a receptorok mennyiségének és stabilitásának növelésén keresztül fokozza a szinaptikus jelátvitel hatékonyságát. A túskefej kiszélesedése az aktin vázrendszer újraszerveződéséhez is köthető (Yoshihara és mtsai., 2009; Hotulainen és Hoogenraad, 2010).

Az F-aktin szálak G-aktin monomerekből épülnek fel, melyeken a túskefej kiszélesedésekor elágazások keletkezhetnek. Az Arp2/3 komplex már meglévő aktinszálakhoz kapcsol elágazásokat, ezáltal az aktinváz kiszélesedik (Lin és Webb, 2009). Az Arp2/3 komplexet aktiválja a WASP (Wiskott Aldrich syndrome protein) fehérje család tagja, a WAVE1-3 (WASP family verprolin-homologous protein). A WAVE fehérjék nagymértékben expresszálódnak az agyban és feltehetően a túske alakbéli változásokat is modulálják (Suetsugu és mtsai., 1999). Az Abi2 fehérje szerepét leírták egy, az aktin-citoszkeletont szabályozó komplexben is, melynek WAVE gátló hatása is van (Eden és mtsai., 2002). A Caskin1 és az Abi2 közötti kapcsolat in vitro és in vivo is kimutatható (Balázs és mtsai., 2009), az Abi2 ugyanis SH3 doménjén keresztül kötődik a Caskin1 prolinban-gazdag régiójához.

Érdekes kérdés, hogy a Caskin1 túltermeltetés hatására megnövekedő gomba alakú túske-gyakoriság hátterében mi állhat. Feltételezésem szerint a Caskin1 az Abi2 fehérjét gátolja, ezáltal a WAVE komplex a gátlás alól felszabadul. Mindez az Arp2/3 komplexet aktiválhatja, így a meglévő aktin szálakra elágazások kapcsolódhatnak, kiszélesedhet a túskefej, ezáltal a szinapszis stabilizálódhat. A Caskin1 a dendrittűskék morfológiabeli változásában azáltal játszhat szerepet, hogy a sejtfelszíni receptorok és az aktin citoszkeleton között közvetíthet.

Mi befolyásolhatja a Caskin1 felhalmozódását a dendrittűskékben?

Ismert, hogy a posztszinaptikus állványfehérjék mennyiségének megváltoztatása a dendrittűskék morfológiai változásával is együtt jár (Sheng és Kim, 2011; Harris és Weinberg, 2012). Éppen ezért nem zárható ki, hogy a PSD95 fehérje túltermeltetése önmagában is hatással volt a transzfektált idegsejtek dendrittűskéire. Az mindenesetre fontos megfigyelésem volt, hogy a PSD95 és a Caskin1 fehérjét egyaránt túltermelő idegsejtekben a túltermeltetett Caskin1 fehérje mindig a PSD95 posztszinaptikus állványfehérjével együtt lokalizálódott. A Caskin1 jel felhalmozódás a gomba és a zömök tűskék mintegy 40%-ában eleve jellemző volt, de a PSD95 fehérje kotranszfekcióját követően ez az arány a gomba alakú tűskék esetében igen jelentősen megnőtt: a megvizsgált gomba alakú tűskék mintegy 80%-ában jelen volt a Caskin1 jel. A PSD95 állványfehérje így feltételezhetően segíti a Caskin1 állványfehérje felhalmozódását. Mivel mind a két állványfehérje számos fehérje-fehérje

interakciós doménnel rendelkezik, ezeken keresztül közvetve, de akár közvetlenül is befolyásolhatják egymás lokalizációját (Sheng és Kim, 2011). A PSD95 állványfehérje pl. PDZ doménjén keresztül kapcsolódhat a Shank posztszinaptikus állványfehérjéhez, mely a posztszinaptikus denzitás állványzatának kialakításában jelentős szerepet tölt be (lásd 3. ábra). A Caskin1 fehérje pedig akár SAM doménjén keresztül vagy a prolin-gazdag, rendezetlen szekvenciájával is kapcsolódhat a Shank fehérjéhez (Balázs és mtsai., 2009). Erre vonatkozó kísérleti adatok még nem állnak rendelkezésünkre, ezen hipotézis alátámasztására még további kísérletek szükségesek.

Milyen hatást fejthet ki a Caskin1 a szinapszisokban?

Arra irányuló vizsgálataim, hogy a Caskin1-et túltermelő tüskék vajon szinaptikus kapcsolatokat kialakítanak-e, még folyamatban vannak. Ennek eldöntésére az elektronmikroszkópos felvételek készítése és elemzése lenne a legmegfelelőbb – ilyen irányú vizsgálatainkat már megkezdtek.

Az eddigi fénymikroszkópos felvételek elemzésekor mindenesetre nem találtam olyan Caskin1-et túltermelő dendrittüskét, amely közvetlen közelében a glutamaterg terminálisokra specifikus VGLUT2 marker egyértelműen lokalizálódott volna. Ez természetesen nem jelenti azt, hogy a Caskin1 túltermeltetésének hatására megnövekedett felszínű dendrittüskéken nem végződhetnének preszinaptikus terminálisok – egyelőre csak kevés adat áll ugyanis rendelkezésemre. Mindenesetre érdekes eredmény lenne, ha a Caskin1 túltermeltetése esetleg csökkentené az ilyen dendrittüskékre adott glutamaterg bemenetek számát, hiszen a morfológiai adatok alapján ennek pont ellenkezője lenne várható.

A Buday László kutatócsoportja által előállított Caskin1 génkült egerek viselkedésében, életképességében és agymorfológiájában jelentős változást nem figyeltek meg (Buday L. még nem publikált eredményei). Ezek alapján biztos, hogy a szinaptikus funkció kialakulásához a Caskin1 fehérje meglete nem elengedhetetlen, de nem zárható ki az sem, hogy a Caskin1 a szinaptikus funkciókra, a szinapszis ki- és átalakulására és fenntartására hatással lehet. Éppen ezért figyelemre méltó eredmény, hogy a Caskin1 túltermeltetése a transzfekciót követő 24 órán belül már jelentős morfológiai változást okozott, mivel a fonalas tüskék rovására megnövelte a szélesebb fejjel rendelkező, gomba alakú tüskék arányát. Ennek alapján elképzelhető, hogy a Caskin1 fehérje hatással lehet a szinaptikus plaszticitásra, valamint a tanulási folyamatokra is. Érdekes lenne ennek alátámasztására a Caskin1-génhiányos egereken elektrofiziológiai méréseket, valamint viselkedési és memória teszteket is végezni.

Szerzői hozzájárulás

- A 2012. februárjában megkezdett TDK munkám során a primer hippokampális idegsejtenyészetek készítésének metodikáját és a transzfektálás technikáját elsajátítottam.
- A dolgozatban ismertetett immuncitokémiai festéseket, valamint a konfokális mikroszkópos felvételeket én készítettem, az ábrákat én állítottam össze.
- A mikroszkópos felvételek kiértékelését, a tüske-paraméterek meghatározását és ezek statisztikai elemzését én végeztem.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Schlett Katalinnak, aki nem csak bevezetett a laboratóriumi kísérletezés világába, de végtelen türelemmel nyújtott segítséget a kísérletek megtervezésében és kivitelezésében, illetve látott el hasznos tanácsaival a dolgozat megírásakor. Ezen kívül köszönetemet szeretném kifejezni Tárnok Krisztiánnak is, akihez bármilyen felmerülő problémával fordulhattam, és segített a statisztikai kiértékelésben, illetve a dolgozat ábraanyagának elkészítésében. Végül, de nem utolsó sorban köszönettel tartozom Buday Lászlónak és kutatócsoportjának, aki biztosította számunkra a Caskin1 fehérjét és az anti-V5 ellenanyagot, és hozzájárulását adta ezen dolgozat megírásához.

Irodalomjegyzék

- Arellano J. I., Benavides-Piccione R., Defelipe J., Yuste R. (2007). Ultrastructure of dendritic spines: correlation between synaptic and spine morphologies. *Front Neurosci.* 1:10.
- Balázs Annamária (2009). A Caskin1 állványfehérje vizsgálata. Semmelweis Egyetem, Doktori értekezés
- Balázs A, Csizmok V, Buday L, Rakács M, Kiss R, Bokor M, Udupa R, Tompa K, Tompa P. (2009). High levels of structural disorder in scaffold proteins as exemplified by a novel neuronal protein, CASK-interactiv protein1. *The FEBS Journal*, 276(14):3744-3756.
- Boeckers T.M, (2006). The Postsynaptic Organization of Synapses. *Cell Tissue Research*, 326(2):409-22.
- Chao HW, Hong CJ, Huang TN, Lin YL, Hsueh YP (2008) SUMOylation of the MAGUK protein CASK regulates dendritic spinogenesis. *J. Cell Biol* 182: 141–155.
- Czöndör K, Ellwanger K, Fuchs YF, Lutz S, Gulyás M, Mansuy IM, Hausser A, Pfizenmaier K, Schlett K. (2009) Protein kinase D controls the integrity of Golgi apparatus and the maintenance of dendritic arborization in hippocampal neurons. *Mol Biol Cell.* 20 (7):2108-20.
- Eden S, Rohatgi R, Podtelejnikov AV, Mann M, Kirschner MW. (2002). Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature.* 418(6899):790-3.
- Frost N. A, Kerr J. M, Lu H. E, Blanpied T. A. (2010). A network of networks: cytoskeletal control of compartmentalized function within dendritic spines. *Current opinion in neurobiology.* 10/2010; 20(5):578-87.
- Harris, K.M. (1999). Structure, development, and plasticity of dendritic spines. *Current Opinion in Neurobiology*, 9(3):343-8.
- Harris, K. M., & Weinberg, R. J. (2012). Ultrastructure of synapses in the mammalian brain. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1;4(5). pii: a005587. 4(5).
- Hata Y, Butz S, T. C. Sudhof (1996). CASK: a novel dlg/PSD95 homolog with an N-terminal calmodulin-dependent protein kinase domain identified by interaction with neuroligins. *J. Neurosci.* 15;16(8):2488-94.
- Heiman, M., & Shaham, S. (2010). Twigs into branches: how a filopodium becomes a dendrite. *Current opinion in neurobiology*, 20(1), 86–91.
- Hoogenraad, C. C., & Akhmanova, A. (2010). Dendritic spine plasticity: new regulatory roles of dynamic microtubules. *The Neuroscientist* 6 650-661
- Hotulainen, P., & Hoogenraad, C. C. (2010). Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *The Journal of cell biology*, 189(4), 619–29.
- Newpher T. M, Ehlers M. D. (2009). Spine microdomains for postsynaptic signaling and plasticity. *Trends in cell biology*, Pages 218–227

- Nimchinsky E.A, Sabatini B.L., K. Svoboda (2002). Structure and function of dendritic spines. *Annual Review of Physiology* Vol. 64: 313-353
- Penzes P, Cahill ME, Jones KA, VanLeeuwen JE, Woolfrey KM (2011) Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nature Neuroscience* 14(3): 285–293.
- RÁCZ B, Weinberg RJ. (2012) Microdomains in Forebrain Spines: an Ultrastructural Perspective. *Molecular Neurobiology*, pp 77-89
- Sheng, M & Kim, E. (2011). The postsynaptic organization of synapses. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1;4(5). pii: a005587.
- Suetsugu S, Miki H, Takenawa T. (1999). Identification of two human WAVE/SCAR homologues as general actin regulatory molecules which associate with the Arp2/3 complex. *Biochem Biophys Res Commun.* 24;260(1):296-302.
- Stafford R.L, Ear J, Knight M. J, Bowie J.U. (2011). The Molecular Basis of the Caskin1 and Mint1 Interaction with CASK. *Journal of Molecular Biology*, p 3–13.
- Tabuchi K, Biederer T, Butz S. and T. C. Sudhof (2002). CASK participates in alternative tripartite complexes in which Mint 1 competes for binding with caskin 1, a novel CASK-binding protein. *J. Neurosci*, 22(11): 4264-73.
- Tada T, Sheng M. (2006). Molecular mechanisms of dendritic spine morphogenesis. *Current Opinion in Neurobiology*, Pages 95–101.
- Yoshihara, Y., De Roo, M., & Muller, D. (2009). Dendritic spine formation and stabilization. *Current opinion in neurobiology*, 19(2):146-53.