

A protein kináz D hatása a dendrittüskék aktin vázrendszerének stabilizálására és a tanulási folyamatokra

Doktori értekezés tézisei

Készítette: Bencsik Norbert

Témavezető: Dr. Schlett Katalin, PhD
habilitált egyetemi docens

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar

Biológia Doktori Iskola
Doktori iskolavezető: **Dr. Erdei Anna, PhD, DSc**

Idegtudomány és humánbiológia program
Programvezető: **Dr. Détári László, PhD, DSc**

Idegi Sejtbiológia Kutatócsoport
Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar
Élettani és Neurobiológiai Tanszék



2017

Bevezetés

Az emberi agy serkentő szinapszisainak közel 90 %-a dendrittüskéken végződik. A dendrittüskék alakját és méretét az aktin vázrendszer képes befolyásolni (Hotulainen és Hoogenraad, 2010). A neuronális plaszticitás során az idegsejtekre érkező bemenetek függvényében az idegsejtek közötti kapcsolatok erőssége és száma is megváltozik. Az általánosan elfogadott nézet szerint a tanulás és a memória kialakulásának feltétele a dendrittüskék fejének kiszélesedése. A folyamat során megnő a posztzinaptikus denzitás (PSD) mérete, amely így több neurotranszmitter receptort képes kihorgonyozni, ennek következtében pedig a szinaptikus transzmisszió hatékonysága emelkedik. A dendrittüskék használatfüggő átalakulását számos fehérje képes szabályozni. Ezek bonyolult kapcsolatrendszere a mai napig intenzíven kutatott.

A protein kináz D-t (PKD) először 1994-ben írták le (Johannes és mtsai., 1994; Valverde és mtsai., 1994). A PKD a szerin/treonin kinázok egy nemrég elkülönített csoportjába tartozik, mindhárom izoformája (PKD1, PKD2, PKD3) szerteágazó sejtélettani folyamatokban vesz részt. Nem idegi sejtekben leírták, hogy a PKD a géntranszkripció szabályozásában (Bossuyt és mtsai., 2011), az intracelluláris jelátviteli utak modulálásában (Wang és mtsai., 2002), az aktin vázrendszer átrendeződésében (Olayioye és mtsai., 2013) is részt vesz, emellett a membránkörforgás irányításában (Hausser és mtsai., 2005) is fontos szerepet tölt be.

A PKD a központi idegrendszerben már az embrionális kortól kezdve nagy mennyiségben expresszálódik, de a fehérje idegsejtekben betöltött funkciójáról még keveset tudunk. Kutatócsoportunk munkatársai korábban kimutatták, hogy a PKD részt vesz a Golgi-készülék integritásának fenntartásában és a dendritfa épségének megőrzésében (Czöndör és mtsai., 2009). Emellett a PKD az agyi érkatasztrófák során felszabaduló reaktív oxigén gyökök eliminálása során neuroprotektív hatást fejthet ki (Sánchez-Ruiloba és mtsai., 2014). Bizonyított az is, hogy a PKD fontos szerepet tölt be az idegsejtekben zajló membránfehérje transzport irányításában (Bisbal és mtsai., 2008). A PKD neuronális plaszticitásban betöltött szerepéről azonban egyelőre még kevés irodalmi adat áll rendelkezésünkre – doktori munkám során ennek felderítésére koncentráltam.

Célkitűzések

Doktori dolgozatom elkészítése során egér embrionális hippokampális idegsejttenyészetekben, valamint a PKD kináz inaktív mutáns formáját indukálható módon termelő transzgén egerekben vizsgáltam a PKD neuronális plaszticitásban betöltött szerepét. Munkám során a következő kérdésekre kerestem a választ:

- A dendrittüskék kémiai ingerléssel kiváltott morfológiai megváltozása során kimutatható-e a PKD aktiválódása?
- Milyen jelátviteli útvonalakon képes szabályozni a dendrittüskék morfológiai átalakulását a PKD?
- Hogyan változtatja meg *in vitro* a dendrittüskék morfológiáját a PKD domináns-negatív, mutáns formájának túltermeltetése és farmakológiai gátlása?
- Hogyan változik meg a hippokampális piramissemjtek dendrittüskéinek alakja, ha a PKD domináns-negatív, mutáns formáját szövetspecifikusan túltermeltetjük transzgenikus egerek hippokampuszában?
- Hatással van-e az állatok általános mozgásmintázatára, kognitív memóriájára és a térbeli tanulási képességére a PKD domináns-negatív, mutáns formájának túltermeltetése?

Alkalmazott módszerek

- egér primer hippokampális idegsejtenyészetek készítése és fenntartása
- fluoreszcensen jelzett fehérjék Lipofectamine2000 felhasználásával kivitelezett transzfekcióval kiváltott túltermeltetése az idegsejtenyészetekben

név	plazmid	hivatkozás
aktin-EGFP	pEGFP-N1-aktin	Clontech
EGFP	pEGFP-N1	Clontech
kdPKD-EGFP	pEGFP-N1-PKD1 K612W	Hausser és mtsai., 2002
PKD aktivitás szenzor	pEGFP-C1-L-pS294-L	Czöndör és mtsai., 2009
PKD aktivitás szenzor S/A	pEGFP-C1-L-pS294A-L	Czöndör és mtsai., 2009

1. táblázat A kísérletekhez használt plazmidok.

- a tenyésztett idegsejtekben hosszú távú, tartós plaszticitási folyamatok kiváltása (glicinnel kiváltott LTP és 24 órás KCl kezelés hatásának vizsgálata)
- immuncitokémiai detektálás fixált hippokampális idegsejtenyészetekben
- mikroszkópos elemzések:
 - hippokampális idegsejtenyészetekben a PKD aktivitás meghatározása a dendrittüskék feji részében PKD aktivitás riporter konstrukciók felhasználásával
 - dendritikus filopódiumok motilitásának vizsgálata live cell imaging technika segítségével

- foszforilált cofilin szint meghatározása a dendrittüskék feji részében
- dendrittüskék morfológiai/morfometriai elemzése és kategorizálása transzfektált idegsejtenyészetekben
- a dendrittüske profilok vizsgálata elektronmikroszkópiával a hippocampusz CA1 és CA3 régióban *in vivo*
- viselkedésélettani vizsgálatok:
 - az állatok általános mozgásmintázatának vizsgálata nyílt porond teszttel
 - az egerek kognitív memóriájának elemzése új objektum felismerése teszttel
 - az állatok térbeli tanulási képességének/memóriájának vizsgálata 8-karú sugárlabirintusban és Morris-féle vízi labirintus tesztben

Eredmények (tézisek)

1. Az endogén PKD aktív a dendrittüskékben

A dendrittüskékben a PKD aktivitását a PKD aktivitás szenzor felhasználásával vizsgáltuk (Czöndör és mtsai., 2009). A PKD aktivitás szenzor egy olyan fúziós fehérje, amelyben az EGFP a PI4KIII β a PKD által foszforilálható szekvencia-részletéhez kapcsolódik. A PKD által specifikusan foszforilált, 294-es pozícióban lévő szerint a foszforilált helyre specifikus ellenanyaggal kivitelezett immunfestéssel azonosítottuk. Két fajta plaszticitási modellrendszer alkalmazása során vizsgáltuk a PKD aktivitás változását. Ezekről a kezelésekről ismert, hogy a tenyésztett idegsejtekben a dendrittüskék alakjának hosszú távú, tartós megváltozását okozzák (Park és mtsai., 2006; Grubb és Burrone, 2010), így a glicinnel kiváltott kémiai LTP és a KCl-dal kiváltott, tartós depolarizáció¹ során is megfigyeltük a dendrittüskék fejének kiszélesedését.

A PKD aktivitás szenzorral végzett kísérletek bizonyítják, hogy a glicinnel kiváltott kémiai LTP során a kezelést követő 5. és 30. percben is megemelkedett a PKD aktivitása. A PKD-ra specifikus gátlószer (kbNB 142-70) alkalmazásával a PKD aktivitása lecsökkent. Igazolni tudtuk, hogy a PKD aktivitás növekedését a glicin kezelés során alkalmazott APV meggátolta, ami jelzi, hogy a PKD aktiválódásában az NMDA-receptorok működése is szerepet játszik.

¹ A 25 mM-ra emelt káliumion szint a sejtek nyugalmi membránpotenciáljának megnövekedését indukálja, amely során a sejtek aktivitása gátlódik, akciós potenciálok nem alakulnak ki, mert a membránpotenciál tartósan $-28,8 \pm 0,9$ mV körüli értéken van (ld. Bencsik és mtsai., 2015).

A 30 és 120 percig tartó KCl kezelések alatt a dendrittűskékben a PKD aktivitás szintén megnövekedett, amit a PKD-specifikus gátlószer (kbNB 142-70) megakadályozott. Az egyelőre nem teljesen tisztázott, hogy a KCl kezelés milyen mechanizmusokon keresztül okozza a PKD aktivitás növekedését, de valószínűsíthető, hogy a folyamatban az NMDA-receptorok is érintettek, mivel az MK-801 (NMDA-receptorok nem-kompetitív antagonistája) jelenlétében szignifikánsan csökkent a PKD aktivitása a KCl-dal kezelt sejtek aktivitás értékeihez viszonyítva.

2. A PKD aktivitás gátlása növeli a dendritikus filopódiumok *in vitro* motilitását

Hippokampális idegsejttenyészeteken vizsgáltuk live cell imaging technika segítségével a dendritikus filopódiumok motilitását. A felvételeket a kutatócsoportunkban kifejlesztett NIH ImageJ/Fiji keretrendszerben működő DFMA (Dendritic Filopodia Motility Analyzer) alkalmazás segítségével elemeztük (Tárnok és mtsai., 2015).

A PKD aktivitás gátlását a domináns-negatív fenotípust mutató PKD mutáns (kdPKD-EGFP) transzfektálásával és a PKD specifikus gátlószer adásával (kbNB 142-70) is vizsgáltuk. Eredményeinkből megállapíthatjuk, hogy a dendritikus filopódiumok motilitása mindkét esetben szignifikánsan megnőtt.

3. A PKD a cofilin inaktivációján keresztül képes szabályozni az aktin vázrendszer dinamikáját

Nem neuronális sejtekben leírták, hogy a PKD a cofilin dependens útvonal szabályozásán keresztül az aktin vázrendszer stabilizálását segíti elő (Olayioye és mtsai., 2013). Hippokampális idegsejttenyészetek dendrittűskéinek fejében vizsgáltuk a foszforilált cofilin intenzitás mértékét, mivel a cofilin 3. pozíciójú szerinjének (Ser3) foszforilálása az aktin vázrendszer átalakulását befolyásoló cofilint inaktiválja. A Ser3 foszforilációja a filamentáris aktin stabilizációjához vezet, defoszforilációja pedig az aktin vázrendszer destabilizálódását okozza (Mizuno, 2013).

A foszforilált Ser3-cofilin szintet kvantitatív mikroszkópos módszerekkel elemeztük a dendrittűskék fejében. A glicinnel kiváltott LTP 30. percében fixált dendrittűskék fejében a foszforilált cofilin szint lecsökkent. Ekkor az F-aktin rendszer a dinamikus reorganizáció állapotában van (ún. korai LTP; Bosch és mtsai., 2014). Ehhez hasonló hatást láttunk a kbNB 142-70 alkalmazása során is. Amennyiben a glicinnel kiváltott LTP során kbNB 142-70-et is alkalmaztunk, a hatás nem volt additív, vagyis a tranziens cofilin aktivitást a PKD gátlása nem volt képes tovább növelni. A glicin kezelés utáni 120. percben a dendrittűskék fejében a foszforilált cofilin szintje már megemelkedett, ez összhangban áll azzal, hogy ekkor az aktin

vázrendszer a konszolidáció fázisába került (ún. késői LTP; Bosch és mtsai., 2014). Ekkor a kbNB 142-70 alkalmazása már szignifikánsan csökkentette a foszforilált cofilin szintjét.

Tartós KCl kezelés után megvizsgáltuk, hogy a dendrittüskék fejében hogyan változik a foszforilált cofilin szintje. 16 óra KCl kezelés után a foszforilált cofilin szintje megnőtt, amely hatást a kbNB 142-70 képes volt megakadályozni. Mindezek igazolják, hogy a PKD a plaszticitáshoz szükséges F-aktin stabilizációt a cofilin inaktivációján (Ser3 foszforilációján) keresztül, közvetetten szabályozza.

4. A PKD aktivitás a dendrittüskék eloszlását és morfológiáját is befolyásolja

Megvizsgáltuk, hogy az endogén PKD aktivitásra domináns-negatív hatást kifejtő kdPKD-EGFP túltermeltetése vajon hatással van-e a dendrittüskék eloszlására és morfológiájára. A dendrittüskék pontos morfológiai kategorizálását az irodalmi adatok alapján végeztük el (Peters és Kaiserman-Abramof, 1970). A PKD aktivitás gátlása a protrúziók denzitását szignifikánsan lecsökkentette, emellett jellegzetes változásokat okozott a dendrittüske-típusok eloszlásában és morfológiájában is. A vékony és hosszúkás (fonalnak nevezett) dendrittüskék aránya megnőtt, a gomba morfológiájú tüskék gyakorisága pedig lecsökkent.

A PKD aktivitás szenzorral végzett kísérletek bizonyították, hogy a KCl kezelés során a PKD a dendrittüskékben aktiválódik. Kíváncsiak voltunk arra, hogy a tartós depolarizáció során a tüskék fejének kiszélesedésében a PKD szerepet játszik-e. A tartós, 16 órás KCl kezelés szignifikánsan megnövelte a gomba alakú tüskék arányát, míg a fonalas tüskék aránya lecsökkent. Önmagában a kbNB 142-70 alkalmazása a gomba morfológiájú tüskék arányát csökkentette, de ez nem különbözött szignifikánsan a kontrolltól. A tartós depolarizáció okozta tüskefej-kiszélesedést viszont a PKD-sepcifikus gátlószer alkalmazása már megakadályozta. Mindezek alapján megállapíthatjuk, hogy a tartós depolarizáció következtében kialakuló dendrittüske fejek kiszélesedésében a PKD szerepet játszik.

5. A hippokampuszban termelődő domináns-negatív kdPKD-EGFP mutáns fehérje a CA1 és CA3 piramis sejtek dendrittüskéinek méretét lecsökkenti

A domináns-negatív fenotípusú kdPKD-EGFP fehérjét indukálható módon, szövetspecifikusan a hippokampuszban expresszáltattuk. Rácz Bencével, a Szent István Egyetem Állat-örvostudományi Karának munkatársával együttműködve, elektronmikroszkópia segítségével elemeztük a hippokampusz CA1 régió stratum radiatum és CA3 régió stratum lucidum piramis sejtjeinek dendrittüske paramétereit.

A hippocampusz CA1 régió stratum radiatumában a kdPKD-EGFP-t expresszáló állatok dendrittüskéinek területe és kerülete szignifikánsan alacsonyabb volt a kontroll állatokéhoz képest. A CA3 régió stratum lucidumában a dendrittüskék területe, PSD hosszúsága és cirkularitása szignifikánsan csökkent a kontroll állatok értékeihez viszonyítva. Ezzel sikerült bizonyítanunk, hogy a dendrittüskék PKD-aktivitástól függő, *in vitro* változásai *in vivo*, az intakt agyszövetben is hasonlóan zajlanak le.

6. A hippocampuszban expresszálódó domináns-negatív PKD rontja a hippocampusz aktivitásától függő tanulási képességeket

Az endogén PKD aktivitást gátló, domináns-negatív PKD mutáns hatását viselkedési tesztekben is elemeztük. Az elkészült felvételek elemzését a kutatócsoportunkban kifejlesztett NIH ImageJ/Fiji keretrendszerben működő AnimalTracker alkalmazás segítségével elemeztük (Gulyás és mtsai., 2016).

A nyílt porond tesztben az állatok motoros működését és explorációs tevékenységét is vizsgálhatjuk. Eredményeink alapján a doxiciklinnel kezelt, kettős transzgen és kontroll állatok között a hely-preferenciában és a vizsgált hat paraméterben (megtett távolság, elindulások száma, helyváltoztató mozgással töltött idő, ágaskodással töltött idő, ágaskodások száma, mozdulatlanul töltött idő) nem volt különbség.

A rágcsálók vizuális objektum felismerési memóriájának egyik elfogadott vizsgálati módszere az új objektum felismerés teszt (Antunes és Biala, 2012). A tárgyak felismerésében alapvető szereppel bíró agyi struktúrákban (perirhinális kéreg, entorhinális kéreg és az inferior temporális kéreg) a kdPKD-EGFP expressziója nem jelentős. Eredményeinkből megállapíthatjuk, hogy az új tárgy szimatolásával eltöltött idő a kontroll és a PKD mutáns állatok esetében is szignifikánsan magasabb volt, vagyis az új tárgy iránti preferencia hasonló mértékű volt. Meghatároztuk a diszkriminációs indexet² is, amely a két csoport között a vizsgált időpontokban nem különbözött. Ebből megállapíthatjuk, hogy a hippocampuszban termelődő kináz inaktív PKD az új tárgyak felismerésére nincs hatással.

A kutatócsoportunk két klasszikus labirintus teszt során is vizsgálta az állatok térbeli tájékozódását. A Morris-féle vízi labirintus tesztben a kontroll állatok az ötödik és tizedik napon a sziget keresése során szignifikánsan több időt és több utat tettek meg a célterületen, mint a kettős transzgen egerek. Míg a kontroll állatok a mérés ötödik és tizedik napja között

² Az új tárgy felismerése tesztben gyakran használatos paraméter (hányados). Kiszámításának módja:

$$DI = \frac{\text{az új tárgy vizsgálatával töltött idő} - \text{a régi tárgy vizsgálatával töltött idő}}{\text{az új tárgy vizsgálatával töltött idő} + \text{a régi tárgy vizsgálatával töltött idő}}$$

szignifikánsan javították eredményüket, addig a mutáns PKD formát termelő egerek teljesítménye nem változott. A sugárlabirintus tesztben az első hét nap után az állatcsoportok között sem a labirintusban megtett útban, sem a labirintusban eltöltött időben nem találtunk különbséget. A második hét elejétől azonban a kontroll állatok szignifikánsan gyorsabban megtalálták a karok végén a morzsákat. Ezzel igazolni tudtuk, hogy a kináz-inaktív PKD az egerek térbeli tanulási képességét jelentősen rontja.

Következtetés

1. A dendrittüskék fejének kémiai úton kiváltott kiszélesedése során a PKD aktiválódik

A PKD aktivitás szenzorral végzett kísérletek bizonyítják, hogy a rövid idejű, glicinnel kiváltott kémiai LTP és a tartós KCl kezelés következtében fellépő depolarizációs blokk is az endogén PKD aktiválódásához vezet a dendrittüskékben. A glicinnel kiváltott LTP-vel az az állapot modellezhető, amikor az idegi hálózatokban a glutamát szinaptikus felszabadulása olyan mértékű, hogy az AMPA-receptorok mellett az NMDA receptorok is aktiválódnak. Ennek következtében a sejtekbe jutó kalciumionok a CaMKII α aktiválásán keresztül az AMPA-receptorok foszforilációját és membránfelszíni kihelyeződését, valamint a PKA működését fogják serkenteni, ami a tüskefej morfológiai változásához, kiszélesedéséhez vezet. Az NMDA-receptorok és a PKD aktiválódása közötti molekulák és jelátviteli utak egyelőre még ismeretlenek.

A tartós KCl kezelés következtében fellépő depolarizációs blokk az idegsejtek homeosztatikus plaszticitásának megváltozásához vezet (Grubb és Burrone, 2010). Az idegsejtek a KCl kezelés következtében kialakuló tartós depolarizációs blokkhoz alkalmazkodva megnövelik a poszt-szinaptikus membránban a felszíni receptoraik számát (homeosztatikus upreguláció) (Turrigiano és mtsai., 1998). Az irodalomban ismert, hogy a tartós KCl kezelés nemcsak a dendrittüskék fejének a kiszélesedését, hanem az axon iniciális szegmentum disztális irányba történő elmozdulását is elősegíti. A folyamatban a T- és L-típusú kalcium csatornák fontos szerepet játszanak, amelyek szerepét a mi modellrendszerünkben is igazolni tudtunk.

2. A PKD az aktin stabilizációját szabályozza a dendrittüskékben

A szinaptikus kapcsolattal még nem rendelkező, gyors mozgású dendritikus filopódiumok motilitását az aktin vázrendszer dinamikája nagyban megszabja. A hippocampális tenyészetekben a dendritikus protrúziók motilitását a PKD farmakológiai

gátlása és a kináz inaktív mutáns túltermeltetése is megnövelte. Ebből megállapíthatjuk, hogy a filopódiumok stabilizációjában a PKD szerepet játszik.

A szinaptikus kapcsolatokkal már rendelkező dendrittüskék főbb molekuláris komponenseinek mennyisége és eloszlása LTP indukciója után jellegzetesen megváltozik (Bosch és mtsai., 2014). Az LTP kiváltása utáni első fázisban a dendrittüskék feje átmenetileg kiszélesedik (1-7 perc), amelyért az F-aktin depolimerizációja a felelős. Ebben a fázisban lezajló aktin átépülés szabályozásában a PKD nem játszik jelentős szerepet. A korai LTP alatt lezajló folyamatokban a PKD aktiválódása mellett számos más fehérje is szerepet játszik, amelyek a PKD hatását ellensúlyozva a cofilin defoszforilációja és aktivációja felé tolják el a szabályozást (Mizuno, 2013). A késői LTP során (120. percben) a kbNB 142-70 hozzáadásával a foszforilált cofilin intenzitás értékek csökkentek. Ebből megállapíthatjuk, hogy a konszolidáció során az aktin vázrendszer dinamikájának szabályozásában a PKD szerepet játszik. Eredményeink bizonyították, hogy a késői LTP során az aktin vázrendszer dinamikájának szabályozásában a PKD számos járulékos célfehérjén keresztül gyakorol közvetett hatást: egyrészt a PAK4-LIMK1/2-cofilin kaskád rendszert aktiválja, másrészt pedig az SSH-t inaktiválja.

A Rácz Bencével kollaborációban elvégzett elektronmikroszkópos vizsgálataink alapján a kdPKD-EGFP-t termelő, kettős transzgén állatokban immunarany jelöléssel kimutattuk, hogy a kináz inaktív PKD a posztzinaptikus membrán közelében, az aktin depolimerizációjáért felelős cofilin elhelyezkedésével azonos területen detektálható.

3. A kdPKD-EGFP expressziójának hatása az idegsejtek működésére és az állati viselkedésre

Az elektronmikroszkópos felvételek alapján a mutáns PKD forma jelenlétét a piramissejtek dendritjeiben és a dendrittüskékben is igazolni tudtuk. Elektrofiziológiai módszerekkel tisztázni szeretnénk volna a kdPKD-EGFP expressziójának a hatását. A mérések során a kontroll és a kettős transzgén egerek hippocampális piramissejtjeinek alapingerlékenységében nem tapasztaltunk különbséget. Ez összecseng azzal, hogy a sugárlabirintus tesztben a két állatcsoport között az első hét során nem volt különbség. Ha azonban az állatoknak a dendrittüskék morfológiai átalakulásával is járó, hosszú távú memóriájukat kellett használniuk (pl. a sugárlabirintusban a csali falatokat tartalmazó karok felismerése), akkor a kettős transzgén állatok rosszabbul teljesítettek. Ezt a megfigyelést az elektrofiziológiai tesztekben is sikerült alátámasztanunk, ugyanis az LTP kiváltása után a kettős transzgén állatokból származó agyszeletekből mérhető populációs spike-ok amplitúdója szignifikánsan alacsonyabb volt mono- és biszinaptikus ingerlés esetén is.

A PKD a szinaptikus plaszticitás és a tanulási folyamatok szabályozásában a dendrittüskékben zajló aktin-turnover stabilizálásán keresztül vesz részt. A fenti folyamatokhoz elengedhetetlen még az idegsejtekben a neurotranszmitter receptorok szabályozott exo- és endocitózisa is (Park és mtsai., 2006). A PKD aktivitás endocitózist serkentő hatásának háttérében álló molekuláris útvonalak vizsgálatára irányuló kísérletek a továbbiakban még szükségszerűek.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Dr. Détári Lászlónak és Dr. Világi Ildikónak, az ELTE-TTK Élettani és Neurobiológiai Tanszék korábbi és jelenlegi vezetőjének, hogy a doktori disszertációm elkészítéséhez szükséges tanszéki háttérrel biztosították.

Külön köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek, Dr. Schlett Katalinnak, hogy munkám során szakmai ismeretekkel és tanácsokkal látott el és irányítása alatt elsajátíthattam a tudományos kutatás elvi és gyakorlati alapjait. Hálás vagyok a doktori disszertáció elkészítésében nyújtott mérhetetlen segítségért is.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Tárnok Krisztiánnak, hogy bármikor fordulhattam hozzá elméleti és gyakorlati kérdéseimmel és a munkámon kívül is számíthattam segítségére.

Nagyon köszönöm az Idegi Sejtbiológiai Laboratórium minden korábbi és jelenlegi munkatársának és hallgatójának a támogatását és közreműködését, amely segítette a dolgozat elkészítését. Baráti köszönettel tartozom Hannának és Marcinak.

Köszönöm Dr. Rác Bencének az elektronmikroszkópos vizsgálatok során nyújtott segítségét. Az elektrofiziológiai mérések kapcsán megköszönöm Dr. Borbély Sándor és Dr. Szűcs Attila munkáját.

Hálámat fejezem ki Dr. Angelika Haussernek és Dr. Klaus Pfizenmaiernek, amiért a Stuttgarteri Egyetem Sejt és Immunológiai Intézetében dolgozhattam. Külön köszönöm Dr. Kornelia Ellwangernek, hogy a kint tartózkodásom során mindenben a segítségemre volt.

Köszönöm a családomnak, hogy tanulmányaim során végig biztos háttérrel alakítottak ki és támogattak. Külön köszönöm feleségemnek, Rékának, hogy mindvégig megértő és türelmes volt.

A témában megjelent tudományos közlemények

- Bencsik, N., Szíber, Zs., Liliom, H., Tárnok, K., Borbély, S., Gulyás, M., Rátkai, A., Szűcs, A., Hazai-Novák, D., Ellwanger, K., Rác, B., Pfizenmaier, K., Hausser, A., Schlett, K. (2015) Protein kinase D promotes plasticity-induced F-actin stabilization in dendritic spines and regulates memory formation. *The Journal of Cell Biology*. **210**(5): 771-783. doi:10.1083/jcb.201501114 (IF:8,717)
- Tárnok, K., Gulyás, M., Bencsik, N., Ferenc, K., Pfizenmaier, K., Hausser, A., Schlett, K. (2015) A new tool for the quantitative analysis of dendritic filopodial motility. *Cytometry Part A*. **87**(1) pp. 89-96. doi:10.1002/cyto.a.22569 (IF:3,181)
- Gulyás, M., Bencsik, N., Puzstai, S., Liliom, H., Schlett, K. AnimalTracker: an ImageJ-based tracking API to create customized behavioural analyser program. *Neuroinformatics*. **14**(4): 479-481. (2016). doi:10.1007/s12021-016-9303-z (IF:2,864)

Nem a témában megjelent tudományos közlemények

- Szigeti, Cs., Bencsik, N., Simonka, J.A., Légrádi, Á., Kása, P., Gulya, K. (2013) Long-term effects of selective immunolesions of cholinergic neurons of the nucleus basalis magnocellularis on the ascending cholinergic pathways in the rat: A model for Alzheimer's disease. *Brain Research Bulletin*. **94C**: 9-16. doi:10.1016/j.brainresbull.2013.01.007 (IF:2,974)

A tézisekben idézett irodalom

- Antunes, M., Biala, G. (2012). The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cognitive processing*. **13**(2): 93–110. doi:10.1007/s10339-011-0430-z
- Bisbal, M., Conde, C., Donoso, M., Bollati, F., Sesma, F., Quiroga, S., Díaz Añel A., Malhotra, V., Marzolo, M.P., Cáceres, A. (2008). Protein kinase D regulates trafficking of dendritic membrane proteins in developing neurons. *The Journal of Neuroscience*. **28**(37): 9297–9308. doi:10.1523/JNEUROSCI.1879-08.2008
- Bosch, M., Castro, J., Saneyoshi T., Matsuno, H., Sur, M., Hayashi, Y. (2014). Structural and molecular remodeling of dendritic spine substructures during long-term potentiation. *Neuron*. **82**(2): 444–59. doi:10.1016/j.neuron.2014.03.021
- Bossuyt, J., Chang C.W., Helmstadter, K., Kunkel, M.T., Newton, A.C., Campbell K.S., Martin, J.L., Bossuyt, S., Robia S.L., Bers, D.M. (2011). Spatiotemporally distinct protein kinase D activation in adult cardiomyocytes in response to phenylephrine and endothelin. *The Journal of Biological Chemistry*. **286**(38): 33390–400. doi:10.1074/jbc.M111.246447
- Czöndör, K., Ellwanger, K., Fuchs, Y.F., Lutz, S., Mansuy, I.M., 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. *Molecular Biology of the Cell*. **20**: 2108–20. doi:10.1091/mbc.E08
- Grubb, M.S., Burrone, J. (2010). Activity-dependent relocation of the axon initial segment fine-tunes neuronal excitability. *Nature*. **465**(7301): 1070–74. doi:10.1038/nature09160
- Hausser, A., Märten, S., Link, G., Pfizenmaier, K. (2005). Protein kinase D regulates vesicular transport by phosphorylation and activation of phosphatidylinositol-4 kinase III β at the Golgi complex. *Nature Cell Biology*. **7**(9): 880-886. doi:10.1038/ncb1289
- 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
- Johannes, F.J., Prestle J., Eis, S., Oberhagemann, P., Pfizenmaier, K. (1994). PKC μ is a novel, atypical member of the protein kinase C family. *The Journal of Biological Chemistry*. **269**(8): 6140–48.
- Mizuno, K. (2013). Signaling mechanisms and functional roles of cofilin phosphorylation and dephosphorylation. *Cellular Signalling*. **25**(2): 457–69. doi:10.1016/j.cellsig.2012.11.001
- Olayioye, M.A., Barisic, S., Hausser, A. (2013). Multi-level control of actin dynamics by protein kinase D. *Cellular Signalling*. **25**(9): 1739–47. doi:10.1016/j.cellsig.2013.04.010
- Park, M., Salgado J.M., Ostroff, L., Helton, T.D., Robinson, C.G., Harris, K.M., Ehlers, M.D. (2006). Plasticity-induced growth of dendritic spines by exocytic trafficking from recycling endosomes. *Neuron*. **52**(5): 817–30. doi:10.1016/j.neuron.2006.09.040
- Peters, A., Kaiserman-Abramof, I.R. (1970). The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. *The American Journal of Anatomy*. **127**(4): 321–55. doi:10.1002/aja.1001270402
- Sánchez-Ruiloba, L., Aicart-Ramos, C., García-Guerra, L., Pose-Utrilla, J., Rodríguez-Crespo, I., Iglesias, T. (2014). Protein kinase D interacts with neuronal nitric oxide synthase and phosphorylates the activatory residue serine 1412. *PLoS ONE*. **9**(4): e95191. doi:10.1371/journal.pone.0095191
- Turrigiano, G.G., Leslie, K.R., Desai, N.S., Rutherford, L.C., Nelson, S.B. (1998). Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons. *Nature*. **391**(6670): 892–96. doi:10.1038/36103
- Valverde, A.M., Sinnott-Smith, J., Van Lint, J., Rozengurt, E. (1994). Molecular cloning and characterization of protein kinase D: a target for diacylglycerol and phorbol esters with a distinctive catalytic domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **91**(18): 8572–76. doi:10.1073/pnas.91.18.8572
- Wang, Y., Waldron, R.T., Dhaka, A., Patel, A., Riley, M.M., Rozengurt, E., Colicelli, J. (2002). The RAS effector RIN1 directly competes with RAF and is regulated by 14-3-3 proteins. *Molecular and Cellular Biology*. **22**(3): 916–26. doi:10.1128/MCB.22.3.916-926.2001