

Magyar–német (TKA–DAAD) kutatócsere projekt

Záró beszámoló

Nyilvántartási szám: 274856

Projektcím: Az AMPA receptorok szállítását befolyásoló hatások vizsgálata az idegsejtek
plaszticitási folyamatai során

Magyar projektvezető neve: Dr. Schlett Katalin

Magyar intézmény neve: Eötvös Loránd Tudományegyetem

Német projektvezető neve: Dr. Angelika Hausser

Német intézmény neve: Inst. Zellbiologie und Immunologie, Universität Stuttgart

Támogatási időszak: 2018–2019

A. A projektidőszakban elvégzett munka összefoglalása (max. 2 oldal)

A budapesti és a stuttgarter laboratóriumok között régóta fennálló szakmai együttműködés az elmúlt két évben is sikeresen folytatódott. A protein kináz D (PKD) és az AMPA-típusú ionotróp glutamát receptorok közötti kölcsönhatást sikerült feltárnunk. Igazoltuk, hogy az idegsejtek elektrofiziológiai sajátosságait és a tanulási folyamatok molekuláris alapjait szabályozó AMPA receptorokat a PKD enzim aktivitása is szabályozza. Úgynevezett „ellenanyag–etetési” konfokális immuncitokémiai eljárás, illetve felszíni biotinilációs Western blot technika segítségével is bizonyítottuk, hogy a PKD aktivitás rövid távú, farmakológiai gátlása az AMPA receptorok endocitózisát megakadályozza, így sejt felszíni mennyiségüket megnöveli.

A hatásmechanizmus tisztázására olyan konstrukciókat fejeztünk ki a tenyésztett idegsejtekben, amelyben az AMPA receptor alegységét az extracelluláris, N terminális véghez kapcsolt, pH-függően fluoreszcens super-ecliptic phluorin (SEP) jelöléssel láttuk el. Ennek eredményeként az idegsejtekben túltermeltetett, SEP címkével jelölt AMPA receptor csak a sejt felszínen válik fluoreszcenssé, a plamamembránba irányuló exocitózist, illetve a sejt felszíni receptorok visszavételét irányító endocitózist biztosító vakuólumok savas pH-jú belsejében nem. A posztszinaptikus membránban található, fluoreszcens SEP-GluA1 alegységeket lézerrel kifakítottuk, majd meghatároztuk, hogy a fluoreszcencia milyen mértékben és kinetikával tér vissza a fakított területekre (ún. FRAP, azaz „fakítást követő fluoreszcens jelvisszatérés” kísérlet).

Kísérleti eredményeink a fixált sejteken megfigyeltekkel összhangban megerősítették, hogy a PKD aktivitás gátlása az endocitózis folyamatának gátlásával lassította le a kifakított receptorok kicserélését. Sikerült bizonyítanunk azt is, hogy a PKD endocitózist

szabályozó hatása a a Rab5 kis GTPáz fehérje aktivitását szabályozó Rabaptin5 fehérjén keresztül érvényesül. Korábbi közös kutatómunkánk során már bizonyítottuk, hogy a tanulási folyamatokhoz a PKD aktivitás alapvetően szükséges, így ezek az eredmények a memória kialakulásának és fenntartásának hátterében álló, eddig még nem ismert, PKD-függő szabályozó mechanizmusra is fényt derítenek. Közös kéziratunk jelenleg a Molecular Cell Biology folyóiratnál bírálat alatt áll, a jövő év elején pedig Carlos Morales erről a témáról készített PhD dolgozata is benyújtásra kerül. 2019-ben az AMPA receptorok körforgását szabályozó Rab fehérjéről készített közös összefoglaló cikkünk is megjelent.

Az idegsejtekben PKD-függő módon szabályozott AMPA receptor körforgás irányításával kapcsolatban egy másik PKD-szubsztrát, a RIN1 szerepét is vizsgáltuk. Az elmúlt 2 évben igazoltuk, hogy a RIN1 fehérje az AMPA receptorok endocitózisát az aktin vázrendszerre gyakorolt hatásán keresztül fejt ki. Élő, az aktin vázrendszert fluoreszcensen jelölő konstrukciókat kifejező idegsejtekben végzett kísérleteink szerint a RIN1 a már kialakult szinaptikus kapcsolatokat stabilizálja, így a tanulási és az emléknymokat felidéző képességekre szintén hatással van. Ignác Attila jelenleg másod éves PhD hallgató több konferencián is sikerrel mutatta be munkáját, eredményeinket a jövő év elején tervezzük publikálni.

Kísérleti munkánkban nehézséget jelent, hogy a különböző génkonstrukciók az idegsejtekbe csak igen kis hatékonysággal juttathatóak be, ráadásul az idegsejttenyészetek készítése és fenntartása sem egyszerű feladat. Alternatív megoldásként 2018 nyara óta a kutatócsere programra támaszkodva két MSc-s hallgató bevonásával sejtvonalakon is elkezdtuk vizsgálni a PKD függő hatásokat. Abril Gamo MSc hallgató kvantitatív RT-PCR, Western blot és immuncitokémiai mérésekkel is igazolta, hogy egyes glióma sejtvonalak szintén termelik az AMPA receptorok GluA1 alegységét, aminek sejten belüli körforgását és a sejtfelszínen detektálható mennyiségét a PKD aktivitás is szabályozza. Szakdolgozat 2019 júniusában jeles eredménnyel védte meg.

2019 nyarától részben ezeket a megfigyeléseket folytatja Szentgyörgyi Viktória is: irányított mutagenézis segítségével olyan PKD mutáns konstrukciókat alakít ki, amelyek segítségével a PKD enzim működését irányító útvonalakat is vizsgálhatjuk. Az elmúlt évek kutatásai ugyanis feltárták, hogy a PKD molekulák N-terminálisán egy dimerizációért felelős, ún. ULD domén található. Az elképzelések szerint a plazmamembrán diacilglicerinjéhez kötődő PKD molekulák közötti dimerizáció is szükséges az enzim aktivációjához. A részben a német, részben a hazai laboratóriumokban jelenleg is folyamatban lévő munkák során azt vizsgáljuk, hogy a dimerizációban, illetve az enzimatis funkciókban gátolt pontmutánsok mennyire befolyásolják a GluA1 alegység sejtfelszíni mennyiségét, illetve a Golgi készülékről lefűződő és a plazmamembrán felé irányuló vezikulaszállítás. Ezek a kezdeti eredmények egy új, közös pályázat kiindulásaként is szolgálhatnak: ha hipotéziseinket igazolni tudjuk, akkor 2020-ban ezekre alapozva egy újabb közös kutatási pályázat benyújtását is tervezzük.

B. A közös projekt eredményei (max. 2 oldal)

A projekt két éve alatt a résztvevő hallgatók összesen **8 konferencia keretében 5 poszteren mutatták be eredményeiket és 6 alkalommal tartottak előadást** (ld részletezve). **Szereplésüket több alkalommal is díjazták. Két MSc dolgozat is elkészült, mindkettőt jeles eredménnyel védték meg. Egy közös összefoglaló cikkünk idén jelent meg, a PKD AMPA receptorokra gyakorolt hatását kísérletesen vizsgáló kéziratunk jelenleg elbírálás alatt áll, elfogadását követően egy újabb PhD dolgozat is védésre kerül.**

Közös eredményeink konferencián történő bemutatása:

1. 11th FENS Forum on Neuroscience, Berlin; Németország; 2018. június 7–11
 - Carlos O. Oueslati Morales, Norbert Bencsik, Attila Ignác, Zsófia Szíber, Katalin Schlett, Angelika Hausser: PKD as a novel regulator of AMPAR trafficking. poszter
 - Attila Ignác, Zsófia Szíber, Hanna Liliom, Carlos O. Oueslati Morales, Krisztián Tárnok, Angelika Hausser, Katalin Schlett: RIN1 regulates LTD-dependent AMPA receptor trafficking and actin dynamics in dendritic spines. poszter
2. Magyar Mikroszkópos Társaság Konferenciája, Siófok; 2018. május 24–26.
 - Ignác Attila, Stephan Eisler, Angelika Hausser, Schlett Katalin: A RIN1 kettős szerepe a dendrittűskékben. **Előadása a zsűri különdíját nyerte el**
3. Inst. Cell Biology and Immunology, 12th PhD Workshop on Molecular mechanisms and therapeutic approaches in cancer; Freudenstadt, 2018. szeptember 26–28.
 - Carlos O. Oueslati Morales: PKD-mediated regulation of AMPA receptor trafficking. előadás **Carlos Morales előadása a közönségsvavazatok alapján a második helyezést nyerte el.**
4. 3. HunDoc Konferencia, Debrecen, 2019. január 16.
 - Attila Ignác: PKD controls endocytotic AMPAR trafficking in the synaptic membrane. **kiemelt, meghívott előadás**
5. Magyar Idegtudomány Társaság 16. Konferenciája, Debrecen, 2019. január 17–18.
 - Attila Ignác, Carlos Omar Oueslati Morales, Zsófia Szíber, Abril Gaona Gamboa, Katalin Schlett, Angelika Hausser. PKD controls endocytotic AMPAR trafficking in the synaptic membrane. poszter
6. Cell biology of the neuron: polarity, plasticity and regeneration. EMBO Workshop, Heraklion, Görögország; 2019. május 7–10.
 - Ignác A, Szíber Z, Nagy-Herczeg D, Tárnok K, Hausser A, Schlett K. Dual activity of RIN1 regulates synaptic plasticity in dendritic spines. poszter **Az absztrakt alapján Ignác Attila az EMBO 1000 EUR utazási támogatásában részesült.**
 - Oueslati Morales CO, Ignác A, Szíber Z, Gamo A, Schlett K, Hausser A. PKD controls endocytic AMPAR trafficking in the synaptic membrane. poszter

7. Magyar Mikroszkópos Társaság Konferenciája, Siófok; 2019. május 23–25.

- Ignác A, Nagy–Herczeg Domonkos, Schlett K. Az aktin vázrendszer dinamikájának mérése élő idegsejtekben. előadás. **Ignác Attila előadása a zsűri különdíját nyerte el.**

8. Inst. Cell Biology and Immunology, 13th PhD Workshop on Molecular mechanisms and therapeutic approaches in cancer, Feldberg, 2019. szept. 30 – okt. 1.

- Ignác A: The dual role of RIN1 in dendritic spines. előadás **Ignác Attila előadása a közönségsvavazatok alapján az első helyezést nyerte el.**
- Oueslati Morales CO: PKD: a key regulator of AMPAR endocytosis and synaptic plasticity. előadás. **Carlos Morales előadása a közönségsvavazatok alapján a második helyezést nyerte el.**

Megvédett szakdolgozatok:

- Ignác Attila (2018) A RIN1 fehérje hatása a neuronok strukturális plaszticitására. ELTE TTK Biológus MSc, jeles eredmény
- Abril Magda Gamao Gamboa (2019) U87 human glioma cell line as a model to study AMPA receptor trafficking. ELTE TTK Biológus MSc, jeles eredmény

Elnyert díjak:

- Ignác Attila (2018) OTDK I. helyezés a Neurobiológia szekcióban.
- Szentgyörgyi Viktória (2018) Környezettudományi OTDK I. helyezés
- Ignác Attila: Nemzet Fiala Tehetségeiért Ösztöndíj (2018) NTP–NFTÖ–18–B–0045
- Ignác Attila: EMBO Workshop (2019) 1000 EUR utazási támogatás elnyerése (részvételi és utazási költségek)

Közös közlemények:

- Hausser A, Schlett K. (2019) Coordination of AMPA receptor trafficking by Rab small GTPases. *Small GTPases*. 10(6):419–432.
- Oueslati Morales CO, Ignác A, Szíber Z, Schlett K, Hausser A. PKD controls endocytic AMPAR trafficking in the synaptic membrane via regulating Rabaptin 5. *Mol. Cell. Biol.*, *elbírálás alatt*

C. Az együttműködés további szempontjai: (max. 3 oldal)

1. Mennyiben alapulnak a projekt elért eredményei a német–magyar együttműködésen?

A budapesti és a stuttgarti laboratóriumok között régóta fennálló, intenzív szakmai együttműködés folyik. 2008 óta – részben a már korábban is elnyert kutatócsere-programok támogatásával – már 7 német kolléga dolgozott Budapesten, Stuttgartban pedig 10 fiatal magyar kutató végzett ált. 1–2 hónapos kutatómunkát. 2009 óta 6 közös publikációnk jelent meg (ebből három 2017-ben) és 30-nál is több olyan konferencia-szereplésünk volt, ahol a közös munkára alapozott eredményeinket mutattuk be. A szenior résztvevők éves rövid látogatásai és a rendszeres konzultációk biztosítják a szakmai együttműködést, a közös pályázatok előkészítését és a publikációk megírását.

2. Hogyan befolyásolta a támogatás a projekt előmenetelét?

A megvalósult kutatócserek nemcsak a hallgatók képzését segítették elő, hanem fontos szakmai eredményekkel is szolgáltak (ld. az B pontban részletezve). Az éves rendszeres látogatások a projekt szakmai elősegítése mellett a német és magyar laboratóriumokban közel azonos módon kiépített mikroszkópos rendszerek technikai ellenőrzését és a kísérleti módszerek összehangolását is biztosítják.

3. Hogyan csatlakozott a második évi munka az első év eredményeihez?

A 2018-ban glioblasztóma sejtvonalakon elkezdett kutatómunka 2019-ben egy jeles eredménnyel megvédett szakdolgozatot eredményezett és új kutatási irányokat is inicializált. Természetesen az idegsejtek vizsgálatán alapuló kísérleteinket is folytattuk, eredményeinkről hallgatóink több konferencián is sikerrel számoltak be. Már elbírálás alatt áll egy újabb közös publikációnk, amely egy jövő tavaszra tervezett doktori dolgozat elkészítéséhez is szükséges.

4. Milyen szempontból volt jelentős a projekt a fiatal kutatók tapasztalatszerzése, szakmai fejlődése szempontjából?

Az elmúlt két évben három magyar MSc-s (egyikőjük már PhD) hallgató, a német partnertől pedig egy PhD hallgató használhatta ki a kutatócsere előnyeit. Mindannyiuk esetében igaz, hogy a partner laboratóriumban végzett munka jelentősen növelte szakmai tudásukat, önállóságukat és a kutatás iránti elköteleződésüket, így egyértelmű, hogy a kutatói pályán maradnak.

A budapesti laboratórium tagjaként **Ignác Attila** 2018-ban a Biológus OTDK I. helyezést ért el, kiváló eredménnyel megvédte MSc szakdolgozatát és az ELTE Biológia Doktori Iskola Idegtudományi programján belül megkezdte a PhD képzést. Egyetemi eredményei alapján elnyerte a Nemzeti Tehetség Program támogatását is. A projekt mindkét éve alatt 2–2 hónapot töltött el a német laboratóriumban, ez idő alatt a spinning disc mikroszkópos rendszerrel kapcsolatos ismereteit is elmélyítette. A hazai

laboratóriumban zajló élő sejtes mikroszkópos felvételek már elsősorban az ő irányítása alatt zajlanak. Eredményeivel több hazai és nemzetközi konferencián is elismerést vívott ki, első szerzős publikációját 2020 tavaszán tervezzük benyújtani.

Abril Magda Gamoa Gamboa mexikói diák a Stipendium Hungaricum program támogatásával tanult Magyarországon, képzését 2019-ben, jeles eredménnyel fejezte be. 2018 nyarán 2 hónapot töltött a stuttgarti laboratóriumban, az akkor elkezdett kísérletsorozatok a kutatócsoportjaink közötti együttműködésében újfajta megközelítési módot jelentenek. A hazai laboratóriumban befejezett szakdolgozatában sikerült igazolnia az AMPA receptorok jelenlétét és aktivitás-függő szabályozását glioblasztóma sejtvonalakban. Egyetemi tanulmányait követően az Erasmus Plus program támogatásával 6 hónapig Párizsban dolgozott, eredményeivel egy, az USA-ban folyó PhD képzést támogató ösztöndíj programba is bekerült.

Szentgyörgyi Viktória biológiai-kémia tanár szakos képzését 2019-ben kiváló eredménnyel fejezte be. Tanári tanulmányai mellett 2017 óta a kutatómunkába is bekapcsolódott, 2018-ban a Környezettudományi OTDK-n I. helyezést ért el. 2019 nyarán a stuttgarti laboratóriumban folytatta a tumorsejteken korábban végzett megfigyeléseket, kiegészítve ezeket a protein kináz D enzim pontmutációinak vizsgálatával is. Ezek a tapasztalatok világították meg igazán számára a kutatói pálya szépségét, így 2020 tavaszán ő is jelentkezik az Erasmus Plus programba, illetve azt követően a PhD képzésre. Tervei szerint a PhD megszerzését követően visszatér a tanári pályára, így a kutatási tapasztalatait a középiskolai képzésben, a kutatói utánpótlás nevelésében is kamatoztatni tudja majd.

Carlos Morales PhD hallgató a kutatócsere program támogatásával már többször járt Magyarországon, az idegsejt-tenyészetek készítéséhez szükséges gyakorlatot nálunk sajátította el. Rendszeres látogatásai, a folyamatos konzultációk és a magyar kutatók külföldi vendégújtjai is segítenek abban, hogy az élő idegsejteken végzett méréseket Stuttgartban is megfelelő módon tudja kivitelezni. Eredményeiről több konferencián is beszámolt, első szerzős publikációja jelenleg elbírálás alatt áll. Ennek elfogadását követően, várhatóan 2020 tavaszán nyújtja majd be doktori dolgozatát. Az elmúlt években magabiztos, önálló kutatóvá érett, posztdoktori kutatásokat tervez.

5. Sorolja fel azokat a hazai vagy külföldi tudományos közleményeket és publikációkat, amelyek az együttműködés eredményeként jelentek meg!

A közös kutatómunka nyomán 2009 óta kutatócsoportjainkban 6 közös tudományos közlemény, 5 PhD dolgozat, 10 MSc és 3 BSc szakdolgozat készült el. Az AMPA receptorok sejten belüli transzportját befolyásoló hatásokról írt közös összefoglaló közleményünk idén jelent meg. Egy beküldött kéziratunk jelenleg elbírálás alatt áll, ennek elfogadását követően, várhatóan 2020 tavaszán pedig egy újabb német PhD dolgozat kerül megvédésre. Az elmúlt 2 évben 2, a külföldi kutatócsere során elért eredményeket is tartalmazó MSc szakdolgozatot is jeles eredménnyel védtek meg hallgatónk.

- Hausser A, Schlett K. (2019) Coordination of AMPA receptor trafficking by Rab small GTPases. *Small GTPases*. 10(6):419–432.

- Carlos O. Oueslati Morales, Attila Ignácz, Zsófia Szíber, Katalin Schlett, Angelika Hausser: PKD controls endocytic AMPAR trafficking in the synaptic membrane via regulating Rabaptin 5. *Mol. Cell. Biol.*, *elbírálás alatt*
- Carlos Omar Oueslati Morales: Novel activity-dependent functions of PKD in neurons via regulating AMPA receptor endocytosis. PhD disszertáció – *tervezett benyújtás 2020 februárban*
- Ignácz Attila (2018) A RIN1 fehérje hatása a neuronok strukturális plaszticitására. ELTE TTK Biológus MSc, jeles eredmény
- Abril Magda Gamo Gamboa (2019) U87 human glioma cell line as a model to study AMPA receptor trafficking. ELTE TTK Biológus MSc, jeles eredmény

6. Milyen akadályokat vagy problémákat érzékelt a projekt végrehajtása során?

Problémákkal nem találkoztunk, minden a szokásos rendben zajlott.

7. Mi a legjelentősebb szakmai eredmény, amit kiemelne a projektegyüttműködés kapcsán?

A kutatócsere program keretében megszerzett technikai és kutatási tapasztalatok biztosították, hogy az ELTE 2017 végén Dr Schlett Katalin szakmai koordinálásával beszerzett, 230 millió Ft-os fénymikroszkópos központjában a spinning disc konfokális rendszer az élő sejtes mikroszkópos mérések kivitelezésére alkalmas legyen. A rendszerek működtetésével és a felhasználók kiképzésében is nagyon sokat jelent a Dr. Stephan Eisler-től, a Stuttgarteri Egyetem Központi Mikroszkópos Egységének vezetőjétől kapott segítség: budapesti rövid látogatásai során Dr Eisler segít a megfelelő kalibráló mérések és beállítások elvégzésében, másrészt a stuttgarteri laboratóriumba dolgozó magyar diákok mikroszkópos mérései során is pótolhatatlan segítséget nyújt. A Dr Angelika Hausserrel folytatott együttműködésünket évek óta erre a szakmai háttérre tudjuk építeni. A német kutatók szakmai kompetenciáját a 2018-ban a rangos *Elife* folyóiratban a PKD által befolyásolt molekuláris útvonala mikroszkópos elemzését taglaló közleményük is jelzi (*Elife*. 2018 Jul 20;7. pii: e35907.)

8. Van-e olyan javaslat, amivel módosítaná a pályázati felhívás és végrehajtás szempontjait a jövőre nézve?

Nincs.

Kelt: Budapest, 2019. december 2.


Dr. Schlett Katalin