

## Válasz Dr. Mihály József bírálatára

Szeretném megköszönni Dr. Mihály József tudományos főmunkatárs úrnak, hogy időt szakított értekezésem kritikus elolvasására és bírálatára. Gondolatébresztő kérdéseikért hálás vagyok, egyben nagyra értékelem, hogy az értekezésben előforduló formai és szerkesztési hibákra felhívta a figyelmemet. Sajnos egy ekkora mű összeállításakor és többszöri átolvasásakor is előfordulnak hibák, elütések, amelyek a szakavatott olvasónak feltűnnek, de a szerző már átsiklik felettük. Munkám méltatásáért pedig különösen hálás vagyok bírálómnak, szavai jelentős motivációt jelentenek ahhoz, hogy a jövőben is - a fiatal nemzedék bevonásával - folytassam elektronmikroszkópos kutatásaimat.

*A felvetett kérdésekre és észrevételekre az alábbiakban válaszolok.*

A bírálat formai részét érintő kritikáit elfogadom és azokkal messzemenőig egyet is értek. Az aktin sejtvázas szabályozásával kapcsolatos zavarónak ható egyes specifikusan is megemlített félrevezető kifejezésekért természetesen bírálóm elnézését és megértését kérem. Ezek előfordulása az értekezésben olyan okokra vezethető vissza, amelyek nehezen oldhatóak fel, mivel nem minden esetben találunk jól bejáratott gyakorlatot és szóhasználatot az angolszász kifejezések helyes magyar használatára. Mivel a szakmai nyelvünk alapvetően az angol, a magyar anyanyelvű kutatók szakmai előszavas eszmecseréje során is gyakran fordulnak elő olyan kifejezések vagy mondatok, amelyek egy doktori értekezésben természetesen nem elfogadhatóak. Mivel tudatos döntésem volt, hogy az értekezést magyar nyelven írom, ne pedig angolul, így sok esetben valóban legalábbis furcsának hangzó magyarra fordított kifejezések vagy leírások születtek, a legnagyobb erőfeszítéseim ellenére is. Ezek közé tartozik a *treadmilling vs. mozgólépcsőzés*, *feltételes mutagenézis vs. kondicionális mutáció*, de ide sorolom az *aktin szekvesztrálás vs. aktin szállítás*, illetve a *faktor/fehérje vs. enzim* párokat. Összességében elismerem, hogy - különösen a bírálóm által kifogásolt bekezdés alapján - a legjobb szándékom ellenére sem sikerült szakmai „nyelvújítási” kísérletem. Az egyetlen pont, ahol az általam ismert irodalom eltér bírálóm megjegyzésétől, az az Arp2/3 komplex *de novo* aktin-nukleációs képessége, hiszen sok, a témában megjelent cikk hivatkozik így a komplex működésére. Ezt a szóhasználatot mi is átvettük - néhány alábbi példát alább citálok:

„Once activated, Arp2/3 initiates the *de novo* actin filament growth off an existing actin filament, leading to the formation of branched actin structures”. (Spence et al., 2016)

„The Arp2/3 complex nucleates new actin polymers as a branch of pre-existing filaments at an angle of 70°.” (Okabe, 2020)

„Key steps in regulating actin dynamics are the *de novo* nucleation and elongation of actin filaments, which can be catalysed by a limited number of proteins and protein complexes. Among these, Arp2/3 complex and formins are the best studied.” (Stradal & Scita, 2006)

1. A jelölt azt írja, hogy méréseik alapján „a dynamin-3 324±32 nm átlagos távolságra található a PSD-től, majd alább azt konkludálja, hogy „Tehát a dynamin-3 megfelelő szubcelluláris elhelyezkedéssel rendelkezik ahhoz, hogy a PSD-t és az EZ-t összekapcsolja.”. Az említett 324 nm-es távolság azonban jóval nagyobb egy fehérje átlagos méreténél. Hogyan képzeljük el ezt az összekötő funkciót? Ez a feltételezett linker funkció hogyan viszonyul a Dynamin fehérje család membrán-lefűződésekhez kötött jól ismert funkciójához?

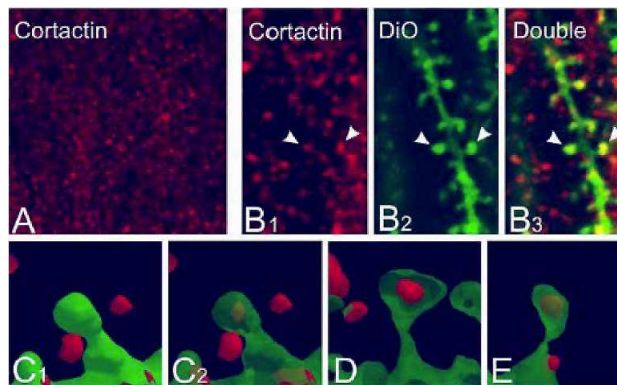
A Dynamin GTPáz fehérjecsalád egyik legismertebb funkciója valóban a membrán-lefűződésekhez kapcsolódik. Számos tanulmány felhívta a figyelmet a Dynamin szerepére ezen „lefűző” funkción túl is, hiszen a membrán dinamikáját és a citoskeletális reorganizációt koordináló „állványzatként”

funkcionál számos szubcelluláris területen, mint pl. a sejtek aktinban gazdag régióiban, beleértve a membránfodrokat, a podoszómákat, az aktin „üstökösöket” (*actin comet*), a mitotikus osztódási barázdákat vagy éppen az axon növekedési kúpokat. Míg a Dynamín-1 és -2 alapvető szerepet játszik az endocitózis során az előbb említett membránlefűződésben, addig a Dynamín-3 esetében figyelemre méltó, hogy ez az egyetlen ismert Dynamín izoforma, amely a posztszinaptikus adaptor Homer-hez kötődik (Gray *et al.*, 2003), ami potenciálisan összekapcsolja a Dynamín-3-at a PSD állványzatával. A PSD-t az EZ-vel összekapcsoló molekula számára szükséges, hogy képes legyen kapcsolódni mind a posztszinaptikus állványzat komponenseivel, mind pedig az endocitotikus apparátus szerző-fehérjével, a Dynamín-3 esetében pedig ez a tulajdonság (képesség) megvan. Az adott kísérletben kollégáim molekuláris biológiai módszereket alkalmazó *in vitro* hippokampális neuronok tüskéiben megállapították, hogy az EZ-nek a PSD oldalsó szélére (peremére) történő lokalizációjához a Shank, a Homer és a Dynamín-3 között létrejövő fehérje-fehérje kapcsolat lineáris szekvenciája szükséges. Ennek a komplexnek a megszakítása az endocitotikus gépezetnek a PSD-től való fizikai leválasztásához vezet, amely paradox módon az AMPA receptorok mennyiségének csökkenéséhez vezet a szinapszisban. Természetesen ez a három molekula együtt sem tartozik az említett ~300nm-es mérettartományba, de az immungold jelölés esetében ez csupán egy átlagos szemcsetávolságot jelöl, különböző méretű tüstékben, és az adatok tüskemérettől független normalizálása után kapott lokalizáció azt mutatja (12. B ábra), hogy a Dynamín-3 magas koncentrációban van jelen a PSD peremétől egészen az EZ területéig. Az EZ szinapszishoz kapcsoltsága lehetővé teszi az endocitózis és az receptor-újrahasznosítás (*recycling*) helyi ciklusát, amely fenntartja a szinaptikus AMPA-receptorok mennyiségét a PSD fehérjemátrixában. Az EZ-t nem tartalmazó tüskék esetében megfigyeltük, hogy a PSD-ből felszabaduló AMPA-receptorok a szinapszistól távolabb képesek diffundálni, hogy aztán a szinapszistól távol, az EZ-n kívül internalizálódjanak, azonban így a helyi ciklikusság hiánya megakadályozza a receptorok visszajutását a szinapszisba, ami az AMPA-receptorok csökkenéséhez vezet. Vagyis a Dynamín-3 a szinaptikus Shank és Homer állványzatfehérjék közreműködésével szabályozza az AMPA receptorok diffúzióját, endocitózisát és újrahasznosítását, továbbá inzerzióját a tüske membránba. Összefoglalva tehát, a Homer-Dynamín-3 komplex a laterális tüske membránjára lokalizálódik, és eloszlása kiterjed a PSD-re és az EZ-re. Továbbá, a Dyn3-Homer kölcsönhatás szelektív megszakítása vagy az endogén Dynamín-3 kiütése az EZ fizikai eltűnéséhez vezet a laterális tüske doménekből. A Homer-Shank kapcsolódásból kiinduló fehérje kölcsönhatások a tüske periferiáján vagy távolabbi "területein" lévő membránszerveződés általános jellemzői lehetnek (Lu *et al.*, 2007).

*2. A Cortactin fehérje szinaptikus eloszlásának vizsgálata azszal a konklúzióval zárult, hogy a hippokampális dendrit tüskéikben a tüske centrális részében halmozódik fel, míg a kisagyi Purkinje sejtekben inkább a tüske „bájban”, egy jóval kortikálisabb területen. Mi lehet ennek a különbségnek a hátterében? A Cortactin, ahogy neve is mutatja, a nem-neuronális sejtekben főleg a sejtmembrán közeli területeken halmozódik fel, ami többé-kevésbé egybevág a PC sejtekben kapott eredményekkel. Van-e Cortactin lokalizációs adat egyéb idegsejtekben is? Meg van-e erősítve független módszerekkel, pl. szuperrezolúciós mikroszkópiával a Cortactin lokalizációja a hippokampális dendrit tüskéikben?*

A cortactin fehérje kronológiai sorrendben az első olyan ABP volt, amelyet azért kezdtünk vizsgálni, mert a clathrin burkos membrángödrök területén kimutatták, és ismert szerepe van a receptor-mediált endocitózisban (Cao *et al.*, 2003). Mi is meglepődtünk, amikor azt láttuk, hogy a várható,

elsősorban membrán asszociált lokalizáció helyett centrálisan helyezkedik el a hippocampális dendrittüskékben. Elektronmikroszkópos eredményeinket – mivel először vizsgáltunk nem kifejezetten endocitotikus fehérjét – mi is szeretnénk volna megerősíteni más módszerekkel, így konfokális lézerszenking mikroszkópos sorozat felvételeket készítettünk cortactin immunfestett hippocampális metszetekről, amelyeken DiO lipofil festékkel jelenítettük meg a pyramissejt dendritek membránját, majd az így kapott fluoreszcens képsorozatokat képanalizáló szoftverrel (ImageSurfer, (Feng *et al.*, 2007)) feldolgoztunk a kapott adatokat. A cortactin pozícióját így is centrális elhelyezkedésűnek találtuk, amely alátámasztotta az elektronmikroszkópos kvantitatív analízis során kapott eredményeinket:



**Cortactin (piros) immunfestés és DiO (zöld) membránfestés CA1 str. radiatum pyramisetteseken.** A C<sub>1,2</sub> és D, E ábrák a konfokális felvételek ImageSurfer programmal feldolgozott 3D vizualizációját mutatja, három reprezentatív dendrittüske esetében. Jól megfigyelhető a Cortactin tüskéfej-középponti lokalizációja ezekben a tüskékben. Saját felvételek.

3. A Cortactin fehérjénél maradván, ismert, hogy ez a fehérje az Arp2/3 komplex egyik fontos aktivátora. Meglepő módon a hippocampális dendrit tüskékben a Cortactin és az ARPC2 fehérje lokalizációja szignifikánsan eltér egymástól. Mi ennek a magyarázata? Elképzelhető, hogy a centrálisan felhalmozódó Cortactin nem járul hozzá az Arp2/3 aktivációhoz a tüskékben?

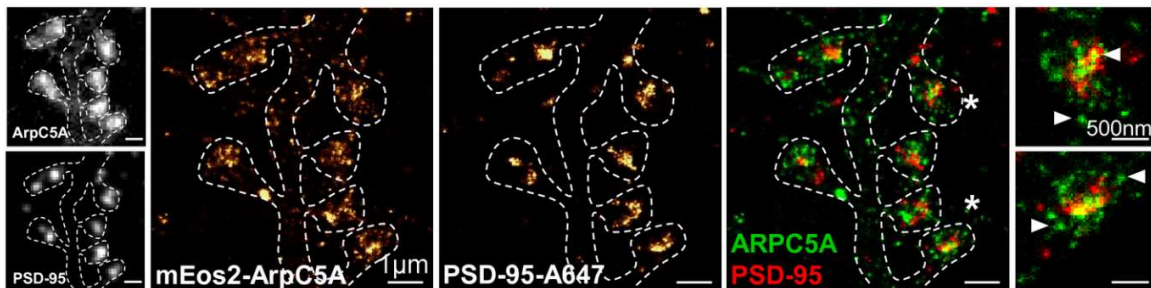
Mivel ezzel kapcsolatban kevés tudományos eredmény látott napvilágot, nagyrészt közvetett magyarázatot lehet adni erre a kérdésre. A hippocampális pyramisettesek tüskéi és a kisgyi Purkinje sejtek (PC) tüskéi alapvetően eltérnek egymástól, mind molekuláris, mind morfológiai, mind pedig „plaszticitásbeli” tulajdonságaik alapján. A tartós szinaptikus hatékonyságnövekedés (LTP), a hippocampális szinapszisok esetében, NMDA receptor-függő (Lynch, 2004). A PC-k poszt-szinaptikus denzitásai (PSD) azonban nagyon kevés NMDAR-ral rendelkeznek, viszont magas mGluR1 szintet detektálhatunk (Ryo *et al.*, 1993). A kisgyi tanulás mohartostoktól és a PC tüskéire érkező jelek időbeli párosításából és a kapcsolódó kúszórostok aktiválásából ered, ami LTD-t eredményez a parallel rost (PF)-PC szinapszisaiban. Ez a mechanizmus teljesen különbözik pl. a hippocampális szinaptikus plaszticitástól. Érdekes módon a PF-PC szinapszis poszt-szinaptikusan képes LTP-t indukálni, de ennek a kisgyi LTP-nek az indukciója fehérje-foszfatazoktól függ, nem pedig kinázoktól - éppen az előgyi szinapszisokban megfigyelt szinaptikus plaszticitás követelményeinek az ellenkezője (Belmeguenai & Hansel, 2005; Jorntell & Hansel, 2006; Grasselli & Hansel, 2014; Romano *et al.*, 2018). Vagyis mind a szinaptikus plaszticitás molekuláris mechanizmusa, mind pedig a szinapszisban előforduló glutamát receptorok összetétele eltér, így feltételezhető, hogy az aktin-szignalizáció mechanizmusa – és ezzel párhuzamosan az aktin szabályozó fehérjék térbeli eloszlása is – különbözik.

Valóban a Cortactin hozzájárul az Arp2/3 aktiválásához, de az Arp2/3 stabilizálását is ellátja az elágazásokban. A Cortactin Arp2/3-függő funkcióinak pontos molekuláris mechanizmusai továbbra sem ismertek minden részletében. Leírták, hogy a Cortactin önmagában csak viszonylag gyengén aktiválja az Arp2/3 komplexet, azonban más nukleációs faktorokkal együtt (pl. N-WASP), szinergista hatás révén már erőteljes aktivációt fejt ki a komplexre (Helgeson & Nolen, 2013; Helgeson *et al.*, 2014). Ugyanakkor Arp2/3-függő módon, Cortactin hiányában is ki tud alakulni aktin hálózat, továbbá a Cortactin Arp2/3-tól függetlenül is képes dinamikusan szabályozni az aktin hálózatot (Lai *et al.*, 2009), ami arra utal, hogy a Cortactin szerepe inkább az aktin citoskeleton finomhangolásában van (Cornelius *et al.*, 2021).

Végül, ami rávilágíthat a hippocampális és kisagyi tüskeszínapszisokban megfigyelhető eltérő lokalizációra az az, hogy a Cortactin eloszlását alapvetően befolyásolja neuronális aktivitás: az NMDA-receptorok aktivációja Src-függő Cortactin-foszforilációt és transzlokációt indukál a tüskéből a dendritekbe, míg a BDNF a Cortactin ERK-függő foszforilációját indukálja, ami a dendritekből a tüskékbe történő redisztribúcióját eredményezi (Iki *et al.*, 2005) – legalábbis hippocampális tüskeszínapszisokban. Tekintve, hogy a kisagyi PF-PC tüskeszínapszisok NMDA receptorszáma jelentősen alacsonyabb a Schaffer kollaterálisok tüskeszínapszisaihoz képest, elképzelhető, hogy más kölcsönhatás alakul ki a Cortactin és az Arp2/3 komplex között.

4. Az Arp2/3 nukleációs faktor valójában egy 7 alegységből álló fehérje komplex. A jelölt a komplex egyetlen alegységére mutatott be fehérje lokalizációs adatokat, de felmerül a kérdés, hogy ismertté vált-e azóta a komplex többi tagjának a szinaptikus lokalizációja, és ha igen, összhangban vannak-e az új adatok az ARPC2-es adatokkal?

Az Arp2/3 komplex valóban hét alegységből áll (Arp2, Arp3, ArpC1, ArpC2, ArpC3, ArpC4 és ArpC5), aktivált állapotba pedig olyan fehérjék hozzák ezt a multimert, mint például az általunk vizsgált WAVE család fehérjei, amelyek a Rac kis GTPázok (Rho GTPáz családba tartozó enzimek) kontrollja alatt állnak. Az egyes alegységek előfordulásáról, különösen szinaptikus lokalizációjáról viszonylag kevés új információ derült ki az utóbbi években, bizonyos alegységek (pl. ArpC4) központi idegrendszeri lokalizációját vizsgáló publikációt például nem is találni. Azonban egy elegáns, szuperrezolúciós vizsgálat (Chazeau *et al.*, 2014), az ArpC5 alegységet – igaz *in vitro* hippocampális neuronokban – szintén jórészt a tüske centrális, gyűrűszerű területén ill. PSD-hez közeli doménjében lokalizálták, amely hasonló ahhoz, amit mi is leírtunk:



Kétszínű, szuperrezolúciós képek szekvenciális PALM és dSTORM alkalmazásával (Chazeau *et al.*, 2014). Az ArpC5 alegység szuperrezolúciós megjelenítése zöld, míg a PSD-95 piros. Jól megfigyelhető az ArpC5 gyűrűszerű eloszlása a tüskékben.

Így nincs okunk feltételezni, hogy a hét alegység bármelyike az általunk és mások által leírtól eltérő eloszlást mutatna. Az is ismert, hogy ha pl. az ArpC3 alegység működése esik ki a komplexből - és a

multimer komplex így működésképtelenné válik - akkor jelentős és nagymértékű negatív változások következnek be a tüskék morfológiájában (Kim *et al.*, 2013). Továbbá arra is fény derült, hogy az Arp2/3 komplex megfelelő működése elengedhetetlen és szükséges mind a filopódiumok érett, fejletlen tüskékké alakulásához, mind pedig az AMPA-típusú glutamát receptorok szinapszisba jutásához, ami egy kritikus lépés az aktív tüskeszinapszisok létrejöttéhez. Ezek az eredmények mind arra utalnak, hogy igen szoros kölcsönhatás van az Arp2/3 aktivitás modulációja és a funkcionálisan és szerkezetileg érett tüskék kialakulása között (Spence *et al.*, 2016).

*5. A WAVE-1 KO egerek idegsejtjeiben a vad típustól jelentősen eltérő morfológiát mutatnak a tüskék, ami az aktin sejtvázs szabályozás hibájára vezethető vissza. Vizsgálták-e az aktin sejtvázs szerveződését ezekben a KO mutánsokban? Detektálható-e érdemi változás pl. a fentebb is említett szuperrezolúciós módszerekkel?*

A WAVE-1 KO egerek hippokampális dendrittüskéiben az aktin sejtvázs szerveződését mi nem vizsgáltuk. Molekuláris biológiai módszerekkel, elsősorban *in vitro* hippokampális ill. striatalis neuronokban tanulmányozták a WAVE-1 szerepét, amelyekben megállapították, hogy a WAVE-1 szignalizációs hibák az általunk detektált elváltozásokhoz hasonló morfológiát okoznak a tüskeszinapszisokban (Kim *et al.*, 2006; Soderling *et al.*, 2007). Továbbá kisagyi Purkinje sejtek tüskéiben mutatták ki a WAVE-1 fehérjét (ultrastrukturális módszerrel is), ahol egy neuronálisan expresszálódó, nem hagyományos myozin, a myosin XVI szabályozza a tüskéváz működését és szerveződését a WAVE-1 – Arp2/3 szabályozó komplexeken keresztül (Roesler *et al.*, 2019). Továbbá azt is megállapították, hogy a WAVE-1 feltehetően szerepet játszik a PSD közelében az Arp2/3-függő aktin elongációban és aktin remodellingben. Így valószínűsíthető, hogy a tüskék morfológiájának változása az elágazó F-aktin szabályozók, például a WAVE – Arp2/3 komplex tartós vagy átmeneti nanoszintű relokációján alapulhat, ami a teljes tüske váz-szerkezet átalakulásához vezet.

*6. Az előző kérdéshez kapcsolódva, mi a tudomány jelenlegi álláspontja az aktin sejtvázs szerveződéséről és funkcionális doménjeiről a tüskeszinapszisokban? Változott-e, finomodott-e esetleg ez a kép a manapság divatos nagyfelbontású képalkotó módszereknek köszönhetően a dolgozatban bemutatott eredmények publikálása, illetve a dolgozat megírása óta?*

A tüskeszinapszisok szerkezeti változásai az aktin filamentumok dinamikus reorganizációját igénylik. Az aktin filamentumok nukleációjának helye, az új aktin monomerek hozzáadása az aktin filamentumok végeihez, az aktin filamentumok depolimerizációja olyan alapvető biokémiai folyamatok, amelyek meghatározzák az aktin hálózat dinamikáját a dendrittüskéken belül. Mivel a tüskék szubmikrométerű struktúrák, az aktin össze- és szétszerelődésének pontos meghatározása nem triviális feladat. Talán pont ezért, nagy erőfeszítések történnek, hogy a dendrittüskékben zajló morfológiai változások alapjául szolgáló aktin citoskeleton felépítését és működését jobban megértsük. Ehhez valóban elengedhetetlenek azok a modern, nagyfelbontású fény- és elektronmikroszkópos módszerek, amelyek betekintést engednek, akár működés közben is, ezen femtoliter térfogatú neuronális kompartmentekbe. A korábbi kérdésekre adott válaszomban már hivatkoztam olyan szuperrezolúciós vizsgálatokra, amelyek élő sejtekben tudták vizsgálni az aktin-átrendeződést és megfigyelni az egyes szabályozó fehérjék szerepét a morfológiai plaszticitás során (Chazeau *et al.*, 2014). Azonban a szuperrezolúciósnak hívtott mikroszkópos technikák számos tagadhatatlan előnyük ellenére (pl. élő és manipulált sejtek *in vitro* vagy akár *in vivo* vizsgálata) töredékes betekintést adnak a tüskék szubcelluláris molekuláris szerveződésébe. El kell azonban

ismerni, hogy ezekkel a nanoszkópos technikákkal (STORM, STED, RESOLFT, SSIM, PALM) (Testa *et al.*, 2012) óriási lépést tett a tudomány ezen szinapszisok megértése és részletes morfo-funkcionális megismerése felé, amelyet az elektronmikroszkópos kutatások a nagyságrenddel jobb felbontás ellenére sem képesek elérni. Egy nemrég megjelent összefoglaló elegánsan mutatja be, hogy ezen technikák felhasználásával is összességében arra következtetésre jutathatunk, hogy az aktin citoszkeleton a tüskékben térben rendkívüli módon rendezett, szabályozott és kompartmentalizált (Okabe, 2020).

Az elmúlt évtizedben szintén intenzíven kutatták a szinaptikus aktin citoszkeleton szerepét tanulás és memóriafolyamatok során is. Arra a megállapításra jutottak, hogy az aktin citoszkeleton és annak szabályozó fehérjéi, amelyek részt vesznek a tüske morfológiájának a tanulás által kiváltott kezdeti változásában, a tüskék szerkezeti stabilizációjához is elengedhetetlenek, amelyek végső soron hozzájárulnak a tartós memória kialakulásához. Ebben a modellben a glutamátreceptorok és más szinaptikus receptorok aktiválása a tanulás során új aktin citoszkeletonális váz létrehozásához vezet, ami a tüskék morfológiájának megváltozásához és a memória kialakulásához vezet. Ez az új aktin citoszkeletonális állványzat az aktin és szabályozó fehérjéinek forgalmán és dinamikáján túl, az aktin szabályozó fehérjék szintjének és aktivitásának aktív stabilizálásával marad fenn ezekben a tüskékben (Basu & Lamprecht, 2018).

Természetesen az elektronmikroszkópia is fejlődött, nem csak a szuperrezolúciós „nanoszkópia”. A legújabb módszerek, amelyek fejlett szövetelőkészítő módszereket kombinálnak többretegű sorozatmetszeti elektronmikroszkópos (EM) tomográfiával és ezek számítógépes elemzésével, nanométeres felbontásban tudják már feltárni a dendrittüskék teljes háromdimenziós (3D) belső architektúráját agyi szövetmintákon. Ezzel a módszerrel lehetővé vált a hippokampusz (CA1) piramissejtjeit és a kisagyi Purkinje-sejteket az aktin filamentumok eloszlását és szerveződését, a filamentumok elágazási szögeit és abszolút orientációit, valamint e hálózat által alkotott elemi hurkokat a nanométeres tartományban vizsgálni. Érdekes módon, azt találták, hogy a tüskék közötti, valamint a tüskefej és -nyak közötti alaki és méretbeli különbségek ellenére az aktin hálózat belső szerveződése mindkét neuron-típusban figyelemre méltóan hasonló volt, és nagyrészt homogén volt a tüske teljes térfogatában. Az erősen elágazó és összekapcsolt filamentumok hálózatában az elágazások nem mutattak preferált orientációt, kivéve a sejtmembrán közvetlen közelében, vagyis valamiféle térbeli szegregációt ezzel a módszerrel is mutat a tüskeváz (Eberhardt *et al.*, 2022). Mínezen új eredmények tükrében a cikk szerzői ugyanakkor elismerik, hogy a tüskeváz aktinhálózata és a hozzá kapcsolódó kötőfehérjék lényeges mechanikai tulajdonságai és szerveződési alapelvei továbbra is alig ismertek. Így a molekuláris események pontos sorrendje és szerveződése, amelyek a tüskéken belüli aktin szabályozók átrendeződéséhez vezetnek a szinaptikus plaszticitás vagy egyes neurológiai rendellenességek esetében, továbbra is nyitott kérdés marad. Sok izgalmas felfedezést tartogat a közeljövő ebből a szempontból.

Végezetül szeretném hálásan megköszönni Dr. Mihály Józsefnek a bírálat elkészítésébe fektetett gondos munkáját, gondolatébresztő kérdéseit és hogy az értekezés bírálatában méltatta a kutatási téma fontosságát. Bízom abban, hogy elfogadja válaszaimat s továbbra is támogatja a nyilvános vitára bocsátást és sikeres védés esetén az MTA doktora cím odaítélését.



Kelt: Budapest, 2024 január 9.

## A bírálatra adott válaszban hivatkozott irodalom:

- Basu, S. & Lamprecht, R. (2018) The Role of Actin Cytoskeleton in Dendritic Spines in the Maintenance of Long-Term Memory. *Frontiers in molecular neuroscience*, **11**, 143.
- Belmeguenai, A. & Hansel, C. (2005) A role for protein phosphatases 1, 2A, and 2B in cerebellar long-term potentiation. *J Neurosci*, **25**, 10768-10772.
- Cao, H., Orth, J.D., Chen, J., Weller, S.G., Heuser, J.E. & McNiven, M.A. (2003) Cortactin is a component of clathrin-coated pits and participates in receptor-mediated endocytosis. *Mol Cell Biol*, **23**, 2162-2170.
- Chazeau, A., Mehidi, A., Nair, D., Gautier, J.J., Leduc, C., Chamma, I., Kage, F., Kechkar, A., Thoumine, O., Rottner, K., Choquet, D., Gautreau, A., Sibarita, J.B. & Giannone, G. (2014) Nanoscale segregation of actin nucleation and elongation factors determines dendritic spine protrusion. *EMBO J*, **33**, 2745-2764.
- Cornelius, J., Rottner, K., Korte, M. & Michaelsen-Preusse, K. (2021) Cortactin Contributes to Activity-Dependent Modulation of Spine Actin Dynamics and Spatial Memory Formation. *Cells*, **10**.
- Eberhardt, F., Bushong, E.A., Phan, S., Peltier, S., Monteagudo-Mesas, P., Weinkauff, T., Herz, A.V.M., Stemmler, M. & Ellisman, M. (2022) A Uniform and Isotropic Cytoskeletal Tiling Fills Dendritic Spines. *eNeuro*, **9**.
- Feng, D., Marshburn, D., Jen, D., Weinberg, R.J., Taylor, R.M., 2nd & Burette, A. (2007) Stepping into the third dimension. *J Neurosci*, **27**, 12757-12760.
- Grasselli, G. & Hansel, C. (2014) Cerebellar long-term potentiation: cellular mechanisms and role in learning. *International review of neurobiology*, **117**, 39-51.
- Gray, N.W., Fourgeaud, L., Huang, B., Chen, J., Cao, H., Oswald, B.J., Hemar, A. & McNiven, M.A. (2003) Dynamin 3 is a component of the postsynapse, where it interacts with mGluR5 and Homer. *Curr Biol*, **13**, 510-515.
- Helgeson, L.A. & Nolen, B.J. (2013) Mechanism of synergistic activation of Arp2/3 complex by cortactin and N-WASP. *Elife*, **2**, e00884.
- Helgeson, L.A., Prendergast, J.G., Wagner, A.R., Rodnick-Smith, M. & Nolen, B.J. (2014) Interactions with actin monomers, actin filaments, and Arp2/3 complex define the roles of WASP family proteins and cortactin in coordinately regulating branched actin networks. *J Biol Chem*, **289**, 28856-28869.
- Iki, J., Inoue, A., Bito, H. & Okabe, S. (2005) Bi-directional regulation of postsynaptic cortactin distribution by BDNF and NMDA receptor activity. *Eur J Neurosci*, **22**, 2985-2994.
- Jorntell, H. & Hansel, C. (2006) Synaptic memories upside down: bidirectional plasticity at cerebellar parallel fiber-Purkinje cell synapses. *Neuron*, **52**, 227-238.
- Kim, I.H., Racz, B., Wang, H., Burianek, L., Weinberg, R., Yasuda, R., Wetsel, W.C. & Soderling, S.H. (2013) Disruption of Arp2/3 results in asymmetric structural plasticity of dendritic spines and progressive synaptic and behavioral abnormalities. *J Neurosci*, **33**, 6081-6092.

- Kim, Y., Sung, J.Y., Ceglia, I., Lee, K.W., Ahn, J.H., Halford, J.M., Kim, A.M., Kwak, S.P., Park, J.B., Ho Ryu, S., Schenck, A., Bardoni, B., Scott, J.D., Nairn, A.C. & Greengard, P. (2006) Phosphorylation of WAVE1 regulates actin polymerization and dendritic spine morphology. *Nature*, **442**, 814-817.
- Lai, F.P., Szczodrak, M., Oelkers, J.M., Ladwein, M., Acconcia, F., Benesch, S., Auinger, S., Faix, J., Small, J.V., Polo, S., Stradal, T.E. & Rottner, K. (2009) Cortactin promotes migration and platelet-derived growth factor-induced actin reorganization by signaling to Rho-GTPases. *Mol Biol Cell*, **20**, 3209-3223.
- Lu, J., Helton, T.D., Blanpied, T.A., Racz, B., Newpher, T.M., Weinberg, R.J. & Ehlers, M.D. (2007) Postsynaptic positioning of endocytic zones and AMPA receptor cycling by physical coupling of dynamin-3 to Homer. *Neuron*, **55**, 874-889.
- Lynch, M.A. (2004) Long-term potentiation and memory. *Physiological reviews*, **84**, 87-136.
- Okabe, S. (2020) Regulation of actin dynamics in dendritic spines: Nanostructure, molecular mobility, and signaling mechanisms. *Mol Cell Neurosci*, **109**, 103564.
- Roesler, M.K., Lombino, F.L., Freitag, S., Schweizer, M., Hermans-Borgmeyer, I., Schwarz, J.R., Kneussel, M. & Wagner, W. (2019) Myosin XVI Regulates Actin Cytoskeleton Dynamics in Dendritic Spines of Purkinje Cells and Affects Presynaptic Organization. *Frontiers in cellular neuroscience*, **13**, 330.
- Romano, V., De Propriis, L., Bosman, L.W., Warnaar, P., Ten Brinke, M.M., Lindeman, S., Ju, C., Velauthapillai, A., Spanke, J.K., Middendorp Guerra, E., Hoogland, T.M., Negrello, M., D'Angelo, E. & De Zeeuw, C.I. (2018) Potentiation of cerebellar Purkinje cells facilitates whisker reflex adaptation through increased simple spike activity. *Elife*, **7**.
- Ryo, Y., Miyawaki, A., Furuichi, T. & Mikoshiba, K. (1993) Expression of the metabotropic glutamate receptor mGluR1 alpha and the ionotropic glutamate receptor GluR1 in the brain during the postnatal development of normal mouse and in the cerebellum from mutant mice. *Journal of neuroscience research*, **36**, 19-32.
- Soderling, S.H., Guire, E.S., Kaeck, S., White, J., Zhang, F., Schutz, K., Langeberg, L.K., Banker, G., Raber, J. & Scott, J.D. (2007) A WAVE-1 and WRP signaling complex regulates spine density, synaptic plasticity, and memory. *J Neurosci*, **27**, 355-365.
- Spence, E.F., Kanak, D.J., Carlson, B.R. & Soderling, S.H. (2016) The Arp2/3 Complex Is Essential for Distinct Stages of Spine Synapse Maturation, Including Synapse Unsilencing. *J Neurosci*, **36**, 9696-9709.
- Stradal, T.E. & Scita, G. (2006) Protein complexes regulating Arp2/3-mediated actin assembly. *Curr Opin Cell Biol*, **18**, 4-10.
- Testa, I., Urban, N.T., Jakobs, S., Eggeling, C., Willig, K.I. & Hell, S.W. (2012) Nanoscopy of living brain slices with low light levels. *Neuron*, **75**, 992-1000.