

A protein kináz D szerepének vizsgálata az idegsejtek pusztulását előidéző hatások alatt

Doktori értekezés tézisei

Készítette: Liliom Hanna Laura

Témavezető: Dr. Schlett Katalin, Ph.D., egyetemi docens

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar

Biológia Doktori Iskola

Az iskola vezetője: Dr. Erdei Anna, D.Sc., egyetemi tanár

Idegtudomány és Humánbiológia Doktori Program

A program vezetője: Dr. Détári László, D.Sc., egyetemi tanár

Idegi Sejtbiológiai Kutatócsoport

Eötvös Loránd Tudományegyetem

Élettani és Neurobiológiai Tanszék



2018

Bevezetés

Az akut agyi érkatasztrófa (angol elnevezéssel *stroke*) a második leggyakoribb halálok világszerte. Az iszkémiás típusú *stroke* esetében megkülönböztethető a csökkent vérátáramlás által súlyosan érintett „mag”, valamint a *penumbra* terület, ahol az előbbihez képest késleltetett sejtpusztulás jelentkezik. A késleltetett idegsejt-pusztulást okozó legfontosabb molekuláris szintű események közé tartoznak az excitotoxicitás és az oxidatív stressz. Az excitotoxicitás során a glutamát receptorok túlzott ingerléséből következik az idegsejtek károsodása. Az oxidatív, illetve a nitrozatív stresszt a sejtet közvetlenül és közvetetten károsítani képes ún. reaktív oxigén, illetve nitrogén származékok okozzák, ha a keletkezésük és eltávolításuk között az egyensúly felbomlik (Moskowitz és mtsai., 2010).

Az alternatív diacil-glicerín receptoroknak is nevezett protein kináz D (PKD) enzimek a szerin/treonin kinázok csoportján belül önálló családot alkotnak. A PKD család változatos szerepet tölthet be és az enzimen keresztül történő szabályozás erősen függ a sejtípustól, illetve a PKD sejtben belüli elhelyezkedésétől. A citotoxikus hatásokra aktiválódó PKD általában a sejtek túléléséhez járul hozzá. Nem neuronális sejtípusokban leírtak egy protektív jelátviteli útvonalat, amelyben az oxidatív stressz hatására aktiválódó PKD a kanonikus NF κ B jelátvitel által járul hozzá a sejt túléléséhez (első leírás: Storz és Toker, 2003). Nem-idegi sejtekben azt is megfigyelték, hogy PKD aktivitás hiányában a mitokondriumok a reaktív oxigén származékokkal szemben érzékenyebbek (Zhang és mtsai., 2015). Ismert az is, hogy az oxidatív stressz által indukált PKD protektív hatása a VPS34 kináz foszforilálásán keresztül, az autofágia szabályozásával érvényesül (Eisenberg-Lerner és Kimchi, 2012).

Annak ellenére, hogy a PKD izoformák a központi idegrendszerben már igen korán és nagy mennyiségben kifejeződnek (Oster és mtsai., 2006), a PKD neurotoxikus hatásokban való szerepéről egyelőre keveset tudunk. A PKD aktivitás növekedését oxidatív stressz hatására megfigyelték primer dopaminerg neuronokban (Asaithambi és mtsai., 2011). Igazolták, hogy a PKD a HSP27 hősokk fehérjét *in vitro* iszkémia hatására foszforilálja, amely szintén a neuronális túlélést támogatja (Stetler és mtsai., 2012). Mások *in vitro* excitotoxicitás és *in vivo* fokális iszkémia esetében is kimutatták a PKD aktivációját, valamint ennek a neuronális túlélést támogató hatását, amit a PKD NF κ B útvonal aktivitást fenntartó szerepével magyaráztak (Pose-Utrilla és mtsai., 2017).

Célkitűzések

- Megfigyelhető-e a PKD aktivitás fokozódása az akut H₂O₂ kezelés által kiváltott oxidatív stressz, illetve a glutamát kezeléssel előidézett excitotoxicitás hatására primer kortikális idegsejtekben?
- Amennyiben a PKD oxidatív stressz, illetve excitotoxicitás hatására aktiválódik, aktivációja toxicitást fokozó vagy protektív hatással van-e az idegsejtekre?
- Amennyiben a PKD oxidatív stressz, illetve excitotoxicitás hatására aktiválódik, milyen *downstream* jelátviteli útvonal(ak) közvetíti(k) hatását?
 - A nem-neuronális sejtekben ismert oxidatív stressz / PKD / NFκB jelátviteli tengely érvényesül-e neuronokban is?
 - Idegsejtekben a PKD aktivitás vagy annak hiánya milyen hatással van a mitokondriális működésre?
 - Az autofágia fokozása oxidatív stressz, illetve excitotoxicitás esetében milyen hatással van az idegsejtek túlélésére? A PKD képes-e az autofágia szabályozására idegsejtekben is?

Alkalmazott módszerek

- egér embrionális kortikális idegsejttenyészetek készítése és fenntartása
- a tenyésztett idegsejtekben excitotoxicitás, illetve oxidatív stressz kiváltása extracellulárisan adott glutamát, illetve H₂O₂ segítségével
- életképesség mérések MTT próba segítségével
- kvantitatív *real time* RT-PCR (qRT-PCR) futtatása
- specifikus fehérjék foszforilált és teljes szintjének megállapítása Western Blot eljárással, teljes, citoplazmatikus vagy sejtmagból származó fehérjefrakcióban
- idegsejtek transzfektálása fluoreszcensen jelzett PKD riporterrel, majd a foszforilált riporter immuncitokémiai detektálása fixált kortikális idegsejttenyészetekben
- RelA (NFκB p65) transzkripciós faktor immuncitokémiai detektálása
- NFκB aktivitás vizsgálata idegsejtekbe transzfektált luciferáz riporter segítségével
- a PKD-aktivitástól függő mitokondriális membránpotenciál-változás vizsgálata idegsejtekben TMRM festék jelöléssel

Eredmények (tézisek)

1. Az endogén PKD aktivitás vizsgálata neurotoxikus kezelések hatására

A PKD 916. pozícióban levő szerinjéről (S916) ismert, hogy az enzim aktivációját követően autofoszforilálódik, így az enzimaktivitás indikátoraként alkalmazható (Matthews és mtsai., 1999). Glutamát által indukált excitotoxicitás hatására a foszforilált S916 arányában nem tapasztaltunk változást. Ezzel szemben 50 μM koncentrációjú H_2O_2 kezelés hatására már 30' után szignifikánsan megnőtt a foszforilált PKD relatív mennyisége az összes PKD-hoz képest. Ez a hatás minimum 2 órán keresztül fennállt és a kezelést követő 6. órára lecsengett.

Az endogén PKD aktivitás kimutatására olyan EGFP-kötött riportert alkalmaztunk, amely a PKD ismert szubsztrátjának foszforilálható szakaszát tartalmazza (Czondor és mtsai., 2009). A foszforilált riportert és az EGFP jel-intenzitás értékek aránya 30' H_2O_2 kezelés hatására megnőtt, azonban a kezelés 1. és 4. órájára már jelentős mértékben lecsengett.

1.1. A PKD nukleáris áthelyeződésének vizsgálata oxidatív stressz hatására

A PKD-ról ismert, hogy aktivációja következtében a sejtmagban kimutatható mennyisége átmenetileg megnő (Wang, 2006). Ennek vizsgálatához a teljes és a foszforilált PKD szintjét a H_2O_2 kezelést követően a nukleáris és a citoplazmatikus fehérjéket tartalmazó sejtlizátumokban is meghatároztuk. Egy órával a H_2O_2 kezelés megindítása után a PKD fehérje mennyisége a sejtmagi frakcióban megnövekedett, majd a kezelés 4. órájára a kontroll szintre esett vissza. A PKD foszforiláció szintje végig változatlan maradt. A citoplazmatikus fehérjemintákban a foszforilált S916 relatív mennyiségében H_2O_2 hatására átmeneti növekedést tapasztaltunk, amely a 2. órában csúcspontot ért el és a kezelés 6. órájára lecsengett. A teljes PKD-mennyiség eközben nem változott.

2. A PKD farmakológiai gátlása súlyosbítja a H_2O_2 kezelés által kiváltott sejtpusztulást

A PKD aktivitás oxidatív stressz által indukált sejtpusztulásra kifejtett hatásának vizsgálatához az idegsejteket 24 óra H_2O_2 mellett PKD-specifikus gátlószerrel (kbNB 142-70) is kezeltük 1-4 μM közötti koncentrációban. A kbNB 142-70 és a H_2O_2 együttes alkalmazása koncentrációfüggő módon csökkentette a sejtek életképességét.

3. A PKD hatását közvetítő lehetséges *downstream* útvonalak vizsgálata

3.1. Az $\text{NF}\kappa\text{B}$ útvonal lehetséges szerepének tisztázása a PKD oxidatív stressz során kifejtett hatásának közvetítésében

A nem-kanonikus $\text{NF}\kappa\text{B}$ útvonal tagjai (NIK, p100/p52, RelB), valamint a BCL-3 és kanonikus útvonalhoz tartozó c-Rel mRNS-ek nem, vagy csak nagyon alacsony szinten

expresszálódtak kortikális idegsejtekben. A kanonikus útvonal többi tagja (IKK α és β , I κ B α , a RelA, NF κ B p105/p50) egyértelműen kifejeződött.

Western Blot segítségével, citoplazmatikus fehérjemintákban vizsgáltuk az IKK α , az I κ B α , a RelA és az NF κ B p105/p50 teljes, illetve foszforilált fehérje-szintjében bekövetkező változásokat H₂O₂ kezelés hatására. Az IKK α esetében az H₂O₂ kezelés 2. órájára enyhén növekedett a foszforilált fehérje aránya. A teljes fehérjeszint eddig az időpontig változatlan maradt, a 4. és 6. órára enyhén csökkent. A foszforilált I κ B α és RelA aránya tranzienst növekedést mutatott már a kezelés után fél órával. A hatás a kezelés 6. órájára lecsengett. A teljes I κ B α szint a kezelés alatt nem tért el a kontroll értéktől. Az NF κ B p105 és az NF κ B p50 jel-intenzitásában egyenletes csökkenést figyeltünk meg a 2 órás kezelési időtartamtól kezdve, ám a p105-p50 fehérjék aránya nem mutatott változást.

Az 1 óráig H₂O₂-dal kezelt idegsejtekben nem mutattunk ki különbséget az immuncitokémiai módszerrel detektált RelA citoplazmatikus és sejtmagi kompartmentumok közötti megoszlásában a kezeltlen sejtekhez képest. Western Blot-ból származó eredményeink szerint nukleáris/citoplazmatikus RelA fehérjemennyiség aránya a 0,5-6 óráig tartó H₂O₂ kezelés során lecsökken. Az NF κ B p50 transzkripciós faktor mennyisége a sejtmagban nem változott. A fehérjeszintű meghatározás mellett funkcionális riporter próbát is alkalmaztunk, amely során az NF κ B kötődés hatására termelődő luciferáz aktivitását követtük nyomon. 100 μ M-os H₂O₂ kezelés nem befolyásolta az enzim termelődését.

3.1.1. A PKD aktivitás és a kanonikus NF κ B útvonal közötti kapcsolat vizsgálata

A kimutatott NF κ B útvonal-foszforiláció PKD aktivitás-függésének vizsgálatára a H₂O₂ mellett alkalmazott PKD-specifikus gátlószer (kbNB 142-70) az IKK α foszforilációját nem befolyásolta abban az egy időpontban, amikor H₂O₂ hatására foszforilációs szint növekedést figyeltünk meg, a többi időpontban pedig hol csökkentette, hol növelte a fehérje foszforiláltságának mértékét. Az I κ B α és a RelA esetében a gátlószer a foszforilált fehérjemennyiséget szintén nem változtatta meg

3.2. A PKD oxidatív stresszel szembeni neuroprotektív hatásának érvényesülése a mitokondriumokon

Az általunk a mitokondriumok közelében kimutatott endogén PKD-aktivitás és a mitokondriális működés közötti kapcsolat felderítésére megvizsgáltuk, hogy inaktív PKD mutáns túltermelődése miként befolyásolja az idegsejtekben a mitokondriális membránpotenciál oxidatív stresszel kiváltott csökkenését. A mutáns PKD-val transzfektált neuronokban 30' H₂O₂ kezelés hatására a TMRM festés intenzitása sokkal jobban lecsökkent,

mint az üres vektorral transzfektált kontroll idegsejtekben, valamint a nem transzfektált idegsejtekben.

3.3. Az autofágia lehetséges szerepének vizsgálata a PKD oxidatív stresszel szembeni neuroprotektív hatásának közvetítésében

3.3.1. Az oxidatív stressz hatása az autofágia mértékére kortikális idegsejt-tenyészetekben

Az autofágia indukciójának követésére használt marker fehérjék közül az LC3B mindkét formájának (LC3B-I és LC3B-II), valamint az SQSTM1/p62 (továbbiakban p62) mennyisége H₂O₂ kezelés hatására csökken. H₂O₂ és az autofág lebomlást gátló bafilomicin együttes alkalmazása esetén a p62, valamint kisebb mértékben az LC3B-II jel intenzitása a kontroll és az H₂O₂-dal kezelt mintákban mért értékekhez képest megnőtt, ami lebontás hiányában felhalmozódásukra utal.

3.3.2. Autofágiát fokozó farmakonok, az AUTEN67 és az AUTEN99 hatásának vizsgálata kortikális idegsejt-tenyészetekre oxidatív stressz mellett

Dr. Vellai Tibor kutatócsoportjával (ELTE Genetikai Tanszék) folytatott együttműködésben az autofágia indukciójának mértékét fokozni képes farmakonok hatását vizsgáltuk (Papp és mtsai., 2016; Kovacs és mtsai., 2017). AUTEN67 kezelés hatására önmagában a kontrollhoz képest jelentős csökkenést figyeltünk meg a p62 és az LC3B-II mennyiségében. A kizárólag AUTEN99-cel kezelt mintákban csak a magasabb koncentrációkban (25-50 µM) mértük ki a relatív p62 szint csökkenését, az LC3B-II szintje ekkor sem változott. Az autofág lebomlást gátló bafilomicint vagy klorokint is alkalmazva megállapítottuk, hogy a gátlószerek hatására az AUTEN67-tel nem kezelt sejtekben az LC3B-II és a p62 fehérjék szintje megnőtt a kontroll értékekhez képest, amely a lebontás hiányában történő felhalmozódásukat jelzi. A felhalmozódás AUTEN67 jelenlétében még kifejezettebb volt, amely a farmakon által felfokozott autofágiára utal. Kísérleteink alapján az AUTEN67 autofágiát fokozó farmakonként működik primer kortikális idegsejtekben. Az AUTEN99 szintén képes az autofágia fokozására a vizsgált sejtípusban, ám az előbbinél jóval kisebb hatékonysággal.

3.3.2.1. Az autofágiát serkentő farmakonok hatásának vizsgálata a H₂O₂-dal kezelt kortikális idegsejtek életképességére

1 és 10 µM AUTEN67 oxidatív stressz mellett pozitív hatással volt az idegsejtek életképességére, magasabb koncentrációban azonban ennek csökkenését váltotta ki. Az AUTEN99 5 µM koncentrációval bezárólag pozitív, 10 µM koncentráció felett negatív hatást fejtett ki az életképességre H₂O₂ kezelés mellett.

3.3.3. Az oxidatív stressz következtében aktiválódó PKD hatásának vizsgálata az autofágiára

Az idegsejteket érő oxidatív stressz által indukált PKD és az autofágia közötti kapcsolat vizsgálatára a különböző ideig H₂O₂-dal és PKD-specifikus gátlószerrel kezelt kortikális idegsejtekben az LC3B-II relatív mennyisége csökken. Ez a hatás 1 órával a H₂O₂ kezelés elindítása után volt a legkifejezettebb. Az LC3B-II/LC3B-I arány PKD gátlószer jelenlétében még nagyobb csökkenést mutatott, utalva arra, hogy a vizsgált kezelések esetében az LC3B-II mennyiségének csökkenése mellett az LC3B-I mennyisége megnőtt.

Következtetések

1. Az endogén PKD aktivitás oxidatív stressz hatására fokozódik

Az oxidatív stressz hatására indukált PKD aktivitásra utaló (S916 foszforiláció, riporter foszforiláció, sejtmagi áthelyeződés) eredményeinket élő idegsejtekből nyert adatok erősítik meg, miszerint 30' H₂O₂ kezelés hatására megnő egy PKD riporter FRET aktivitása (Liliom és mtsai., 2017). Primer kortikális idegsejteken végzett kísérleteinkben így több különböző módon is bizonyítottuk, hogy a PKD aktivációt az oxidatív stressz indukálja. Eredményeink összhangban állnak sejtvonalakon (pl. Storz és Toker, 2003) és primer dopaminerg közepagi neuronokon (Asaithambi és mtsai., 2011) végzett vizsgálatokkal.

2. Az oxidatív stressz által indukált PKD aktivitás neuroprotektív hatású

A PKD aktivitás eredményeink szerint protektív hatású primer kortikális idegsejtekben, mivel a PKD farmakológiai gátlása a H₂O₂ által előidézett életképesség-csökkenést súlyosbította. Megállapításunk egybehangzik más tanulmányok eredményeivel, amelyekben a PKD oxidatív stressz alatt betöltött szerepét vizsgálták nem-neuronális (pl. Storz és Toker, 2003), illetve neuronális sejtvonalakban (pl. Asaithambi és mtsai., 2011).

3. A PKD aktivitás neuroprotektív hatását lehetségesen közvetítő útvonalak azonosítása

3.1. Oxidatív stressz hatására idegsejtekben a kanonikus NFκB útvonal nem a széles körben elfogadott módon aktiválódik

Megfigyeltük, hogy H₂O₂ kezelés hatására: i) az IκBα degradációja elmarad, ii) a RelA és a p50 nukleáris áthelyeződése nem történik meg, és iii) az NFκB riporter luciferáz enzim expressziója nem változik. Összességében ezek az eredmények azt támasztják alá, hogy primer kortikális idegsejtekben az oxidatív stressz az NFκB transzkripciós faktorok kanonikus útvonalnak megfelelő aktivációját nem idézi elő. Az NFκB transzkripciós faktorok bonyolult szabályozásának ismeretében nem zárható ki, hogy primer idegsejtekben oxidatív stressz hatására az NFκB útvonal szabályozó szerepet játszik, mivel a kanonikus tagok

foszforilálódását sikerült kimutatnunk. Kísérleti körülményeink mellett azonban az idegsejtekben oxidatív stresszel kiváltott, kanonikus NF κ B útvonalon keresztüli génaktivációt eredményeink megkérdőjelezik. Bár ez a konklúzió ellentmond számos, neurális sejt típuson vizsgálódó tanulmánynak (pl. Mattson és mtsai., 1997), egy másik publikáció szintén megkérdőjelezi az idegsejtekben az NF κ B útvonal aktivációját oxidatív stressz hatására (Listwak és mtsai., 2013).

3.1.1. Oxidatív stressz során a kanonikus NF κ B útvonal tagjait nem közvetlenül a PKD foszforilálja

Kísérleteinkben a H₂O₂ által előidézett IKK α , I κ B α és RelA foszforiláció mértékének csökkenését vártuk volna a PKD-specifikus inhibitor hozzáadásának hatására. Ehelyett a kbNB 142-70 egyik fehérje relatív foszforiláltsági szintjét sem a várt kinetikának megfelelően befolyásolta. Eredményeink arra utalnak, hogy az NF κ B útvonal vizsgált tagjainak foszforilációja függ a PKD tevékenységétől, de ezt oxidatív stressz hatására nem közvetlenül a PKD végzi. Megállapításunk ellentmond nem-neuronális sejtekkel (pl. Storz és Toker, 2003), valamint primer idegsejtekkel dolgozó tanulmányok (Pose-Utrilla és mtsai., 2017) eredményeinek. Ez az ellentmondás magyarázható lehet pl. a PKD által közvetetten befolyásolt más jelátviteli útvonalak tevékenységével vagy a gátlószer egy esetleges aspecifikus hatásával, tisztázásához azonban további kísérleteket kell elvégezni.

3.2. A PKD nukleáris transzlokációjának jelentősége

A teljes PKD mennyiség növekedése a nukleáris fehérjefrakcióban és a foszforilált fehérje változatlan aránya együtt utalnak arra, hogy a PKD H₂O₂ hatására a sejtmagban is tranziens jelátviteli folyamatban vehet részt. Eredményeink összecsengenek a primer dopaminerg közepagygi neuronokon végzett kísérletek eredményeivel (Asaithambi és mtsai., 2011)., Bár a PKD sejtmagi tevékenységétől függő túlélés-szabályozást már kimutattak (Jo és mtsai., 2016), idegsejtekben az enzim nukleáris jelátviteli útvonal(ak)ban betöltött szerepéről egyelőre keveset tudunk.

3.3. A PKD mitokondrium-asszociáltságának jelentősége

Megállapítottuk, hogy az endogén PKD enzimatis tevékenysége és a PKD szubcelluláris lokalizációja a mitokondriumok közelségében is kimutatható (Liliom és mtsai., 2017). Hasonló jelenséget mutattak ki nem idegi sejtekben is, ahol a PKD a mitokondriális reaktív oxigén származék-érzékenységet befolyásolta (Zhang és mtsai., 2015). Élő sejt kísérletünk alapján a PKD aktivitás fontos lehet a mitokondriális működés fenntartásában. Eredményeink még nem bizonyítják egyértelműen, hogy az oxidatív stressz által aktivált PKD

mitokondriális asszociációhoz kötve fejtené ki neuroprotektív hatást, ennek tisztázásához további kutatás szükséges.

3.4. Az autofágia mint a PKD neuroprotektív hatását közvetítő lehetséges útvonal

Úgy tűnik, hogy a PKD a kortikális idegsejtekben is szerepet játszik az autofágia szabályozásában, bár nem vizsgáltuk, hogy az enzim képes-e az autofágia regulációjában közvetlenül szerepet játszó fehérjék működésének modulálására. Ígéretes eredmény, hogy az autofágiát specifikusan fokozó farmakonok jelenlétében az idegsejteknél oxidatív stressz esetén tapasztalható életképesség-csökkenés kisebb mértékűnek tűnik. A PKD autofágiában betöltött szerepét illetően eddig kevés, ám ellentmondásos eredmény született: serkentő (Eisenberg-Lerner és Kimchi, 2012) és gátló (Zhao és mtsai., 2017) hatását is leírták. Idegsejtekben a PKD és az autofágia közötti kapcsolatot egyelőre nem mutatták ki. Azt, hogy a PKD pozitív vagy negatív hatással van-e a folyamatra, további kísérletekkel kell eldönteni.

Köszönetnyilvánítás

Hálával tartozom témavezetőmnek, Dr. Schlett Katalinnak. Köszönöm Dr. Détári Lászlónak és Dr. Világi Ildikónak, hogy képzésemet az ELTE Élettani és Neurobiológiai Tanszékén végezhettem. Köszönöm a kutatócsoport valamennyi jelenlegi és korábbi tagjának, elsősorban Dr. Tárnok Krisztiánnak a munkámban nyújtott segítségüket. Köszönöm Nagy Andreának az adminisztrációs feladatokban nyújtott segítségét. Köszönöm Dr. Dobolyi Árpádnak, hogy elvállalta a dolgozat tanszéki elbírálásánál az opponensi szerepet. Hálás vagyok Dr. Angelika Haussernek a Stuttgarteri Egyetem Immunológiai és Sejtbiológiai Intézetén végzett kutatási lehetőségért. Köszönöm Dr. Rác Bencének, Dr. Homolya Lászlónak és Török Györgynek, hogy hozzájárultak munkám elkészüléséhez. Nem utolsósorban szeretnék köszönetet mondani családomnak, valamint barátaimnak. A doktori munkám alapjául szolgáló kísérleteket az alábbi pályázatok támogatták: NKFIH KTIA_NAP_13-2014-0018 és 2017-1.2.1-NKP-2017-00002, OTKA K81934, TKA-DAAD 73539 és 274856, valamint VEKOP-2.3.3-15-2016-00007. Köszönöm továbbá a Magyar Államnak a TÁMOP 4.2.4.A/1-11-1-2012-0001 és az UNKP-16-3-ELTE 8495/72 keretében, valamint a Richter Gedeon Nyrt. Centenárium Alapítványnak a 2017. évi Szakmai továbbképzés pályázata keretében nyújtott személyi támogatást.

A doktori értekezés témájában megjelent tudományos közlemények

- Liliom H., Tárnok K., Ábrahám Z., Rác B., Hausser A. és Schlett K. (2017) Protein kinase D exerts neuroprotective functions during oxidative stress via Nuclear Factor kappaB-independent signaling pathways. *JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY*. 142:6 pp. 948-961. **IF: 4.083 (2016/2017)**
- Kovács T., Billes V., Komlós M., Hotzi B., Manžéger A., Tarnóci A., Papp D., Szikszai F., Szinyákovic J., Rác Á., Noszál B., Veszelka S., Walter F. R., Deli M. A., Hackler L. Jr., Alföldi R., Huzian O., Puskás L. G., Liliom H., Tárnok K., Schlett K., Borsy A., Welker E., Kovács A. L., Pádár Z., Erdős A., Legradi A., Bjelik A., Gulya K., Gulyás B. és Vellai T. (2017) The small molecule AUTEN-99 (autophagy enhancer-99) prevents the progression of neurodegenerative symptoms. *SCIENTIFIC REPORTS* 7: Paper 42014. 17 p. **IF: 4.259 (2016/2017)**
- Papp D., Kovács T., Billes V., Varga M., Tarnóci A., Hackler L. Jr., Puskás L. G., Liliom H., Tárnok K., Schlett K., Borsy A., Pádár Z., Kovács A. L., Hegedűs K., Juhász G., Komlós M., Erdős A., Gulyás B. és Vellai T. (2016) AUTEN-67, an autophagy-enhancing drug candidate with potent antiaging and neuroprotective effects. *AUTOPHAGY* 12:(2) pp. 273-286. **IF: 8.593 (2016/2017)**

Nem a doktori értekezés témájában megjelent tudományos közlemények

- Sziber Z., Liliom H., Morales C. O. O., Ignác A., Rátkai A. E., Ellwanger K., Link G., Szücs A., Hausser A. és Schlett K. (2017) Ras and Rab interactor 1 controls neuronal plasticity by coordinating dendritic filopodial motility and AMPA receptor turnover. *MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL* 28:(2) pp. 285-295. **IF: 3.685 (2016/2017)**
- Gulyás M., Bencsik N., Pusztai S., Liliom H. és Schlett K. (2016) AnimalTracker: An ImageJ-Based Tracking API to Create a Customized Behaviour Analyser Program. *NEUROINFORMATICS* 2016: pp. 1-3. **IF: 3.2 (2016/2017)**
- Bencsik N., Sziber Z., Liliom H., Tárnok K., Borbély S., Gulyás M., Rátkai A., Szücs A., Hazai-Novák D., Ellwanger K., Rác B., Pfizenmaier K., Hausser A. és Schlett K. (2015) Protein kinase D promotes plasticity-induced F-actin stabilization in dendritic spines and regulates memory formation. *JOURNAL OF CELL BIOLOGY* 210:(5) pp. 771-783. **IF: 7.955 (2016/2017)**

A tézisekben idézett irodalom

- Asaithambi, A., A. Kanthasamy, H. Saminathan, V. Anantharam, és A.G. Kanthasamy. 2011. Protein kinase D1 (PKD1) activation mediates a compensatory protective response during early stages of oxidative stress-induced neuronal degeneration. *Mol Neurodegener.* 6:43.
- Czondor, K., K. Ellwanger, Y.F. Fuchs, S. Lutz, M. Gulyas, I.M. Mansuy, A. Hausser, K. Pfizenmaier, és K. Schlett. 2009. Protein kinase D controls the integrity of Golgi apparatus and the maintenance of dendritic arborization in hippocampal neurons. *Mol Biol Cell.* 20:2108-2120.
- Eisenberg-Lerner, A., és A. Kimchi. 2012. PKD is a kinase of Vps34 that mediates ROS-induced autophagy downstream of DAPk. *Cell Death Differ.* 19:788-797.
- Jo, H.R., Y.S. Kim, és H. Son. 2016. Erythropoietin and carbamylated erythropoietin promote histone deacetylase 5 phosphorylation and nuclear export in rat hippocampal neurons. *Biochem Biophys Res Commun.* 470:220-225.
- Listwak, S.J., P. Rathore, és M. Herkenham. 2013. Minimal NF-kappaB activity in neurons. *Neuroscience.* 250:282-299.
- Matthews, S.A., E. Rozenfurt, és D. Cantrell. 1999. Characterization of serine 916 as an in vivo autophosphorylation site for protein kinase D/Protein kinase Cmu. *J Biol Chem.* 274:26543-26549.
- Mattson, M.P., Y. Goodman, H. Luo, W. Fu, és K. Furukawa. 1997. Activation of NF-kappaB protects hippocampal neurons against oxidative stress-induced apoptosis: evidence for induction of manganese superoxide dismutase and suppression of peroxynitrite production and protein tyrosine nitration. *J Neurosci Res.* 49:681-697.
- Moskowitz, M.A., E.H. Lo, és C. Iadecola. 2010. The science of stroke: mechanisms in search of treatments. *Neuron.* 67:181-198.
- Oster, H., D. Abraham, és M. Leitges. 2006. Expression of the protein kinase D (PKD) family during mouse embryogenesis. *Gene Expr Patterns.* 6:400-408.
- Pose-Utrilla, J., L. Garcia-Guerra, A. Del Puerto, A. Martin, J. Jurado-Arjona, N.S. De Leon-Reyes, A. Gamir-Morralla, A. Sebastian-Serrano, M. Garcia-Gallo, L. Kremer, J. Fielitz, C. Ireson, M.J. Perez-Alvarez, I. Ferrer, F. Hernandez, J. Avila, M. Lasa, M.R. Campanero, és T. Iglesias. 2017. Excitotoxic inactivation of constitutive oxidative stress detoxification pathway in neurons can be rescued by PKD1. *Nat Commun.* 8:2275.
- Stetler, R.A., Y. Gao, L. Zhang, Z. Weng, F. Zhang, X. Hu, S. Wang, P. Vosler, G. Cao, D. Sun, S.H. Graham, és J. Chen. 2012. Phosphorylation of HSP27 by protein kinase D is essential for mediating neuroprotection against ischemic neuronal injury. *J Neurosci.* 32:2667-2682.
- Storz, P., és A. Toker. 2003. Protein kinase D mediates a stress-induced NF-kappaB activation and survival
- Wang, Q.J. 2006. PKD at the crossroads of DAG and PKC signaling. *Trends Pharmacol Sci.* 27:317-323.
- Zhang, T., P. Sell, U. Braun, és M. Leitges. 2015. PKD1 protein is involved in reactive oxygen species-mediated mitochondrial depolarization in cooperation with protein kinase Cdelta (PKCdelta). *J Biol Chem.* 290:10472-10485.
- Zhao, D., W. Wang, H. Wang, H. Peng, X. Liu, W. Guo, G. Su, és Z. Zhao. 2017. PKD knockdown inhibits pressure overload-induced cardiac hypertrophy by promoting autophagy via AKT/mTOR pathway. *Int J Biol Sci.* 13:276-285.