

SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

2544.

HEVESI ZSÓFIA

Neuromorfológia és sejtbiológia
című program

Programvezető: Dr. Alpár Alán, egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Alpár Alán, egyetemi tanár

A secretagodin fehérje eloszlása és szerepe emlős amygdalában

Doktori értekezés

Hevesi Zsófia

Semmelweis Egyetem
Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Alpár Alán, DSc, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Katona István, DSc, tudományos tanácsadó
Dr. Kovács Tibor, PhD, egyetemi docens

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Dobolyi Árpád, DSc, tudományos tanácsadó

Tagok: Dr. Csillag András, DSc, professor emeritus

Dr. Hájos Norbert, DSc, tudományos tanácsadó

Budapest
2021

Tartalom

1. Bevezetés	6
1.1 Az intracelluláris kalcium-körforgás	6
1.2 A kalcium-kötő fehérjék általános jellemzése	8
1.3 Új kalcium-szenzor fehérje: secretagogin.....	11
1.4 Az amygdala anatómiája.....	13
1.5 Az amygdala kapcsolatrendszere	16
1.6 Az amygdalában előforduló sejttípusok.....	17
1.7 A centromediális magcsoport jellemző sajátosságai.....	18
1.8 Az amygdala központi szerepe a viselkedésben	20
1.9 A félelem-kondicionálás folyamata	22
1.10 Az amygdala neuropatológiája	25
2. Célkitűzések	27
3. Anyag és módszer.....	28
3.1 Kísérleti állatok.....	28
3.2 Műtétek	29
3.3 Metszetek készítése.....	30
3.4 Immunfestések	31
3.5 Western blot analízis.....	34
3.6 Sejtfrakcionálás.....	35
3.7 Immunprecipitáció	36
3.8 Viselkedés kísérletek	37
3.9 <i>In vitro</i> módszerek	39
3.10 FRAP (fluorescence recovery after photobleaching).....	41
3.11 Humán minták.....	42
3.12 Képpalkotás, kvantitatív analízis	43

4. Eredmények	45
4.1 A secretagoin-tartalmú neuronok morfológiája, és eloszlása az amygdala komplex különböző aegységeiben	45
4.2. A secretagoin-pozitív idegsejtek interneuron-jellegének meghatározása.....	48
4.3. A secretagoin intracelluláris lokalizációjának vizsgálata	52
4.4 A secretagoin viselkedésbiológiai szerepének vizsgálata.....	57
4.5 A secretagoin fehérje NMDA receptorra kifejtett hatása	61
4.6 A secretagoin szerepe a stresszválaszban	67
4.7 Secretagoin-tartalmú neuroncsoport azonosítása, és szerepe egér centrolaterális amygdalájában	70
4.8 A secretagoin fehérje előfordulása és funkciója az ember amygdalájában	73
5. Megbeszélés	77
5.1 A secretagoin-tartalmú idegsejtek az emlős amygdalában az interneuronok egy csoportját jelölik	77
5.2 A secretagoin fehérje leginkább az amygdaláris neuronok posztszinaptikus termináisaiban fordul elő	79
5.3 A secretagoin szerepe az NMDA receptor aktivációjában	80
5.4 A centrolaterális amygdalában található secretagoin-tartalmú gátló neuroncsoport szabályozza a viselkedési válaszokat kondicionált stressz során.....	82
6. Következtetések.....	84
7. Összefoglalás.....	85
8. Summary.....	86
9. Irodalomjegyzék	87
10. Saját publikációk jegyzéke	98
A disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények	99
11. Köszönetnyilvánítás	100

Rövidítések jegyzéke

aCSF – mesterséges agy-gerincvelői folyadék (artificial cerebrospinal fluid)

ax - axon

BAC – bakteriális mesterséges kromoszóma (bacterial artificial chromosome)

BDA – biotinilált dextrán amin

BLA – bazolaterális amygdala

BMA – bazomediális amygdala

BNST – bed nucleus of stria terminalis

BSA – marha szérum albumin (bovine serum albumin)

CB - calbindin

CeL – centrolaterális amygdala

CeM – centromediális amygdala

CNO – clozapine N-oxide

CR – calretinin

Cre – carbapenem-resistant Enterobacteriaceae

CRH – kortikotropin-rilízing hormon

d - dendrit

DAB – 3,3'-diaminobenzidine

DMEM – Dulbecco's modified eagle medium

DNS – dezoxiribonukleinsav

DREADD – designer receptors exclusively activated by designer drugs

ER – endoplazmás retikulum

ERK – extracellular signal-regulated kinase

FBS – fetális marha szérum (fetal bovine serum)

FRAP – fluorescence recovery after photobleaching

GABA – gamma-aminovajsav (gamma-aminobutyric-acid)

GFP – zöld fluoreszcens fehérje (green fluorescent protein)

HBSS – Hank's balanced salt solution

HEPES – 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

IP – immunprecipitáció

IHC - immunhisztokémia
KD – géncsendesítés (knockdown)
LTP – hosszútávú potenciáció (long-term potentiation)
MeA – mediális amygdala
NDS – normál szamár szérum (normal donkey serum)
NMDA – N-metil-D-aszpartát
PAG – periaqueductal gray
PAGE – poliakrilamid gélelektroforézis
PB – foszfátpuffer
PDL – poli-D-lizin
PFA - paraformaldehid
PI – proteáz inhibitor
PKC δ – protein kináz C delta
PSD-95 – posztzinaptikus denzitás fehérje 95
PV – parvalbumin
PVDF – polivinilidén fluorid
RIPA – radioimmunoprecipitation assay buffer
RNS – ribonukleinsav
scgn – secretagoin
SEP – super ecliptic phluorin
siRNS – kis interferáló ribonukleinsav
SOM – szomatosztatin
ss – szimmetrikus szinapszis
WB – Western blot
WFA – Wisteria floribunda agglutinin

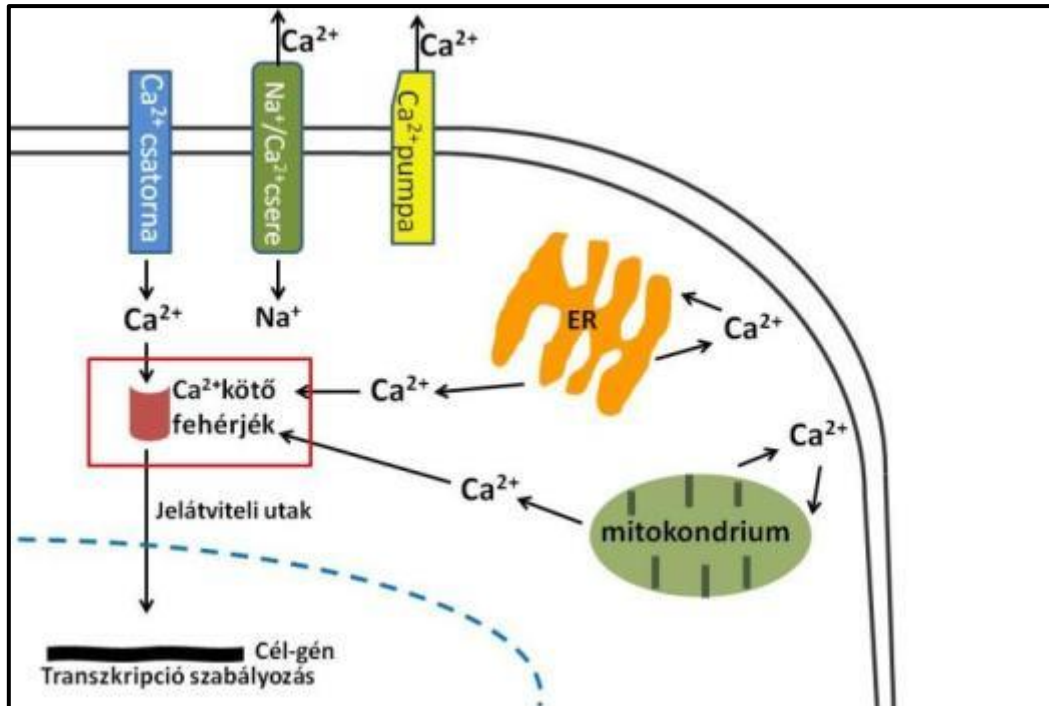
Az eloszlási térképeknél használt anatómiai elnevezések a Paxinos atlaszok nomenklatúrájának felelnek meg, rövidítéseik a képaláírásokban kerültek feloldásra.

1. Bevezetés

1.1 Az intracelluláris kalcium-körforgás

A sejtek működéséhez és homeosztázisának fenntartásához elengedhetetlen a kalciumszint intracelluláris szabályozása. A kalcium másodlagos hírvivőként segít az extracelluláris jelek jelátviteli kaszkádokba történő átformálásában, illetve nélkülözhetetlen szerepet tölt be számos sejtéletteni folyamatban, mint például a sejtosztódás, az izomösszehúzódás, a neurotranszmisszió, a véralvadás, vagy a sejtközi kommunikáció (Lewit-Bentley és Rety 2000). Ezen mechanizmusok feltétele a kalciumszint hirtelen történő megemelkedése, majd gyors visszaállása, tehát a kalcium transziensek kialakulása. A sejten belüli kalcium-ion koncentráció nyugalmi állapotban rendkívül alacsony, nanomólos nagyságrendű. Az intracelluláris kalciumszint túlzott, vagy tartós megemelkedése számos proteáz, kináz, és egyéb enzim aktiválódásával járhat, így a sejt számára citotoxikus hatású (Bagur és Hajnoczky 2017). Az optimális kalcium koncentráció kialakításában és szabályozásában a kalcium-kötő fehérjék fontos szereppel bírnak, megteremtik a plazmamembránon-, és a belső raktárakon keresztül történő kalcium körforgás optimális egyensúlyát (Carafoli és Krebs 2016).

A különböző sejtéletteni folyamatokhoz szükséges intracelluláris kalciumszint megemelkedése többféle módon következhet be. A kalcium egyfelől érkezik az extracelluláris térből a plazmamembránban elhelyezkedő feszültségfüggő, vagy ligandfüggő ionotróp receptorokon keresztül. Az utóbbi csoporthoz tartoznak a tanulási, és memória folyamatokban is kiemelkedő szereppel rendelkező glutamát receptorok, illetve a neuromuszkuláris junkcióban kulcsfontosságú nikotinos acetilkolin receptor (Schwaller 2009). Ezenkívül jelentős mennyiségű kalcium mozgósítható a sejt belső kalcium raktáraiból, melyek a mitokondriumban, valamint az endoplazmás-, és a szarkoplazmás retikulumban találhatóak (1. ábra). Ezek az organellek mind a kalcium kibocsátására, mind pedig a visszavételére képesek (Bagur és Hajnoczky 2017). Mégis, az intracelluláris kalciumszint csökkentésének leghatékonyabb módját a sejtmembrán kalcium pumpái, és a nátrium-kalcium cseremechanizmusa jelentik (Schwaller 2009).



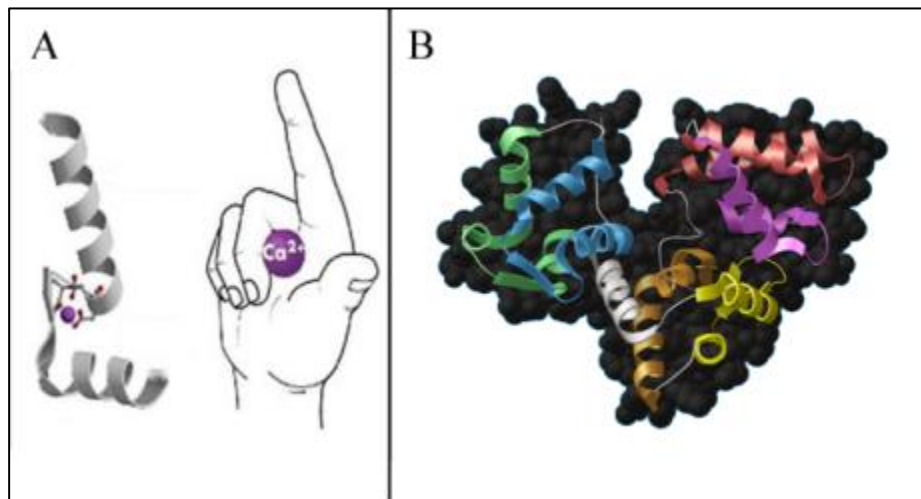
1. ábra: Az intracelluláris kalcium-ion koncentrációjának szabályozása

A sejtben belüli, szabad kalcium-ion koncentrációját befolyásoló organellek és fehérjék. Az extracelluláris térből a kalcium-ion különböző csatornákon át jut a sejtbe, ahol a kalcium-kötő fehérjékhez kapcsolódva jelátviteli utakban vesz részt. Az ER és a mitokondrium a sejt belső kalcium raktáraiként szolgálnak. (A szerző saját ábrája.)

ER endoplazmás retikulum

1.2 A kalcium-kötő fehérjék általános jellemzése

A neurális aktivitással járó kalcium-emelkedés csillapításában, a kalcium tranziensek kialakításában, a celluláris egyensúly fenntartásában a kalcium-kötő fehérjék szerepe kiemelkedő. A kalcium-kötő fehérjék családjának legtöbb tagot számláló csoportja, az „EF-hand” doménnel rendelkező fehérjék alcsaládjá. Az „EF-hand” motívum (2/A ábra) két alfa-hélixből (N-terminális E-hand, és C-terminális F-hand), illetve a köztük lévő hurok régióból felépülő domén, mely nagy affinitással képes a kalcium megkötésére (Lewit-Bentley és Rety 2000, Carafoli és Krebs 2016). Ezt, az alcsalád minden tagjára jellemző konszenzus motívumot 30 aminosav kódolja. A struktúra kinyílása a C-terminálison hidrofób felszín megjelenését eredményezi, mely alkalmas a célfehérjék szekvenciájának a megkötésére (Schwaller 2009, Carafoli és Krebs 2016). Az „EF-hand” szerkezete a törzsfajlásban konzervált, már prokarióta szervezetekben is kimutatható. Evolúciójuk folyamán génduplikációk sorozata biztosította azt, hogy a legtöbb mai EF-hand doménnel rendelkező fehérjében több ilyen motívum is megtalálható, így egyidejűleg több kalcium-ion megkötésére is alkalmassá váltak (Lewit-Bentley és Rety 2000, Schwaller és mtsai 2002, Carafoli és Krebs 2016).



2. ábra: Az „EF-hand” és a secretagogin szerkezete

A: Az „EF-hand” szerkezete: spirál-hurok-spirál felépítésű motívum, mely a kalcium-ion megkötésére konformációváltozáson megy keresztül („kinyílik”).

B: A secretagogin strukturális szerkezete, mely 6 „EF-hand” motívumot tartalmaz.

(Képek forrása: <http://chemistry.umeche.maine.edu/MAT500/Proteins8.html>, <https://pdb101.rcsb.org/learn/structural-biology-highlights/secretagogin> - módosítva)

A kalcium-kötő fehérjék az EF-hand motívumon kívül egyéb jellegzetes szerkezeti elemet is tartalmazhatnak. Egy másik alcsalád a C2-doménnel rendelkező fehérjék alcsaládja. A C2 domén a membránok foszfolipid molekuláihoz képes kapcsolódni. Ide tartozik az exocitózisban és a neurotranszmitter ürítésben fontos szinaptotagmin (Brose és mtsai 1992), illetve a számos jelátviteli útvonalban kiemelkedő szerepet betöltő protein kináz C is (Carafoli és Krebs 2016).

Az EF-hand motívummal rendelkező kalcium-kötő fehérjék két nagy csoportot alkotnak: a kalcium szenzor és a kalcium puffer fehérjék csoportját (Schwaller 2009, Mikhaylova és mtsai 2011).

A kalcium-kötő fehérjék ezen csoportjai egymástól élesen nem elkülöníthetőek, hiszen az ide sorolható fehérjék szerepe számos tényezőtől függhet (affinitás, koncentráció, jelátviteli partnerek). A kalcium-kötő fehérjék közül a szenzor fehérjék kalcium-kötés hatására konformációváltozáson mennek keresztül, így képessé válnak különböző kinázok és foszfatázok aktiválása által a jelátviteli utak beindítására (Skelton és mtsai 1994, Schwaller 2009, Sudhof és Rothman 2009). Jelentős szereppel bírnak alapvető sejtélettani mechanizmusokban, mint például a sejtosztódás-, az exocitózis-, vagy az axonnövekedés. Az ide tartozó családok közül talán a legjelentősebbek a szinaptotagmin, calmodulin, S100, és a neurális kalcium szenzorok (Mikhaylova és mtsai 2011).

A puffer fehérjék ezzel szemben konformációváltozás nélkül, lokálisan szabályozzák a kalciumszintet, és jelentős különbséget mutatnak kalcium-kötő affinitásukban is, mely jóval nagyobb a szenzor fehérjék ezen paraméterénél (1. táblázat). A csoport kiemelkedő tagjai a parvalbumin, a calretinin, és a calbindin (D9k, D28k) (Mikhaylova és mtsai 2011). A D28k calbindin, és a calretinin szenzor-jellegű funkciókkal is rendelkeznek. A parvalbumin legfőképpen a rövid kalcium szignálokat modulálja az izom-, és idegsejtekben. Nagy affinitással köti meg a kalciumot, emellett pedig magnézium-ion megkötésére is alkalmas. Mindhárom fehérjének szerepe van többek között a motoros koordinációban, és a szinaptikus plaszticitás valamely részfolyamatában (Schwaller és mtsai 2002, Schwaller 2009).

1. táblázat: Kalcium-kötő fehérjék jellemői

A legismertebb kalcium-kötő fehérjék összehasonlítása, jellemző tulajdonságaik alapján. kDa kilodalton, Kd kalcium-kötő affinitás

	parvalbumin	calbindin D28k	calbindin D9k	calretinin	calmodulin	secretagoin
molekulatömeg (kDa)	10-12	28	9	29-31	16.7	32
EF-domén	3	6	2	6	4	6
funkcionális EF-domén	2	4	2	5	4	5
Mg²⁺-kötő képesség	+	-	-	-	+	+
Kd (nM)	4-9	180-240	200-500	380-1500	5000	25

A kalcium-kötő fehérjék többsége az egész központi idegrendszer területén kimutatható, ám mennyiségük nem egyenletes eloszlású, így a különböző agyi régiókban jellegzetes mintázatot mutatnak. Ez a specifikus expresszió teszi lehetővé neurális molekuláris markerként való felhasználásukat (Andressen és mtsai 1993, Freund és Buzsaki 1996, Riedel és mtsai 2002). Néhányuk expressziója speciális: így a hippocalcin szenzor fehérje például csak a hippocampusban, a recoverin pedig csak a retina fotoreceptor sejtjeiben található meg (Burgoyne és Haynes 2012). Kalcium-kötő fehérjék általában GABAerg (gamma-aminobutyric acid) gátló interneuronokban fordulnak elő. Ez alól kivételt képeznek többek között a kisagyi parvalbumin-pozitív Purkinje-sejtek, illetve a kéregben található calbindin-tartalmú piramis-sejtek is (Morys és mtsai 1999, Kempainen és Pitkanen 2000, Schwaller és mtsai 2002).

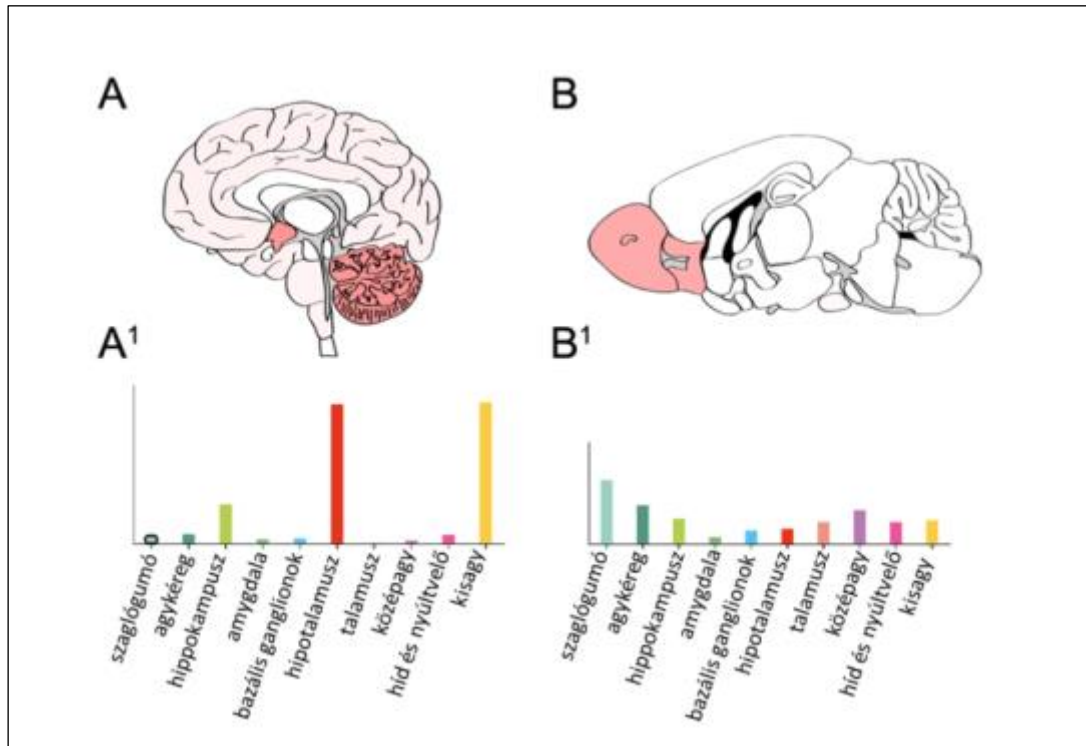
A kalcium-kötő fehérjék sejten belüli eloszlását a szabad aminos csoportot tartalmazó N-terminális végük határozza meg, mely mirisztoilációval képes a membránhoz irreverzibilisen kapcsolódni. Az idegsejtekre jellemző a kalcium-kötő fehérjék különböző mértékű kolokalizációja, együttes előfordulása. Ezek a molekulák redundanciát nem mutatnak, azaz az egyik fehérje hiánya esetén annak funkcióját a másik fehérje nem kompenzálja (Mikhaylova és mtsai 2011, Burgoyne és Haynes 2012).

1.3 Új kalcium-szenzor fehérje: secretagoin

A kalcium szenzor fehérjék családjának egyik újabban felfedezett tagja a secretagoin (scgn), melyet hasnyálmirigy béta sejtjeiből Ludwig Wagner izolált elsőként 2000-ben (Wagner és mtsai 2000, Rogstam és mtsai 2007). A béta sejtekben az inzulin klatrinburkos vezikulákba csomagolva szállítódik, ürítésük (exocitózisuk) pedig a vércukorszint megemelkedésének hatására kalcium-függő módon történik. Ebben a folyamatban vesz részt a secretagoin, valószínűleg protein kinázok-, vagy más effektor molekulák szabályozásán keresztül (Gartner és mtsai 2007, Rogstam és mtsai 2007).

A secretagoin calretininhez és calbindinhez (CB-D28k) hasonlóan hat EF-hand motívumot tartalmaz (2/B ábra), ám ebből csak öt képes a kalcium tényleges megkötésére (Schwaller 2009). Gerinces élőlények között szerkezetében és funkciójában is konzervált (Mulder és mtsai 2009). A secretagoin gén emberben a 6., egérben a 13., míg patkányban a 17. kromoszómán lokalizálódik. Szekvenciája egy 276 aminosavból álló, 32kDa molekulatömegű fehérjét kódol. Frakcionálási és elektronmikroszkópos vizsgálatok kimutatták, hogy a secretagoin legnagyobb mennyiségben a citoszolban található meg, de a sejtmag területén, illetve membránkompartmentekben is megfigyelhető (Wagner és mtsai 2000). A secretagoin expresszióját számos fajban (madarakban, rágcsálókban, főemlősökben, emberben) vizsgálták: legnagyobb mennyiségben a hasnyálmirigyben fordul elő, de a májban, pajzsmirigyben, a gasztrointesztinális szervekben, és a központi idegrendszerben is kimutatható (Wagner és mtsai 2000, Gartner és mtsai 2001). A központi idegrendszeren belül a fajok között a secretagoin fehérje expressziós mintázatában jelentős különbségeket tapasztalhatunk, mely eltéréseket a transzkriptomikai vizsgálatok adataiból is megfigyelhetjük (3. ábra). Humán agyvelők posztmortem vizsgálatokor sok secretagoin-pozitív sejtet fedeztek fel a temporális lebenyben, a hippocampusban, a hipotalamusban, és a kisagyban is (Mulder és mtsai 2009). A fejlett szaglórendszerrel rendelkező rágcsálók kisgyi régiójában ez a fehérje csak elenyésző mennyiségben van jelen, ellenben szaglógumójuk kiemelkedő mennyiségű secretagoint tartalmaz (Hanics és mtsai 2017), mely megbízható kontrollként szolgál a különböző hisztokémiai-, és molekuláris vizsgálatok során. A secretagoin fajok között tapasztalható, az egyes szervrendszerekben megmutatózó jelentős eloszlásbeli hasonlóságai, és fehérjeszerkezetének konzerváltsága megalapozottá teszi a modellorganizmusokon

végzett kísérletek jelentőségét, és interpretálhatóságát humán vonatkozásban. Mindemellett figyelembe kell vennünk-, és kellő gondossággal kell kezelnünk a mintázati, és egyéb, viselkedésbiológiai különbségeket.



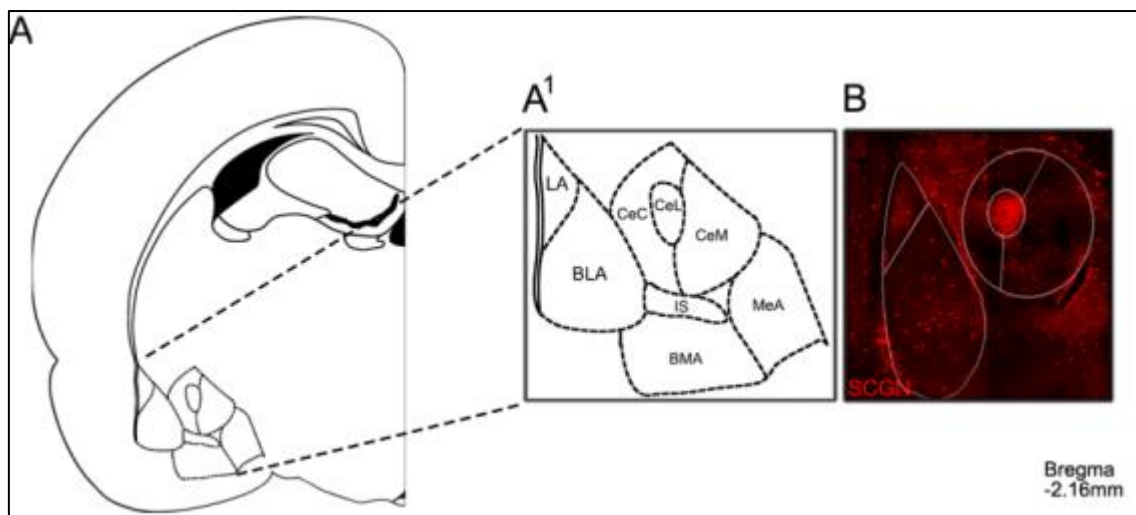
3. ábra: A secretagogen gén expressziója humán és egér agyvelőben

A secretagogen gén expressziója humán (A)-, és egér (B) agyvelőben, RNS szekvenálási adatsorok alapján. Az emberben a secretagogen gén kifejeződése a kisagy-, és a hipotalamusz területén (A¹), míg egérben (B¹) a szaglógumóban a legerőteljesebb.

(Kép forrása: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000079689-SCGN> - módosítva)

1.4 Az amygdala anatómiája

Az amygdala (corpus amygdaloideum, mandulamag) a temporális lebenyben található agyi régió, melyet Burdach azonosított a XIX. század elején (4/A ábra). A görög-eredetű szó jelentése mandula, mely a struktúra alakjára utal. A szövettani technológiák fejlődésének köszönhetően később világossá vált, hogy az eredetileg amygdalaként azonosított sejtcsoport (a bazolaterális mag) az öt körülvevő régiókkal anatómiailag összetartozik, és funkcionális egységet alkot. Így mára az amygdalát különálló magcsoportok összességéből felépülő komplexnek tekintjük (McDonald 2003, Sah és mtsai 2003).



4. ábra: Az amygdala komplex alegységei

A: Egér agyvelő egyik oldali féltekéjének keresztmetszete, és az amygdala komplex elhelyezkedése. A¹: Az amygdala főbb alegységei. B: A secretogin fehérje eloszlása egér amygdalában, immunhisztokémiai festéssel jelölve.

BLA basolateral amygdaloid nucleus, BMA basomedial amygdaloid nucleus, CeC central amygdaloid nucleus capsular part, CeL central amygdaloid nucleus lateral division, CeM central amygdaloid nucleus medial division, IS intercalated cells, LA lateral amygdaloid nucleus, MeA medial amygdaloid nucleus, scgn secretogin. (A szerző saját ábrája.)

Az amygdala magcsoportjai citoarchitekturális, hodológiai, funkcionális, és morfológiai szempontok alapján többféleképpen csoportosíthatóak (Pitkanen és mtsai 1997). Az általam is követett felosztás szerint három nagy magcsoportot különböztetünk meg: a

bazolaterális, a centromediális-, és a kortikális magcsoportot. Ezen magcsoportokhoz összesen több, mint 10 mag tartozik, melyek további divíziókra oszthatóak. A bazolaterális csoportot alkotják a bazális, laterális, és a kiegészítő bazális magok; a centromediális amygdalához tartoznak a centrális és mediális magok, végül pedig megkülönböztetünk egy kéreg-szerű csoportot is, melyet a laterális szaglóköteg magja, és a kortikális magok alkotnak (4/A¹ ábra) (Sah és mtsai 2003). A centrális mag négy divízióra osztható (kapszuláris, laterális, intermediális, és mediális), melyek kiemelkedő szereppel rendelkeznek a munkám során.

Swanson és Petrovich az amygdala magvait funkcionális összetartozás és különbségek alapján négy nagy csoportba osztotta: a frontotemporális, az autonóm, a fő-, illetve a kiegészítő szaglórendszerhez kapcsolható régiókba (Swanson és Petrovich 1998). A centrális és a mediális amygdalát magába foglaló autonóm csoport feladata a feldolgozott információ továbbítása a fiziológiai, érzelmi és viselkedésbeli válaszok kiváltására. Ezek a sejtcsoportok a striatumra jellemző jegyeket hordoznak, ennek megfelelően főleg GABAerg-projekciós neuronokat tartalmaznak (McDonald és Augustine 1993). A frontotemporális, kéreg-szerű csoport a claustrum ventromediális kiterjedésének tekinthető, és a kéreggel szoros összeköttetésben lévő bazolaterális és laterális egységeket tartalmazza. A másik két csoport a szaglórendszerrel van kapcsolatban, és főként mediális, illetve kortikális amygdaláris egységek sorolhatóak ide (Alheid 2003, Sah és mtsai 2003).

Régóta tartja magát az az elképzelés, mely az amygdala komplexumot egy ősbibb, a szaglórendszerrel összeköttetésben lévő kortikamediális, és egy filogenetikailag újabb megjelenésű, neokortexhez kapcsolódó bazolaterális régióra osztja. Johnson szerint az előbbi terület kiterjesztéseként, folytatásaként értelmezhető a bed nucleus of stria terminalis (BNST), mely így funkcionálisan az amygdala komplex részének tekinthető (McDonald 2003). Az ő nevéhez fűződik a kiemelkedő jelentőséggel bíró beágyazott („intercalated”) sejtcsoport leírása is, mely neuroncsoport az amygdalához tartozik ugyan, de annak magjai közé nehezen sorolható be. Alheid és Heimer elgondolásai alapján a múlt század végén született meg az „extended amygdala” koncepció, mely az amygdala Johnson által lejegyzett, ventrobazális irányban történő kiterjesztésén alapszik (Alheid és Heimer 1988, Alheid 2003). Alapja, hogy a centromediális amygdala a körülötte lévő területekkel számos hasonlóságot mutat, összeköttetésben állnak

egymással, és hasonló efferenciációval bírnak, idegsejtjeik közös hipotalamikus és agytörzsi területeken végződnek. Az extended amygdalához szűkebb értelemben a BNST, a nucleus accumbens, a centromediális amygdala, és az ezeket összekötő neuronokat magába foglaló folyosó (substantia innominata) tartozik (Alheid 2003). Két, anatómiailag és funkcionális is jól elkülöníthető régióból áll, melyek a centrális és mediális extended amygdala nevet viselik. A félelmi reakciókért felelős centrális extended amygdala része a centrális amygdala és a laterális BNST, mely a nucleus accumbenssel folytonos (Martinez-Garcia és mtsai 2008). A nemi reakciók (szexuális viselkedés, utódgondozási magatartás, territoriális agresszió) kiváltásában szerepet játszó mediális extended amygdala a mediális amygdalából és a mediális BNST-ből áll (Newman 1999, Pereno és mtsai 2011).

Fejlődéstanilag az amygdala két részre osztható. A centrális-, és az extended amygdalának megfelelő terület szubpallialis eredetű, striatális jellegeket hordoz, így az ott jellemző közepes tüskés GABAerg projekciós neuronok adják az idegsejtek többségét. Az amygdala bazolaterális és kérgi részei az előagy pallialis részéből származnak. Ezen a területen az agykéreg piramissejtjeihez nagyon hasonló serkentő glutamáterg projekciós neuronok találhatóak, melyek a ventromediális előagy (BNST, centrális amygdala, nucleus accumbens) területére vetítenek (Pape és Pare 2010).

Az amygdala filogenetikailag legfiatalabb része a kortikális amygdala, mely csak a békáknál magasabb rendszertani csoportokban jelenik meg. Az evolúció során a bazolaterális régió mérete a centrális alegységéhez képest fokozatosan növekszik, amely az agykéreggel való kétirányú kommunikáció fejlődését teszi lehetővé (Chareyron és mtsai 2011, Janak és Tye 2015).

1.5 Az amygdala kapcsolatrendszere

A központi idegrendszerben az egyes neuroncsoportok hálózatban való elhelyezkedése, afferens és efferens összeköttetései alapvetően határozzák meg a funkciójukat. A retrográd és anterográd pályakövetési eljárásoknak köszönhetően az amygdala változatos, alegységenként nagy diverzitást mutató kapcsolatrendszerét mára részletesen feltérképezték. A bazolaterális magcsoportba tartozó laterális mag az amygdala komplex „érző határhoz”, így az elsődleges befogadója a talamuszból és a szenzoros kéregből beáramló érző információknak. Ezek a stimulusok érkehetnek a szagló, a szomatoszenzoros, a viscerális, az akusztikus, és a látókéregből is. A hallási és a látási információk főként az asszociációs területekről érkeznek a laterális divízió dorzális részébe (McDonald és Mtsai 1999). A hosszútávú memória kialakításában fontos kérgi-, és hippokampális régiók, valamint az amygdala között erős, kétirányú kapcsolat van. A külvilág ingereit közvetítő glutamaterg rostok szabályozását a laterális alegység gátló interneuronjainak lokális hálózata végzi. Az amygdala továbbá hipotalamikusan és agytörzsi bemenetekkel is rendelkezik, melyek a viselkedés kialakításáért felelős, és az autonóm területekről érkeznek.

A centrális mag ezzel szemben a legfőbb kimeneti terület, ahonnan főleg az agytörzs, a hipotalamusz és a kéreg felé indulnak projekciók (Ledoux 2000). A főként GABAerg idegsejteket tartalmazó centromediális részből az agytörzsbe érkező információk hatására következnek be az élettani, hormonális és viselkedésbeli változások, mint például a predátor jelenléte által kiváltott megdermedés, a „freezing” reakció (Ehrlich és Mtsai 2009). A centrális amygdalába számos agyterületről érkezik stimulus, melyek itt integrálódnak, majd az információ elhagyja a magkomplexum területét (McDonald és Mtsai 1999).

Az amygdalán belüli összeköttetések szerepének is egyre nagyobb jelentőséget tulajdonítanak. Ez a hálózat sokkal inkább értelmezhető kétirányú, reciprok összeköttetések halmazának, mintsem egyirányú kapcsolatrendszernek (Sah és Mtsai 2003). Az intra-amygdaláris információáramlásnak három szintjét különböztetjük meg: az egyes magok közötti internukleáris, a divíziók közti interdivízionális, valamint a divíziókon belüli intradivízionális kapcsolatokat (Ledoux 2000, Ehrlich és Mtsai 2009). Az információ továbbításának általános sémája szerint a külvilágból érkező impulzus a bazolaterális egységből a centromediális magcsoportba jut, majd innen hagyja el az

amygdala területét. A laterális és a centrális magok között ugyan van direkt kapcsolat is, de ennél fontosabb a bazális-, és a beágyazott magok közvetítésével megvalósuló útvonal.

1.6 Az amygdalában előforduló sejtípusok

Az amygdala komplexum diverzitása a magcsoport-eloszlásán, és összeköttetéseinek sokféleségén kívül neurontípusainak sajátosságaiban is megnyilvánul. Az amygdala bazolaterális részében található idegsejtek körülbelül 80%-a glutamáterg projekciós neuron (Pape és Pare 2010). A centrális amygdala meghatározó sejtípusa – a striatumnak megfelelően – GABAerg neuron. Az amygdala az említett projekciós neuronokon kívül főként GABAerg gátló interneuronokat tartalmaz, melyek az általuk expresszált kalciumkötő-fehérjék és peptidhormonok tekintetében nagy diverzitást mutatnak. A sejtek felében megtalálható a calbindin, ami mellett parvalbumin, kolecisztoxinin, vagy szomatosztatin is expresszálódhat (Kempainen és Pitkanen 2000). Az interneuronok másik nagy csoportjában calretinin van jelen, ezekben is előfordulhat kolecisztoxinin. Újabban az amygdalában megfigyelhető gátlósejteket a kéregben tapasztaltakkal megegyezően három nagy csoportba sorolják: a projekciós neuronok periszomatikus részével szinaptizáló parvalbumint, vagy kolecisztoxinint kifejező kosársejtek, és az axo-axonikus kapcsolatokat kialakító, parvalbumint expresszáló neuronok (Veres és mtsai 2014, Veres és mtsai 2017).

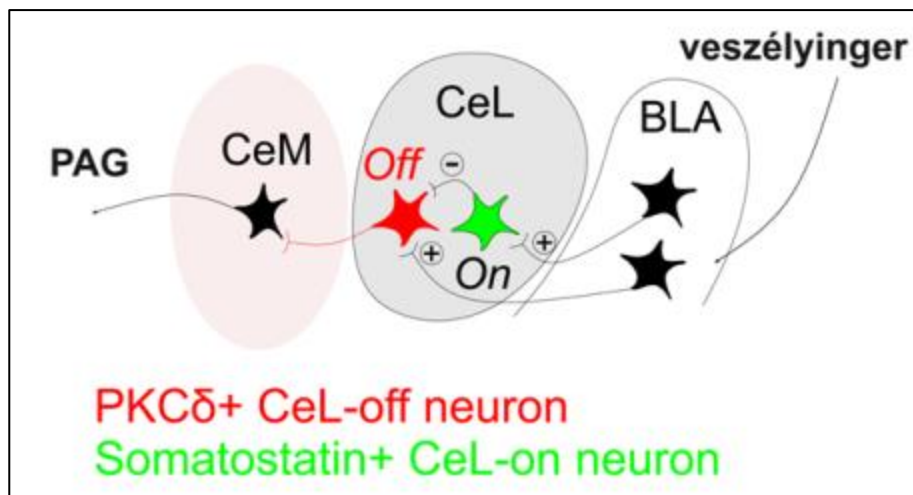
Az amygdalában komplex, és precízen összehangolt gátló hálózat működik, mely normális esetben a celluláris aktivitást alacsony szinten tartja. A hálózatot alkotó gátló interneuronok szinapszisokat képeznek a glutamáterg serkentő projekciós idegsejtekkel, mely kapcsolaton keresztül azok működését szabályozni képesek. Ennek megfelelően az amygdala működését befolyásoló neuromodulátorok fő célpontjai ezen gátló interneuronok.

1.7 A centromediális magcsoport jellemző sajátosságai

Munkám során leginkább az amygdala centromediális magcsoportját tanulmányoztam, ezért az itt jellemző sejtípusokat, illetve azok funkcióját és kapcsolatrendszerét részletesebben mutatom be. Míg a bazolaterális amygdala a külvilágból érkező információk fogadását, azok feldolgozását és tárolását végzi, addig a centrális amygdala a védekezési reakciók kiváltásáért felel. Veszélyhelyzet vagy fenyegetettség esetén a centromediális alegység neuronjai gátló bemeneteket biztosítanak az agytörzs és a hipotalamusz területére, ezzel hozzájárulva az autonóm és a motoros válasz kialakulásához (Ciocchi és mtsai 2010, Gu és mtsai 2020).

Az utóbbi években a szakirodalomban fellelhető kutatások az amygdala centrális magjának a divíziói közül a centrolaterális és a centromediális régióknak tulajdonítanak a legnagyobb jelentőséget. A centrolaterális amygdalában jellemzően gátló GABAerg interneuronok találhatóak, melyek peptidek – úgy, mint: vazopresszin, oxitocin, kortikotrop rilízing faktor (CRH), enkefalin, szomatosztatin (SOM) - és receptorok diverz populációját fejezhetik ki (Haubensak és mtsai 2010, Kunjiappan és mtsai). Ezeknek a neuronoknak egy újabban alkalmazott markere egy proteinek foszforiláló enzim, a δ -típusú protein kináz C (PKC δ), mely a sejtek 50%-ában kimutatható. Megfigyelték továbbá, hogy a PKC δ + neuronok szomatosztatint, kortikotrop rilízing faktort és dinorfint nem expresszálnak, illetve a későn tüzelő idegsejtek („late-firing”) elektrofiziológiai sajátosságait mutatják. A centrolaterális divízió másik nagy sejtcsoportját a szomatosztatin-tartalmú neuronok alkotják, melyek közé gyors, és lassú tüzelési mintázattal bíró idegsejtek egyaránt tartoznak (Ciocchi és mtsai 2010, Haubensak és mtsai 2010, Hunt és mtsai 2017). A PKC δ + és a SOM+ sejtek egymástól jól elkülöníthető populációt alkotnak, funkciójukat mégis összehangolt működésüknek köszönhetően tudják betölteni (5. ábra). A SOM+ neuronok a laterális amygdalából közvetlenül kapnak bemenetet, így egy veszélyhelyzetet jelző ingerre (például félelem kondicionálás során a kondicionált hangjelzésre) gyors aktivációt mutatnak. Ez ihlette a sejtcsoport szakirodalomban elterjedt elnevezését, ahol gyakran „fear-on” vagy „CeL-on” sejtekként emlegetik azokat. Ennek megfelelően a PKC δ -t kifejező neuronokat hívhatjuk „fear-off” vagy „CeL-off” sejteknek, melyek a válaszreakciók kiváltásáért felelős effektor régiókkal összeköttetésben álló centromediális divízióba projiciálnak. A

CeL-on sejtek gátolják a CeL-off sejteket, így a válaszreakció diszinhibíció útján valósulhat meg (Ehrlich és mtsai 2009, Haubensak és mtsai 2010, Wolff és mtsai 2014). A centrolaterális amygdala GABAerg interneuronjai elsősorban lokális összeköttetések révén vesznek részt a sejtélettani és viselkedésbiológiai folyamatok szabályozásában, azonban távolabbi projíciókat is megfigyeltek, például a CeL-on sejtek esetében a sublentikuláris extended amygdala területére (Sun és mtsai 2020). A CeL-on neuronok továbbá a centrolaterális amygdala CRH-tartalmú idegsejtjeivel kölcsönös gátló kapcsolatban állnak, ami a veszélyhelyzetre adott védekezési reakció fajtájának a meghatározásában fontos (Fadok és mtsai 2017).



5. ábra A centromediális amygdala gátló interneurális hálózata

A külvilág veszélyt jelző ingereiről a bazolaterális amygdala glutamáterg neuronjai közvetítenek információt a centrolaterális divízióba, amit a CeL-on sejtek fogadnak. Ezek szomatosztatin+ sejtek, melyek gátolják a CeL-off, PKC δ + interneuronok működését, melyek az effektor régiók által kiváltott válaszreakciók létrejöttét szabályozzák.

BLA basolateral amygdaloid nucleus, CeL central amygdaloid nucleus lateral part, CeM central amygdaloid nucleus medial part, PAG periaqueductal gray, (A szerző saját ábrája.)

1.8 Az amygdala központi szerepe a viselkedésben

Az amygdala a limbikus rendszer részeként kiemelkedő szerepet játszik az érzelmi folyamatok szabályozásában, és egyaránt fontos színtere a tanulásnak és a memória kialakulásának. Az amygdala jelentőségére az érzelmek és a viselkedés összehangolásában elsőként Klüver és Bucy szolgált kísérletes bizonyítékokkal (Bucy és Kluver 1955, Kluver és Bucy 1997). Majmokon hajtottak végre mediális temporális lebeny léziót, majd vizsgálták az állatok viselkedését. Ezek a majmok a félelem, a harag, a szociális interakciók teljes hiányát, valamint hiperszexualitást és hiperoralitást mutattak. Az elvégzett lézió az amygdalán kívül a hippokampuszt, és a környező kérgi régiókat is tartalmazta. Később a kísérletet Weiskrantz ismételte meg, aki célzottan csak az amygdalát távolította el (Weiskrantz 1956). Eredményei az eddigieket megerősítve bizonyították az amygdala központi szerepét az emocionális folyamatokban. A kutatók a tapasztalt tüneteket „pszichés vakságnak” definiálták, és a humán amygdala sérülése esetén jelentkező tünetegyüttest Klüver-Bucy szindrómának nevezték el. A léziós vizsgálatokkal összhangban az amygdala elektromos ingerlése állatokban és emberekben egyaránt félelmet és szorongást vált ki. További kísérletek bizonyították, hogy az amygdalának szerepe van többek között az étvágytalansággal, szexuális viselkedéssel, a helypreferenciával, és a függőség kialakulásával kapcsolatos viselkedési elemekben is (Sah és mtsai 2003).

Az amygdalának az emocionális válaszok kialakításában-, és a viselkedési folyamatokban betöltött funkciójának kísérletes vizsgálata számos nehézségbe ütközik. A különböző léziós-, és viselkedési kísérletekhez törvényesen felhasználható állatok (rágcsálók) érzelmeinek a felismerése és a tanulmányozása, az embereknél jelentős szereppel rendelkező beszéd nélkül meglehetősen nehéz. Az egyetlen állatokon is vizsgálható érzelem a félelem. A félelem egy, az evolúcióban konzervált, minden érző fajban előforduló alapérzelem, mely adaptív stratégiaként is funkcionál az egyed túlélésének érdekében. Leírták több fajban a legyektől az emlősökig, beleértve a férgek, kígyókat és a halakat is (Ledoux 2000). Habár a félelemérzethez vezető biokémiai változások és neurális mechanizmusok mindenkinél hasonlóan játszódnak le, a félelem egy szubjektív, és tudatos állapot. Szubjektív, hiszen az adott egyed adott szituációra vonatkoztatott kognitív állapotát tükrözi; és tudatos, mert az egyed a (vélt vagy valós) közelgő veszélynek a tudatában van. Ennek megfelelően a különböző fajok

közötti adatsorok interpretálhatóságát kellő körültekintéssel kell kezelünk. Mi, emberek hajlamosak vagyunk a saját érzéseinket felfedezni más élőlények magatartásának a háttérében. Ezen antropomorfizmus kiküszöbölésére, illetve a terminológiai félreértések elkerülésének érdekében, újabban laborkísérleteknél a „félelem” elnevezés helyett gyakran olvashatjuk az „averzív” vagy „elkerülési viselkedés”, és a „védekezési válasz” kifejezéseket (Izquierdo és mtsai 2016, Mobbs és mtsai 2019). Ezeknek az elkerülési reakciónak az intenzitása széles skálán mozoghat: a ledermedéstől, a menekülésen keresztül egészen a támadásig.

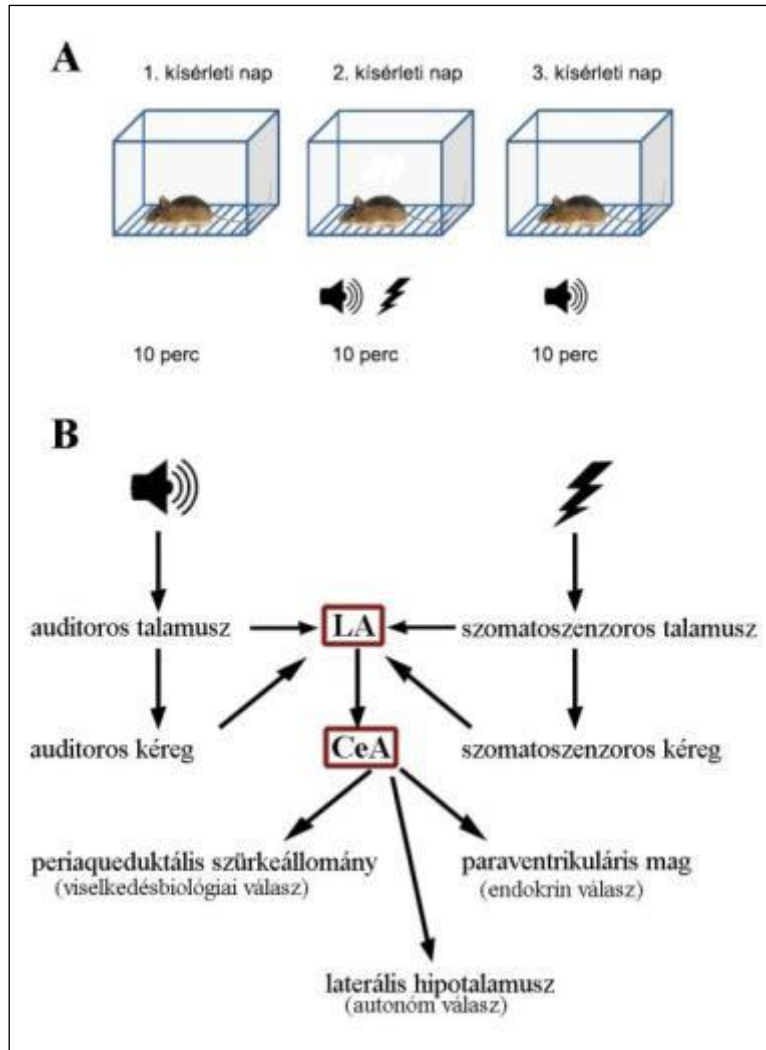
A félelemi reakciók, és egyben az asszociatív tanulás széles körben alkalmazott kísérletes formája a félelem-kondicionálás (7/A ábra). A félelem-kondicionálás a klasszikus Pavlovi kísérleten alapszik, melynek során az állatok megtanulnak egy számukra semleges ingert összekötni a veszéllyel. A kísérlet során egy neutrális, kondicionált stimulust párosítanak egy averzív, kondicionálatlan ingerrel (Ledoux 2000). A klasszikus modellben a védekezési, averzív reakciót kiváltó inger egy enyhe áramütés, melyet hangingerrel párosítanak. Utóbbi helyett alkalmazható még fényhatás, szag/illat, esetleg egy adott kontextus is. A kontextus-függő kondicionálás színtere az amygdala és a hippokampusz, míg a klasszikus kondicionálás kimondottan az amygdalához köthető. Az asszociáció kialakulásával a semleges inger önmagában is kiváltja a válaszreakciót. Ez a válaszreakció rágcsálókban tipikusan a mozdulatlan ledermedésben („freezing”) nyilvánul meg, de jellemző a vérnyomás és a szívfrekvencia fokozódása, valamint vérből kimutatható a stresszhormonok szintjének emelkedése. Ez az asszociatív, tanulási mechanizmus gyorsan kialakul - gyakran elég egy párosítás-, és hosszan, akár egy életen át megmaradó memóriához vezethet. Amennyiben az averzív stimulust elhagyjuk, és a kondicionált inger önmagában többször ismétlődik, a kiváltott reakciók gyengülnek, végül kioltódás („extinctio”) következik be. A kioltódás során nem a már meglévő memória tűnik el, hanem egy új tanulási folyamat során új memória alakul ki. A folyamatban az amygdala alegységeinek a szerepe kulcsfontosságú. Az ingerek társítása és a memória kialakulása a bazolaterális-, míg a védekezési reflex kialakulásának szabályozása a centromediális magcsoporthoz köthető.

1.9 A félelem-kondicionálás folyamata

Félelem-kondicionálás során az auditoros (hang) és a szomatoszenzoros (áramütés) bejövő ingerek a kéregből, illetve a talamuszból érkeznek a laterális amygdala területére (6/B ábra). Az itt található neuronok mindkét bemenetből részesülnek, tehát ez a neutrális-, és averzív inger konvergálásának központja (Johansen és mtsai 2011). A feldolgozott információt a laterális amygdala a centrális alegységbe vetíti közvetlenül, vagy közvetve más intraamygdaláris sejtcsoportokon keresztül. Az amygdala területéről végül a projekciók a hipotalamuszhoz és az agytörzshöz (periaqueductal gray, locus coeruleus, parabrachialis mag) érkeznek, ahol a védekezési viselkedés, a hormonális és autonóm válaszok szabályozása zajlik (Ledoux 2000, Sah és mtsai 2003, Duvarci és Pare 2014).

A félelmi kondicionálás során egy asszociatív tanulási folyamat játszódik le, a plasztikus változások következtében pedig memória alakul ki. A mechanizmus során bekövetkező celluláris változások a szinaptikus kapcsolatok megerősödéséhez, és új szinapszisok kialakuláshoz vezetnek. Ezt a folyamatot, a szinaptikus plaszticitás aktivitásfüggő formáját, hosszú-távú potenciációnak, röviden LTP-nek (long-term potentiation) nevezzük. Ez a plaszticitás kódolja a laterális amygdalában megvalósuló neutrális- és averzív inger társítását (Ledoux 2000, Johansen és mtsai 2011). Az LTP bekövetkezhet több agyterületen (amygdala, hippocampus, agykéreg) is, melyek más effektor régiókon keresztül különböző viselkedési válaszokat indukálhatnak.

Az LTP bonyolult jelátviteli kaszkád működése révén következik be, és végső soron a sejtmagban transzkripciós faktorok mozgósításával fejti ki hatását a génexpresszióra. A jelátviteli útvonalak beindításához elengedhetetlen az intracelluláris kalcium-szint megemelkedése, mely többek között az NMDA (N-metil-D-aszpartát) receptor aktiválódásának hatására történik (Ehrlich és mtsai 2009).



6. ábra: A félelem-kondicionálás menete és mechanizmusa

A: A félelem kondicionálás egy három napos kísérlet, melynek első napján történik a habituáció, második napján kapják az állatok a kondicionált (hang)-, és kondicionálatlan (áramütés) ingerek párosításait, végül az utolsó napon csak kondicionált ingert kapnak. B: A külvilágból érkező ingerek társítása a laterális amygdalában történik, ahonnan az információ a centrális amygdalán át az effektor régiókhoz érkezik.

CeA central amygdaloid nucleus, LA lateral amygdaloid nucleus. (A szerző saját ábrája.)

Az NMDA receptor egy heterotetramer szerkezetű ligandvezérelt receptor, mely kation csatornaként is funkcionál. NR1, NR2 és NR3 különböző típusú alegységeiből épül fel, mely alegységek vezikuláris transzporttal szállítódnak a transz-Golgi hálózattól összeszerelődési helyük, a posztszinaptikus membrán felé (Cull-Candy és Leszkiewicz

2004). A receptor működőképes tetramer szerkezete abban az esetben tud kialakulni, ha horgonyzó molekulák (például a posztszinaptikus denzitás 95 fehérje, PSD-95) segítségével képes rögzülni a sejtmembránban (Al-Hallaq és mtsai 2007). Aktiválódásához a glutamát megkötésén kívül egy koaktivátor, a glicin jelenléte is szükséges. Alapállapotban a pozitív ionokra szelektív csatornát egy magnézium-ion blokkolja, melynek eltávolítása a membrán depolarizációjának a hatására következik be (Dingledine és mtsai 1999). A funkcionáló receptor mindig tartalmaz egy glicin megkötésére képes NR1 alegységet. Az NR2 alegységnek négyféle (A,B,C,D) változata van, melyek mindegyike a glutamát megkötését végzi. A leggyakrabban előforduló receptortípus az NR1-NR2A, illetve az NR1-NR2B kombinációból épül fel (Luo és mtsai 1997, Stephenson és mtsai 2008). Az NR2B alegység a PSD-95 fehérje kötőpartnere, mely stabilizálja a membránhoz való kötődést (Al-Hallaq és mtsai 2007). Az alegységen 3 darab tirozin foszforilációs hely található (Y1472, Y1252 Y1336), melyek közül az Y1472-n történő foszforiláció szabályozza a receptor sejtfelszíni expresszióját (Lavezzari és mtsai 2003, Chen és Roche 2007). Az NR2B alegység kulcsszerepet tölt be a memória kialakulásában is: azok a transzgénikus egerek, melyekben az NR2B-t túltermeltették, megnövekedett NMDA receptor aktivációt mutattak, illetve jobban teljesítettek az asszociatív viselkedésszettekben (Tang és mtsai 1999).

Az amygdalához köthető tanulási, és magatartásbiológiai folyamatok során egyaránt az NR2B alegységnek tulajdonítanak a legnagyobb szerepet. Az előző fejezetben már ismertett védekezési mechanizmus során, a centrolaterális amygdalában található idegsejtek bemenetet kapnak a laterális amygdala neuronjaitól, ahol az ingerületátvitel szintén az NMDA receptor közvetítésével valósul meg (Ehrlich és mtsai 2009).

1.10 Az amygdala neuropatológiája

Az amygdala - a limbikus rendszer más tagjaival együtt - számos neurodegeneratív elváltozásban és hangulati betegségben is jelentős szereppel bír. A félelemmel összefüggésbe hozható betegségekben, mint a poszttraumás stressz szindróma, a szorongás, a depresszió, a skizofrénia, vagy a bipoláris zavar, az amygdala szintén jelentős szerepet tölt be (Jollant és mtsai 2011, Bickart és mtsai 2014). A félelem egy evolúciósan konzervált alapérzelem, ami a közvetlen veszélyhelyzetre alakul ki a túlélés érdekében (Izquierdo és mtsai 2016). A szorongás ezzel szemben egy jövőbeni fenyegetés előrejelzése. A félelem gyakran társul szorongással, amely folyamatos stresszt eredményezve pszichiátriai tünetegyüttesek sorának a kialakulásához vezethet (Pape és Pare 2010, Sun és mtsai 2020). Éppen ezek a mentális betegségek jelentik napjainkban az egyik legnagyobb kihívást, mivel gyakoriságuk fokozatosan emelkedik. A legismertebb és leggyakoribb ezek közül a depresszió. Depresszióban szenvedő pácienseknél az amygdaláris idegsejtek nagyfokú pusztulását-, és a szinapszisok számának drasztikus csökkenését mutatták ki (Sheline és mtsai 1998, Hamilton és mtsai 2008). A skizofréniával diagnosztizált egyének posztmortem vizsgálata ugyanezt az eredményt adta (Kreczmanski és mtsai 2007). A poszttraumás stressz szindrómában szenvedő betegek mágneses rezonancia vizsgálata az amygdaláris neuronok aktivitásának abnormális mértékű megemelkedését mutatta, amely a traumát okozó inger kioltódásában (extinkció) bekövetkező zavarral párosult (Blechert és mtsai 2007, Maren és Holmes 2016). Egyre több, a poszttraumás stressz szindróma kezelésére végzett kutatás irányul ennek a folyamatnak a farmakológiai manipulálására. A mentális zavarok gyógyítására végzett kutatások lényeges eleme a félelemhez köthető viselkedésbiológiai tesztek (félelem kondicionálás, open field teszt, emelt keresztpalló teszt), melyeket a gyógyszerkísérletek preklinikai fázisában sikeresen alkalmaznak (Sun és mtsai 2020). Az amygdala a félelemhez köthető betegségeken túl, számos más, értelmi-, és hangulati zavarral járó kóros állapottal összefüggésbe hozható.

Például a kognitív diszfunkcióval jellemezhető Alzheimer-kór korai szakaszában a mediális temporális lebeny atrófiája, az amygdala degenerációja figyelhető meg (Cuenod és mtsai 1993). Ezen kívül újabban fedezték fel, hogy az autizmusban szenvedő fiatalok amygdalája nagyobb méretű, illetve felnőttkorban az itt található sejtek csökkent denzitása jellemző (Schumann és mtsai 2004, Schumann és mtsai 2011).

Az állatok és az ember között az érzelmek (különösen a félelem) mechanizmusa és fiziológiája nagyon hasonló. A rágcsálókön végzett magatartásbiológiai kísérletek a humán mentális-, és viselkedészavarok modelljéül szolgálhatnak, segítségükkel közelebb kerülhetünk a megfelelő terápiás célú eljárás kifejlesztéséhez

2. Célkitűzések

- A secretagoin fehérje eloszlásának immunhisztokémiai módszerekkel történő vizsgálata patkány amygdalából készült sorozatmetszeteken.
- A secretagoin-tartalmú idegsejtek morfológiai leírása, interneuron-, illetve projekciós neuron jellegének meghatározása szövettani módszerek, és pályakövetési eljárások felhasználásával.
- A secretagoin fehérje sejten belüli előfordulásának vizsgálata elektronmikroszkópos analízis, és sejtfractionálási eljárások segítségével.
- A secretagoin fehérje interaktív partnereinek feltérképezése, és ismert neurális markerekkel való együttes előfordulásának vizsgálata.
- Rágcsálókön végzett viselkedésszociológiai módszerek felhasználásával a secretagoin fehérje szerepének meghatározása az amygdala működésében.
- A secretagoin fehérje funkciójának vizsgálata azokban a sejtélettani folyamatokban, melyek szerepet játszanak az általunk előzőleg vizsgált viselkedési mintázatok kialakításában. Ezen vizsgálatokhoz *in vitro* technológiák, és élősejtes („live imaging”) mikroszkópia felhasználása.
- Emberi amygdala minták felhasználásával a secretagoin fehérje előfordulási mintázatának meghatározása, a secretagoin-tartalmú idegsejtek morfológiai leírása, illetve mennyiségük meghatározása az amygdala komplex kóros elváltozásaihoz köthető betegségekben.

3. Anyag és módszer

3.1 Kísérleti állatok

Kísérleteim során patkány (*Rattus norvegicus*) és eger (*Mus musculus*) modellorganizmusokkal dolgoztam. A felhasznált patkányok 8-12 hetesek, és 300g körüliek; az egerek pedig 6-18 hetesek és 30 grammosak voltak.

Munkámhoz kétféle, genetikailag módosított egértörzset használtam, melyekhez Prof. Harkány Tibor támogatásával jutottam hozzá. A C57BL/6 genetikai háttérrel rendelkező secretagogin-hiányos egerekben (*scgn*^{-/-}) a secretagogin gén harmadik exonja után egy terminációs szignál található, melynek köszönhetően a génkifejeződés gátolt (MMRRC, Kalifornia) (Skarnes és mtsai 2011). A szintén C57BL/6 genetikai háttérű secretagogin-Cre (Cre, carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*) egerek előállítása során a mesterséges bakteriális kromoszóma-konstrukciót (BAC, Bacterial Artificial Chromosome) „Sleeping Beauty” transzpozon segítségével juttatták a genomba (Lee és mtsai 2001, Calvigioni és mtsai 2017).

Az állatkísérleteket az európai előírásoknak (86/609/European Communities Council), és a Semmelweis Egyetem Állatvédelmi Tanácsadó Testület Állatügyi Etikai Bizottsága által jóváhagyott (63/2000) kísérleti protokollnak megfelelően hajtottam végre, amelyek összhangban vannak a Fővárosi és Pest Megyei Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal Élelmiszerlánc- biztonsági és Állategészségügyi Igazgatóságának Járványügyi és Állatvédelmi Osztálya által kiadott útmutatásokkal. Az állatkísérleti engedélyek száma: PE/EA/1234-7/2017, 66.009/0145-WF/II/3b/2014, 66.009/0277-WF/V/3b/2017.

A felhasznált Wistar típusú albínó patkányokat a Semmelweis Egyetem Központi állatházából, illetve a Toxi-Coop Zrt-től rendeltük. Minden kísérleti állatot az intézetünkbe kerülése után az állatházban helyeztem el 12 órás fény és 12 órás sötét periódusban, a napszaknak megfelelően. A rágcsálók szükségletei szerint korlátlan élelem és víz („*ad libitum*”) állt rendelkezésükre, a környezeti paramétereket rendszeresen ellenőriztük (hőmérséklet, páratartalom, szellőzőrendszer). A kísérlettervezés során törekedtem az állatok számának minimalizálására, így összesen 70 db patkányt és 40 db egeret használtam fel.

3.2 Műtétek

Altatás, előkészítés: A pályakövetési vizsgálathoz szükséges műtéteket patkányokon végeztem, melyek végig narkózisban, mélyaltatásban voltak. A testtömegnek megfelelő mennyiségű ketamin (Calypsol, Richter; 60 mg/ttkg) és xylazin (Nerfasin, Le Vet Pharma; 12 mg/ttkg) keverékét intramuszkulárisan a hátsó combba, vagy intraperitoneálisan befecskendezve adtam be. 10-15 perc várakozási idő után a kísérletnek megfelelő módon, sztereotaxiás készülékkel rögzítettem az állatokat.

A secretagogin-Cre egereken végzett vírusinjektálások speciális, erre a célra kifejlesztett laborban történtek a Bécsi Orvostudományi Egyetem Agykutatói Központjában. A műtétek során a sztereotaxissal rögzített állatok altatását izofluránnal (5%, Forane, Abbvie), az állandó testhőmérséklet fenntartását pedig melegítőpaddal biztosítottam.

Retrográd pályakövetés: Retrográd pályakövetés során az általam beadott biotinilált dextrán-aminnal (BDA; 10 000 MW Molecular Probes, USA) az amygdaláris kimenetekkel rendelkező régiókat céloztam meg, majd az amygdalában kerestem a jelölődött sejtesteket. A koponyatetőn lévő szőr lenyírása után a patkányok fejét sztereotaxikusan rögzítettem, majd szikével saggitalis irányú, kb. 1.5 cm hosszúságú vágást ejtettem. A területet megtisztítva láthatóvá váltak a koponyavarratok és a bregma, mely utóbbi a koordinátákkal való tájékozódás kiindulópontja. A koordináták pontos meghatározásához Paxinos és Watson atlaszát vettem alapul (Paxinos és Watson, 2007). Fogorvosi fúró segítségével tártam fel a koponyát, majd sztereotaxishoz rögzített Hamilton pipettával juttattam be a BDA-t az agyvelőbe. Az amygdala ismert projektív területei közül a striatumot (Bregma 0.0 mm, középvonaltól 3 mm laterálisan, 6 mm ventrálisan az agyfelszíntől), a nucleus accumbens (Bregma +2.04 mm, középvonaltól 1.5 mm laterálisan, az agyfelszíntől 6.5 mm ventrálisan) és a bed nucleus of stria terminalis (Bregma -0.24 mm, középvonaltól 1.5mm laterálisan, az agyfelszíntől 6.5 mm ventrálisan) céloztam meg. A célterület nagyságához mérten állatonként unilaterálisan 0.1-0.4 µl jelölőanyagot juttattam be az agyvelőbe. A BDA-t előzőleg steril desztillált vízzel 10%-os koncentrációjúra oldottam fel. A beadást szakaszosan, hosszas szünetekkel, összesen 5 percig végeztem, ezzel elkerülve a hirtelen, nagy térfogat okozta szövetkárosodást. Ezután a műtéti terület feletti bőrt összevarrtam, majd az

állatok visszakerültek tároló dobozaikba. Az egy hetes túlélési idő kivárása után a transzkardiális perfúziót immunhisztokémiai analízis követte.

Vírusinjektálás: Vírusinjektálás során scgn-Cre egerek centrális amygdalájába (Bregma -1.46 mm, középvonaltól 2.5mm laterálisan, az agyfelszíntől 4.5 ventrálisan) juttattam be a megfelelő vírust mindkét agyféltekébe. A későbbi viselkedésbiológiai kísérlet kezelési csoportjainak megfelelően gátló (AAV8-hSyn-DIO-hM4D(Gi)-mCherry/Addgene 44362), aktiváló (AAV(-hSyn-DIO-hM3D(Gq)-mCherry/Addgene 44361), illetve kontroll (AAV8-hSyn-DIO-mCherry/Addgene 50459) vírust használtam (Krashes és mtsai 2011). A vírusokból agyféltekénként automata injektorral (Quintessential Stereotaxic Injector, Stoelting) 40nl-t fecskendeztem be 100nl/perc sebességgel, az általam előre elkészített üveg kapillárisal (Drummond), melyet az injektálás után 5 perc elteltével lassan távolítottam el az agyvelőből. A műtét után 3 hét elteltével az egereken félelem kondicionálás kísérletet végeztem a „Viselkedés kísérletek” című alfejezetben ismertetett módon.

Transzkardiális perfúzió, fixálás: Az agy kivételét mélyaltatásban történő transzkardiális perfúzió előzi meg, melynek során 100-150 ml fiziológiás, 0.9%-os sóoldattal átmostam az ereket az aortaíven keresztül, ezt követően pedig fixáltam az agyvelőt. A fixálás 250 ml, 4% paraformaldehidet (PFA) és 0.1% glutáraldehidet tartalmazó 0.1 mólos foszfát pufferrel (0.1M PB) történt. Az utófixálás során a kivett agyat az előző elegy glutáraldehid nélküli változatában hűtőszekrénybe, rázógépre helyeztem egy éjszakára. Másnap a fagyasztva metszésre szánt mintákat a krioprotekció érdekében áttettem 30%-os cukoroldatba, és legalább egy éjszakára visszatettem 4°C-ra.

3.3 Metszetek készítése

Metszés: A fixált agyvelőn pengék segítségével iránymetszéseket ejtettem, meghatározva és leszűkítve ezzel a metszés síkját, és a vizsgálandó terület nagyságát. Leica gyártmányú fagyasztó mikrotómmal 40-50 mikron vastagságú koronális metszeteket készítettem, melyeket műanyag metszettárolóba, 0.1M PB-be helyeztem. Minden ötödik metszet került egy helyre, azonos lyukba, így egy állatból 4 sorozatban készültek metszeteim. A felhasználatlan metszet-sorozatok nátrium-azidot tartalmazó 0.1M PB-ben tároltam egy esetleges későbbi kísérletre.

Az elektronmikroszkópos vizsgálatokra szánt beágyazott blokkokból ultravékony, 80 nm vastagságú metszeteket készítettem szakasszisztens segítségével (Reichert ultramikrotóm). Ezeket nikkel rácsra, „grid”-re húztuk fel (Formvar).

3.4 Immunfestések

Immunhisztokémia: A vizsgálni kívánt molekulák láthatóvá tételére, kolokalizációs, és kvantitatív vizsgálatára immunfestési eljárásokat alkalmaztam. Ennek során a kiválasztott metszeteket rázógépre (IKA KS 260) helyeztem, szobahőmérsékleten, 0.1M PB-ben mostam legalább 90 percen keresztül, a mosófolyadék többszöri cserélése mellett. Ezután következett a blokkolás, mellyel a nem specifikus másodlagos antitest kötődések számát csökkentettem. Ennek során a mintákat rázógépre helyeztem, és 2 órán keresztül inkubáltam azokat szobahőmérsékleten a blokkoló elegyben, ami 5% normál szamárszérumot (NDS; Jackson ImmunoResearch), és 0.3 % Tritont (Triton X-100, Merck) tartalmazott 0.1 M PB-ben feloldva. Az elsődleges ellenanyagot (lásd: 2. táblázat) megfelelő koncentrációban tartalmazó oldatban (0.3% Triton, 0.1% NDS, 0.1 M PB-ben), 4 °C-on inkubáltam a mintákat 2-3 éjszakán keresztül. Ezt követően többször mostam 0.1M PB-vel a metszeteket, majd rájuk tettem a számarban termeltetett, a fluoreszcens képanalízisnek megfelelően karbocianinnal konjugált másodlagos ellenanyagot (Jackson ImmonoResearch) 0.1 M PB-ben oldva. Utóbbi kiválasztásánál ügyeltem a primer antitestnek megfelelő fajspecifikusságra. Újabb, 4°C-on történő inkubálást követően rövid mosási lépések (2x10 perc) következtek. A metszetek tárgylemezre történő felhúzása előtt érdemes még egy egyéjszakás mosást beiktatni annak érdekében, hogy a mikroszkopizálás során minél élesebb felvételeket tudjunk készíteni.

Az elektronmikroszkópos előkészületek során a fixált agyvelőből izolált területeket ozmium-tetroxiddal történő kezelés után növekvő koncentrációjú, felszálló etil-alkohol sorral vízteleníttem. Intermedierek propilén-oxidot, a beágyazáshoz pedig epoxi-típusú műgyantát, Aralditot használtam. A beágyazás után („post-embedding”) következett az immunjelölés, melynek során a kívánt ellenanyaggal és kolloidális arany szemcsével konjugáltattam a grideken lévő mintákat. A kontrasztosítás során uranil-acetátot és ólom-nitrátot alkalmaztam.

A humán minták fénymikroszkópos vizsgálatához a peroxidáz enzimreakción alapuló diamino-benzidin (DAB) festést használtam. Ennek során a DAB hidrogén-peroxid jelenlétében oldhatatlan, sötét csapadékot képez, mely fénymikroszkóppal jól detektálható. A kísérletet Vector kitekkel végeztem a gyári protokolloknak megfelelően (DAB SK-4100, Vector).

Fixált sejtenyészeteken végzett immuncitokémiai jelölések: A sejteket a szén-dioxid termosztátból (Heal Force, HF 90) kivéve azonnal jégre tettem, majd 2x20 percig 0.1M PB-vel mostam azokat. Rázógép használata sejtenyészetek esetén nem szükséges, mivel ezek csak egysejtsor vastagságúak. Az immunfestések metszettartó edényben, kör alakú tárgylemezeken történtek. A sejtek tenyésztését az „*In vitro* módszerek” alfejezetben ismertetem. A fixálást 4%-os PFA-del végeztem 4°C-on, ezután már nem volt szükség a sejtek hidegen tartására, így a többi lépés szobahőmérsékleten történt. Az egy órás blokkolás után a blokkoló folyadékot (10% NDS, 5% marha szérum albumin – bovine serum albumin, BSA, Sigma-, 0.3% Triton 0.1M PB-ben) átcseréltem az elsődleges ellenanyagot tartalmazó elegyre (2% NDS, 0.1% BSA, 0.3% triton 0.1M PB-ben), amiben 4°C-on egy éjszakán át inkubáltam a sejteket. A következő napot 4x20 perces PB-vel történő mosással kezdtem, amit egy másfél órás másodlagos ellenanyaggal történő inkubálás követett. A másodlagos antitestet 1:500 arányban adtam a 2% BSA-t is tartalmazó PB-hez. A sejtmagfestést (5 percig 0.1M PB-ben, 1:1000-ben oldva Hoechst – Thermo Fisher Scientific) egy rövid mosási lépés követte, majd a fedőlemezen lévő sejteket 56 °C-os zselatin-glicerol (Sigma) segítségével rögzítettem a tárgylemezhez.

Felhúzás, lefedés: Az elkészült, immunfestett metszeteket desztillált vízzel teli Petri-csészében, zselatinnal bevont üveg tárgylemezre húztam fel. Pár perc száradási idő után elszívófülke alatt a tárgylemezeket egy xilol-alapú fedőoldattal (Leica Micromount) fedtem le.

2. táblázat: A kísérletek során felhasznált ellenanyagok

Ellenanyag	állatfaj	IHC, ICC	WB	gyártó	referencia
B-actin	egér	-	1:10 000	Sigma	(Lendvai és mtsai 2013)
B-III-tubulin	egér	1:2000	-	Sigma	(Tortoriello és mtsai, 2014)
bio-WFA	-	1.100	-	Sigma	(Lendvai és mtsai 2013)
calbindin	tengerimalac	1:500	-	Synaptic System	(Hanics és mtsai 2017)
calretinin	tengerimalac	1:500	-	Synaptic System	(Hanics és mtsai 2017)
c-fos	nyúl	1:7500	-	Santa cruz	(Renner és mtsai 2012)
GFP	tengerimalac	1:500	-	Synaptic System	(Batiuk és mtsai 2017)
GluN2AB	nyúl	1:250	1:1000	Synaptic System	(Gut és mtsai 2013)
parvalbumin	egér	1:2000	-	Sigma	(Caillard és mtsai 2000)
Pho-NR2B	nyúl	-	1:1000	Cell Signaling	(Hevesi és mtsai 2021)
PKC δ	egér	1:1000	-	BD Transduction laboratories	(Botta és mtsai 2015)
PSD-95	egér	-	1:2000	Sigma	(Ling és mtsai 2015)
RFP	nyúl	1:4000	-	Rockland	(Ortega és mtsai 2013)
secretagodin	nyúl	1:10 000	1:10 000	Ludwig Wagner	(Romanov és mtsai 2015)
secretagodin	kecske	1:100	1:1000	R&D Systems	(Mulder és mtsai 2010)
synaptophysin	nyúl	-	1:5000	Synaptic System	(Alpar és mtsai 2014)

3.5 Western blot analízis

Minták előkészítése: A minták fehérjetartalmát Western blot analízissel határoztam meg, melyhez sejtvonalakat, illetve patkányból és egerből származó agyi régiókat is felhasználtam. Minden esetben fontos volt a sterilitás fenntartása, melyet az eszközök és a munkafelület rendszeres alkoholos tisztításával biztosítottam.

Sejtek esetében a termosztátból kikerülő mintákat azonnal jégre helyeztem, majd kétszer pár percig mostam azokat 0.1M PB-vel. Az aljzathoz tapadt sejteket a felületről proteáz inhibitor (PI, Roche) tartalmazó RIPA-val (radioimmunoprecipitation assay buffer) lazítottam fel, majd mechanikusan egy műanyag, egyszer használatos spakni segítségével szedtem fel.

A 10-12 hetes patkányokat dekapitáltam, gyorsan eltávolítottam és jégre helyeztem az agyvelőket. Ügyelve arra, hogy az eszközök és a minta hideg maradjon, óvatosan egy mátrix és egy penge segítségével a szükséges régióból 1mm vastag szeleteket készítettem. Ezekből a szeletekből szikepengével izoláltam a vizsgálni kívánt célterületet sztereomikroszkóp alatt. A homogenizálást proteáz gátlót tartalmazó lízis pufferben, RIPA-ban végeztem, egy cserélhető műanyag fejjel rendelkező elektromos homogenizátor segítségével (Sigma, pellet pestles).

A következő fázistól a kétféle típusú minta előkészítése egyforma. A centrifugálási lépés (15.000 rpm, 4°C, 30 perc. Heal Force Neofuge 15R) során keletkezett felülúszó fehérjekoncentrációját megmértem (Thermo Scientific NanoDrop 1000 spektrofotométer), majd a minták összehasonlíthatóságának érdekében normalizáltam őket 2µg/µl-re PI-t tartalmazó RIPA-val. Végül egynegyed rész ötszörös töménységű Laemmli oldattal 95°C-on forraltam őket (bioSan TDB-120 száraz blokktermosztáttal) öt percen keresztül. Az elkészült mintákat jégre helyeztem, majd felhasználásig -20°C-on tároltam őket.

Western blot: Az analízis első lépése a poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE), melynek során a mintákban lévő fehérjék elektromos töltés hatására méret szerint szétválnak. Ehhez először összeraktam a futtató kádat: belehelyeztem az előre elkészített 10%-os poliakrilamid gél, és a futtató puffert is beleöntöttem. A gél zsebeibe Hamilton fecskendő segítségével egyenként 4 µl „létrát” – vagyis többszínűen festődő, különböző nagyságú fehérjekeveréket (Bio-Rad Precision plus protein Kaleidoscope

Standard) - és 12,5 µl mintát töltöttem be. (Ettől a mennyiségtől csak immunprecipitációból származó minták esetén tértem el. Ott a minta töménysége miatt a felhasznált térfogat csak 3µl volt.) Ezután az elektroforézishez szükséges tápegységet beállítottam 40 voltra (V)-, és 8 percre (Bio-Rad Powerpac HC), majd további 50 percig futtattam 150 V-n. A gélben molekulatömeg szerint szétvált fehérjéket metanollal aktivált polivinil-difluorid membránra (Immobilon-FL PVDF, Millipore) transzferáltam, „szendvicsbe” illesztett gélt transzfer pufferben, jéggel körülvéve egy órán keresztül 100 V-n. A blokkolást 3% BSA-t tartalmazó mosó pufferben, szobahőmérsékleten, rázógépen végeztem. A primer antitestet 3% BSA-t tartalmazó mosópufferben 1:1000-ben hígítva egy éjszakán át hűtőben, rázógépen reagáltattam a membránnal. A következő napon hosszú, mosópufferrel történő mosási lépések (minimum 4x20 perces) után a membránt egy órán át inkubáltam rázógépen, szobahőmérsékleten a szekunder ellenanyaggal (Jackson ImmunoResearch, mosópufferbenben hígítva 1:10 000 arányban). Többszöri mosás után következett az előhívás. A normalizáláshoz β-actint használtam, hogy a mintákban össze tudjam hasonlítani a vizsgált fehérjék szintjét.

3.6 Sejtfrakcionálás

Szinaptoszóma izolálás: A sejtfrakcionálási eljárás során az egyes sejtalkotókat különböző töménységű cukoroldatok segítségével, centrifugálással különítettem el egymástól. A mintát homogenizálni kell a kísérlet előtt. Ehhez a patkányokat narkózisban hideg fiziológiás sóoldattal perfundáltam, a kivett agyvelőből a már ismertetett módon izoláltam a szükséges régiókat (amygdala, kontrollnak szaglógumó), majd ezek tömegének a tízszeres mennyiségét adtam hozzá PI-t tartalmazó 10 tömegszázalékos 0.32M szacharóz-HEPES 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) pufferből. Az Eppendorf csövekben lévő mintákat 4°C-on 600xg-n centrifugáltam 10 percig. A kapott sejtörmelék (pellet) tartalmazza a magi frakciót, melyre ebben a kísérletben nem volt szükségem. A felülúszót 1:1 arányban 1.3M HEPES-szacharóz tetejére rétegeztem óvatosan, és 20.000xg-n 4°C-n 30 percig tovább centrifugáltam. Az Eppendorf csövek alsó harmadánál keletkezett pellet tartalmazta a szinaptoszómákat (Mcgovern és mtsai 1973, Kamat és mtsai 2014). Ehhez 100 µl proteáz gátlóval kevert RIPA lízis puffert adtam, majd elvégeztem a fentebb leírt

módon a Western blot analízishez szükséges előkészítő lépéseket. A mintákat felhasználásig -20°C -n tároltam.

Posztszinaptikus denzitás izolálása: A posztszinaptikus denzitás izolálása során alkalmazott homogenizálási eljárás egy speciális, magnéziumtartalmú elegyben történt (0.32M szacharóz, 1mM NaHCO_3 , 1mM MgCl_2 , 0.5mM CaCl_2 , PI), a szinaptoszóma kinyerésnél leírtakhoz hasonló módon. Egy rövid, kis fordulatszámú történő centrifugálás (470xg, 4°C , 2 perc) után a felülúszóból egy újabb, nagyobb fordulatszámú centrifugálás következett (10 000xg, 4°C , 10 perc). A keletkező pelletet 500 μl 0.32M HEPES-szacharózban feloldottam, majd 750 μl 0.8 M-os HEPES-szacharóz tetejére rétegeztem óvatosan. Az újabb centrifugálással (9100xg, 4°C , 15 perc) kapott pelletet egy speciális oldatban (20 mM HEPES, 2% triton-X 100, 150 mM KCl) fellazítottam, majd tovább centrifugáltam (20.800xg, 4°C , 45 perc). A feülúszó a preszinaptikus frakciónak felel meg, a pelletet pedig egy Tritont és káliumot tartalmazó oldattal (1% triton_x 100, 75 mM KCl) történő centrifugálással (20.000xg, 4°C , 30 perc) tisztítottam tovább (Dosemeci és mtsai 2006, Tao és mtsai 2013). Az ekkor keletkező pellet tartalmazza a posztszinaptikus denzitást, melyet 100 μl proteínáz gátlót tartalmazó RIPA pufferben oldottam fel (Dosemeci és mtsai 2006). A mintát Western blot analízisre készítettem elő a már ismertetett módon, majd felhasználásig -20°C -on tároltam.

Az általam izolált sejtalkotókban az adott frakcióra jellemző fehérje domináns meglétét Western blottal ellenőriztem, és hasonlítottam össze egymással. A preszinaptikus frakciót a synaptophysin-, a posztszinaptikus frakciót pedig PSD-95 jelenléte alapján azonosíthatjuk. Kontrollként amygdalából és szaglógumóból készült homogenizátumot használtam.

3.7 Immunprecipitáció

Immunprecipitáció: A vizsgálni kívánt sejtízátum fehérje-fehérje kapcsolatainak felderítésére alkalmas módszer az immunprecipitáció. Az eljárás során egy specifikus antitesthez kapcsoltuk a vizsgálni kívánt fehérjét, majd antitesthez kapcsolódni képes, kereskedelmi forgalomban kapható „mágnest” (Dynabead, Novex, Life technologies) adunk a rendszerhez, melyet egy erre specifikus eszközzel ki tudunk nyerni a mintából.

Az ellenanyagon keresztül a mágneshez rögzített fehérjénkkal együtt az interakciós partnerek is belekerülnek az izolátumunkba, melyeket Western blot analízissel azonosíthatunk.

A kísérlethez frissen izolált agyi struktúrát használtam fel, melyet 300µl proteáz gátlót tartalmazó HEPES pufferben homogenizáltam. Egy centrifugálási (15.000 rpm, 4°C, 30 perc) lépés után a felülúszóból fehérjeszintet mértem, majd normalizáltam a mintákat 1µg/µl-re. A mágneset többször tisztítottam lízis pufferrel, majd 15 µl-t hozzáadtam belőle minden mintához. Ezeket 45 percig hűtőszekrényben, folyamatos keverés mellett reagáltattam egymással. A mágneset, és vele együtt az aspecifikusan hozzá kötődő anyagokat eltávolítottam az Eppendorf csövekből. Ezután 450µl mintánként 3µl primer ellenanyaggal rázattam a mintákat hűtőszekrényben, egy éjszakán át. Másnap a csöveket 45µl mágnessel inkubáltam 3-4 órán keresztül 4°C-on. A mágneset legalább háromszor mostam lízis pufferrel, majd 40 µl 2X Laemmlis oldattal hőkezelttem 95 °C-on 5 percig. Végül a mágnesek eltávolítása után a kész mintákat új Eppendorf csövekben, fagyasztószekrénybe helyeztem.

3.8 Viselkedés kísérletek

Félelem kondicionálás: Az amygdalával köztudottan kapcsolatba hozható viselkedési elemek közül elsőként a kondicionált félelmet vizsgáltam patkányokon. Az első kísérleti napon minden állat 10 percet töltött a kondicionáló dobozban annak érdekében, hogy megszokják a környezetet. A második napon egy 10 perces, számítógépről vezérelt program során 5 feltételes-feltétlen inger párosítást kaptak (6/A ábra). Feltételes, számukra semleges ingerként egy 80 decibel erősségű síp hangot alkalmaztam. A nem kondicionált, kellemetlen inger 0,8 milliamper (mA) erősségű áram volt. A síphang 20 másodpercig tartott, ennek végén érte az állatot áramütés a padlórácsra keresztül (Gewirtz és Davis 2000, Dalton és mtsai 2012). Többszöri párosítás után a rágcsálók hamar megtanulják, hogy a semleges ingert egy fájdalmas fogja követni. A harmadik napon áramütés nélkül, csak síphangot kaptak a patkányok. Összesen 20 darab hím állatot használtam fel, melyeket 3 kezelési csoportba osztottam be: stresszelt, kontroll, abszolút kontroll. A kontroll állatok a kísérlet alatt végig csak hang ingert kaptak, az abszolút kontroll csoportba tartozók pedig semmilyen kezelést nem kaptak,

dekapitálásig a dobozukban tartottam őket. Minden nap ugyanabban az időben (délelőtt 10 óra) kezdődtek a vizsgálatok, az állatok ugyanannyi ideig tartózkodtak a kondicionáló dobozban, és ugyanolyan sorrendben következtek egymás után. Minden állat után előbb szappanos vízzel, majd 70%-os etil-alkohollal takarítottam ki a kísérleti ketrecet, ezzel elkerülve azt, hogy a patkányokban az előttük lévő szagnyomok félelmi reakciót válthassanak ki. A kísérlet végén (a program lejárta után pár percen belül) az állatokat dekapitáltam, eltávolítottam az agyvelőket, majd izoláltam belőlük az amygdalát. Minden egyedből készítettem mintát Western blot analízisre, és immunprecipitáció vizsgálatra is.

A kísérletet ugyanezen módszerrel megismételtem secretagogin génkiütött (*scgn*^{-/-}) egereken is. Ehhez 11 darab *scgn*^{-/-} (tíz nőstény és egy hím) és 10 darab vad típusú (8 nőstény és 2 hím) állat állt rendelkezésemre. Ezeket stresszelt és kontroll csoportokra osztottam. A patkányokon végzett kísérleti eredményeket figyelembe véve (ahol a két kontroll csoport között nem figyeltem meg különbséget), elégségesnek tartottam az egy kontroll csoportot, melyek csak síphangot kaptak a programban.

A secretagogin-Cre egerek félelem kondicionálása során (az állatszám optimalizálásának érdekében) a beadott vírusnak megfelelően 3 kezelési csoport volt: aktiváló (3 nőstény, 2 hím), gátló (5 nőstény, 2 hím), és kontroll (4 nőstény, 3 hím). Ebben a kísérletben minden állat a fentebb ismertetett módon megkapta a hanginger-sokk párosításokat, így csak stresszelt egerekkel dolgoztam. Az egerek a második kísérleti napon, a kondicionálás előtt 30 perccel intraperitoneális CNO (clozapine N-oxide, 1mg/ttkg, Tocris) injekciót kaptak. A CNO aktiválja az agyvelőkbe injektált vírust, mely ezáltal a konstrukciójának megfelelően aktiválni vagy gátolni fogja a Cre-tartalmú sejteket. A kontroll vírus esetében sem aktiválás, sem gátlás nem történik. Ennek a kemogenetikai módszernek, és az ehhez szükséges secretagogin-Cre egereknek köszönhetően lehetőségem volt a vírus injektálási helyével lokálisan, a CNO injekcióval pedig időben szabályozva vizsgálni a secretagogin-tartalmú neuronok funkcióját. A harmadik napon a kondicionáló doboz egyik falát más mintázatúra cseréltem, illetve a fertőtlenítéshez másfajta tisztítószer alkalmaztam. Ezzel kizártam annak a lehetőségét, hogy az egerekből a doboz, mint inger váltsa ki a válaszreakciót (Phillips és Ledoux 1992). A kísérlet végeztével az állatokat (a megfelelő fejezetben ismertetett módon)

perfundáltam, a fixált agyvelőkből készített metszeteken pedig immunfestéseket alkalmaztam.

Predátor szag teszt: A kondicionálatlan, ösztönös félelem vizsgálatára a patkányok elé az egyik természetes ragadozójuknak, a házimacskának (*Felis catus*) vizeletével átitatott almot helyeztem (Ganella és Kim 2014). Összesen 14 felnőtt korú, hím patkányt osztottam be négy csoportba. A kontroll csoporton kívüli csoportok között a kezelés és a dekapitálás közötti időben volt különbség (30, 60, vagy 90 perc). Az első kísérleti napon, a szoktatás során minden patkány egyesével, egymás után 10 percet töltött a kísérleti ládában. A második nap alkalmával a kontroll egyedek ládájában normál, tiszta macskaalom, míg a stresszelt állatok elé vizelettel átitatott alom került. A kísérletre 5 perc elég volt, mivel az állatok védekezési „freezing” reakciója azonnal, egyértelműen érzékelhető volt. A végén a patkányokat dekapitáltam, majd az amygdalából készült mintákon immunprecipitációt végeztem.

A viselkedések elemzéséhez minden kísérleti napon, minden egyedet kamerával rögzítettem. A felvételek segítségével kiszűrhetőek az egyedi különbségek, ellenőrizhető a kísérlet sikeressége, illetve megerősíthetőek a molekuláris biológiai eredmények. Az általam leggyakrabban tanulmányozott viselkedésváltozók a ledermedési reakció, illetve a kísérleti dobozban bejárt terület/távolság voltak.

Formalin stressz: A stresszválaszok tanulmányozásának egyik legegyszerűbb módja, ha a kezeléssel fájdalmat okozunk az állatnak. Erre alkalmas a formalin injekció beadása. Ehhez 4%-os PFA oldatotból 100 μ l-t fecskendeztem patkányok hátsó combjába intramuszkulárisan, majd 40 perces várakozási idő után következett a dekapitáció. Az agyvelőket immunfestésre dolgoztam fel.

3.9 In vitro módszerek

Primer sejtenyészet indítása: Az embrionális kor 20. napján, közvetlenül a megszületés előtt 6-8 patkány embrióból kivett agyvelőből sztereomikroszkóp segítségével izoláltam az amygdala területét. Az izolálás jégen, HBSS (Hank's balanced salt solution Gibco, Life technologies) oldatban történt, az eltávolított amygdala mintákat pedig 2 ml

DMEM-t (Dulbecco's modified eagle medium Gibco, Life technologies) tartalmazó csavaros centrifugacsőbe gyűjtöttem. Ezt pipetta segítségével homogenizáltam, majd 4 percen keresztül centrifugáltam (21 °C, 3000 rpm). A keletkező pelletet 2ml 0.1%-os tripszin oldattal (törzsoldat: 2,5%-os tripszin. Gibco, Life technologies) 3-4 percen át 37 °C-os vízfürdőben kezeltem. Ezután 2ml BSA-DNÁzt hozzáadva és pipettával elegyítve, míg a minta homogén nem lett, újra centrifugáltam (3000 rpm, 21 °C, 4 perc). A kapott sejttömeget 2ml médiummal (12,5 ml DMEM, 12,5 ml F12 – Gibco, 0,5 ml B27 – Gibco) tisztítottam kétszer (4 perc, 3000rpm, 26 °C). A sejtszámot Bürker-kamra segítségével állapítottam meg, majd ennek megfelelően kiültettem műanyag plate-re a sejteket (2×10^6 /rekesz a 6 lyukú tenyésztőedényben, 4×10^5 /rekesz a 24 lyukú tenyésztőedényben). A plate-t előzőleg poli-D-lizinnel (PDL, 1:1000, Sigma) vontam be, hogy jobb tapadási felületet biztosítsak a kiültetéshez. A tápoldat (médium) felét a primer sejtenyészet felhasználásáig kétnaponta frissre cseréltem.

Sejtvonalak fenntartása: Munkámhoz kétféle immortalizált sejtvonalat használtam. Az egyik egy patkány hasnyálmirigy tumor-eredetű insulinoma (INS-1E, P. Maechlen jóvoltából) sejtvonal (Merglen és mtsai 2004), a másik egy humán neuroblasztóma (SH-SY5Y) sejt kultúra. A sejteket a számukra megfelelő tápoldatot tartalmazó műanyag tenyésztő flaskában, fiziológiás körülményeket biztosító termosztátban tartottam. (INS-1E médium: antibiotikumot – PenStrep-, nátrium-piruvátot és 2-merkaptoetanol tartalmazó RPMI oldat 5% borjúsérummal - FBS: fetal bovine serum-; SHSY-5Y médium: antibiotikumot, és nátrium-piruvátot tartalmazó DMEM és F12 1:1 arányú keveréke 5% FBS-sel.) (RPMI, PenStrep, nátrium-piruvát, 2-merkaptoetanol, FBS: Gibco, Life technologies). A médiumot 2-3 naponta cseréltem. Amikor a tenyészet majdnem benőtte a rendelkezésére álló teret (80%-os konfluencia), a sejteket passzáltam. Ennek során 0.8%-os tripszinnel 3 percig termosztátban lizáltam a sejteket, majd centrifugálással (3000rpm, 5 perc, 25°C) üleptettem le azokat. A kapott pelletet tápoldatban oldottam fel, és új flaskákba osztottam szét a sejteket, vagy további kísérletre készítettem elő azokat.

Transzfektálás: A géncsendesítési eljárás során rövid interferáló ribonukleinsavat (kis interferáló RNS, siRNS, Santa Cruz), más kísérletekben pedig plazmidot, tehát

cirkuláris dezoxiribonukleinsavat (DNS) vittem be a sejtvonalakba. A plate-re való kiültetés másnapján a transzfektáló ágenshez (Polyplus, jetPrime) adtam a DNS-t/RNS-t, vagy mindkettőt, és az így kapott oldattal egészítettem ki a sejtek médiumát. A sejtvonalatokat visszahelyeztem a termosztátba, és 24 óra elteltével Western blot analízisre dolgoztam fel őket a Western blot analízis fejezetben ismertetett módon.

Munkám során egy pH-érzékeny GFP-vel (green fluorescent protein) jelölt NR2B alegységet kódoló plazmidot használtam fel (pCI-SEP_NR2B, Addgene, 23998) (Kopec és mtsai 2006). A baktériumokból a plazmidot a gyári protokollnak megfelelően nyertem ki (Thermo Scientific, GeneJET Plasmid Midiprep Kit).

3.10 FRAP (fluorescence recovery after photobleaching)

FRAP analízis: Az élősejtes FRAP analízist Dr. Schlett Katalin jóvoltából, és segítségével az Eötvös Loránd Tudományegyetem Élettani Tanszékén végeztem. Ennek során SHSY-5Y sejteket speciális, négyosztatú, üvegaljú Petri csészére ültettem ki (80.000/rekesz, Greiner Bio-one, VWR, Canada). A sejtekbe pCI-SEP_NR2B plazmidot (Kopec és mtsai 2006), illetve a kezelési csoportnak megfelelően secretagogin-, vagy kontroll kis interferáló RNS-t juttattam be egyidejűleg. A transzfekciót a gyári protokollnak megfelelően hajtottam végre: 1 µg siRNS-t, és 50nM RNS-t adtam rekeszenként a sejtekhez (Polyplus jetPrime). 24 óra elteltével a tápoldatot kicseréltem egy, a képkötésnek megfelelő, úgynevezett LCI pufferre (142 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1 mM NaH₂PO₄, 25 mM HEPES, 5 mM glükóz, 0.8 mM MgCl₂; pH 7.4).

Yokogawa CSU-X spinning disk-kel ellátott Zeiss Cell Observer rendszerrel végeztük a kísérleteket. A kijelölt területeken a fluoreszcencia kioltása („bleaching”) a Firefly2 rendszerrel, és 473nm-es Rapp lézerrel történt (15%-os erősség, 2 másodperc időtartamig).

Minden kiválasztott sejtről 10 perces felvételt rögzítettünk, melynek képkockái 5 másodpercenként készültek. Minden esetben PlanApochromat 40x/1,4 objektívvel vizsgáltunk.

A kísérlet során összesen 10 kontroll, és 9 secretagodin géncsendesített sejt került elemzésre. A sejteket végig, a mikroszkopizálás alatt is 37°C-on tartottam.

Kontrollkísérlet változó pHértéken: SH-SY5Y sejteket PDL-lel borított plate-re ültettem ki, és 10%-os FBS-t tartalmazó DMEM/F12 médiumban tartottam fent azokat. A kiültetés másnapján a sejteket 6 óra hosszan 1%-os FBS-t tartalmazó DMEM/F12 médiumban inkubáltam, melyhez 10 μ M retinsavat adtam (Sigma, R2625). Az előzőleg ismertetett módon pCI-SEP_NR2B plazmiddal, illetve secretagodin siRNS-sel transzfektáltam a sejteket. A következő napon inkubátorral ellátott mikroszkópba (EVOS FL Auto 2, Thermo Fisher) helyeztem a plate-t, és a médiumot fiziológiás oldatra (130 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 1 mM NaH₂PO₄, 1 mM CaCl₂, 5 mM glükóz és 25 mM HEPES; pH 7.4) cseréltem. A savas médium (130 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 1 mM NaH₂PO₄, 1 mM CaCl₂, 5 mM glükóz, 25 mM HEPES, 4-morpholineethanesulfonic acid; pH 6.0) alkalmazását követő 3 percen képeket készítettem. Végül az ammónium-kloridot tartalmazó oldat (80 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 1 mM NaH₂PO₄, 1 mM CaCl₂, 5 mM glükóz, 25 mM HEPES, NH₄Cl; pH 7.4) következett. A felvételek 40x objektívvel készültek.

3.11 Humán minták

Humán minták: Az emberi szövetmintákat a Prof. Palkovits Miklós által vezetett Humán Agyszövet Bank és Laboratórium bocsátotta elérhetővé számomra (lásd: 3. táblázat). A minták öngyilkosságban elhunyt, valamint kontrollként használt, hasonló életkorú neurodegeneratív elváltozás jeleit nem mutató emberekből származtak.

A minták fehérjetartalmát Western blot módszerrel állapítottam meg és hasonlítottam össze, melynek során az állatkísérleteknél alkalmazott technikákhoz hasonló módon jártam el.

3. táblázat: A kísérletek során felhasznált humán amygdala minták

Azonosító	Halál oka	Életkor (év)	Nem	Poszt-mortem idő (óra)	Analízis
# 20	Akut tüdőgyulladás	37	Nő	2	WB, IHC
# 90	Szívinfarktus, tüdőembólia	78	Nő	1,5	WB, IHC
# 125	Szenilis paranoid pszichózis	80	Férfi	4	WB, IHC
# 170	Áramütés	37	Férfi	8	WB
# 220	Tüdőembólia	63	Férfi	3,5	WB
# 228	Embólia	27	Férfi	8	WB
# 236	Fulladás	21	Férfi	11	WB
# 256	Hasnyálmirigy rák	67	Férfi	10	WB
# 281	Stroke	74	Férfi	2,5	WB
# 138	Szuicid	52	Férfi	3	WB
# 171	Szuicid	31	Férfi	8	WB
# 243	Szuicid	35	Férfi	6	WB

3.12 Képpalkotás, kvantitatív analízis

Képpalkotás: A képfeldolgozás során az immunfluoreszcens mintákat konfokális lézerpásztázó mikroszkóppal (Zeiss LSM780) vizsgáltam, az ehhez kapcsolódó kvantitatív analíziseket pedig ZEN szoftverrel végeztem.

A beágyazás után („post-embedding”) arannyal konjugáltatott ultravékony metszeteket JEOL típusú elektronmikroszkópban vizsgáltam meg (JEOL 1200 EMX).

Western blot analízisnél a membránt előhívás (Biorad ChemiDoc MP) után ImageLab programmal elemeztem ki (ImageLab 3.01, Bio-Rad).

A viselkedésbiológiai kísérletekről készült videofelvételeket kétféleképpen elemeztem: Solomon Coder-rel az egyes viselkedési elemek hosszát rögzítettem, és EthoVision-nel

(Noldus EthoVision 10.1, Noldus Information Technology, Netherlands) pedig a mozgási mintázatokról készítettem intenzitásfüggő térképet („heat map image”).

A mikroszkóppal elkészített, és a megfelelő szoftverrel kielemezett felvételeket CorelDraw X7 képszerkesztő programmal illesztettem össze.

Statisztikai analízisek: A statisztikai analíziseket Statistica szoftverrel végeztem (StatSoft, 13.2 verzió). A hisztokémiai, és a Western blot vizsgálatok eredményeinek kiértékelésekor Student-féle t próbát, míg a viselkedésbiológiai kísérleteknél ANOVA varianciaanalízist alkalmaztam. A FRAP kísérlet adatai IBM SPSS Statistics szoftverrel kerültek elemzésre, ahol Shapiro-Wilks'-s-, és Mann-Whitney teszttel, illetve Student-féle t próbával végeztük a statisztikai analíziseket.

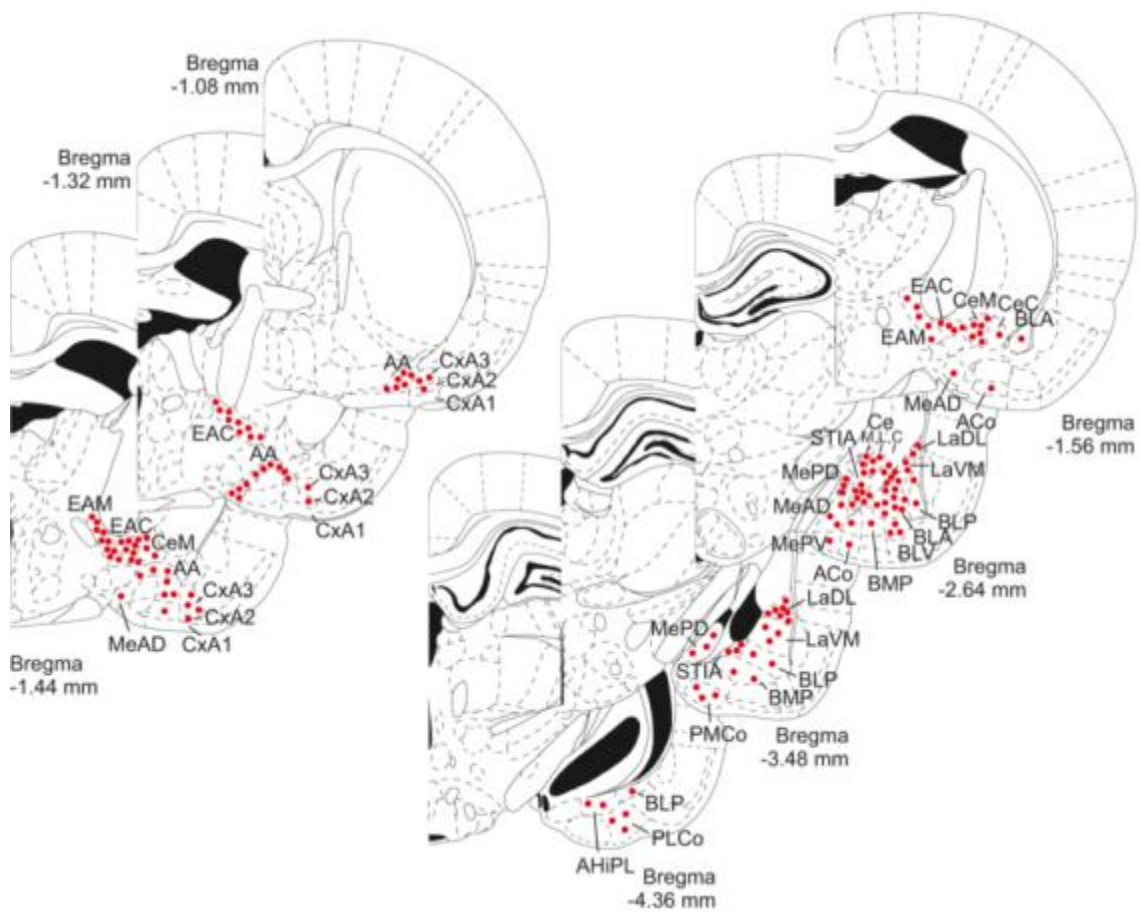
A kapott értékeket statisztikailag szignifikánsnak tekintettem, amennyiben p-értékük kisebb volt 0,05-nél. Ezt az ábrákon csillaggal jelöltem.

4. Eredmények

4.1 A secretagogin-tartalmú neuronok morfológiája, és eloszlása az amygdala komplex különböző alegységeiben

Az emlős amygdala egy összetett agyi régió, mely fejlődéstani és funkcionális szempontból több részre osztható fel. Patkány agyvelőből (n=3) készült sorozatmetszeteken végzett immunhisztokémiai eljárással elkészítettem a secretagogin-tartalmú neuronok eloszlási térképét az amygdala egész területén (7. ábra). Ezek a neuronok ugyan különböző gyakorisággal, de minden alegységben megtalálhatóak. A legtöbb secretagogin-pozitív sejt a centrális-, és az extended amygdala területén figyelhető meg. A centrális amygdala laterális részén jóval magasabb jelintenzitás mérhető, mint a mediális-, vagy a kapszuláris divíziókban (4/B ábra). Az extended amygdala mindkét részét, illetve az elülső magokat a secretagogin-immunoreaktív sejtek gazdag populációja jellemzi. A bazolaterális amygdalán belül secretagogin-tartalmú sejteket legnagyobb számban az elülső-, és a dorzolaterális területeken fedeztem fel, a hátsó magokban kevesebb immunoreaktív neuron figyelhető meg. A legkevesebb secretagogin-tartalmú neuront a kortikális területeken találhatunk.

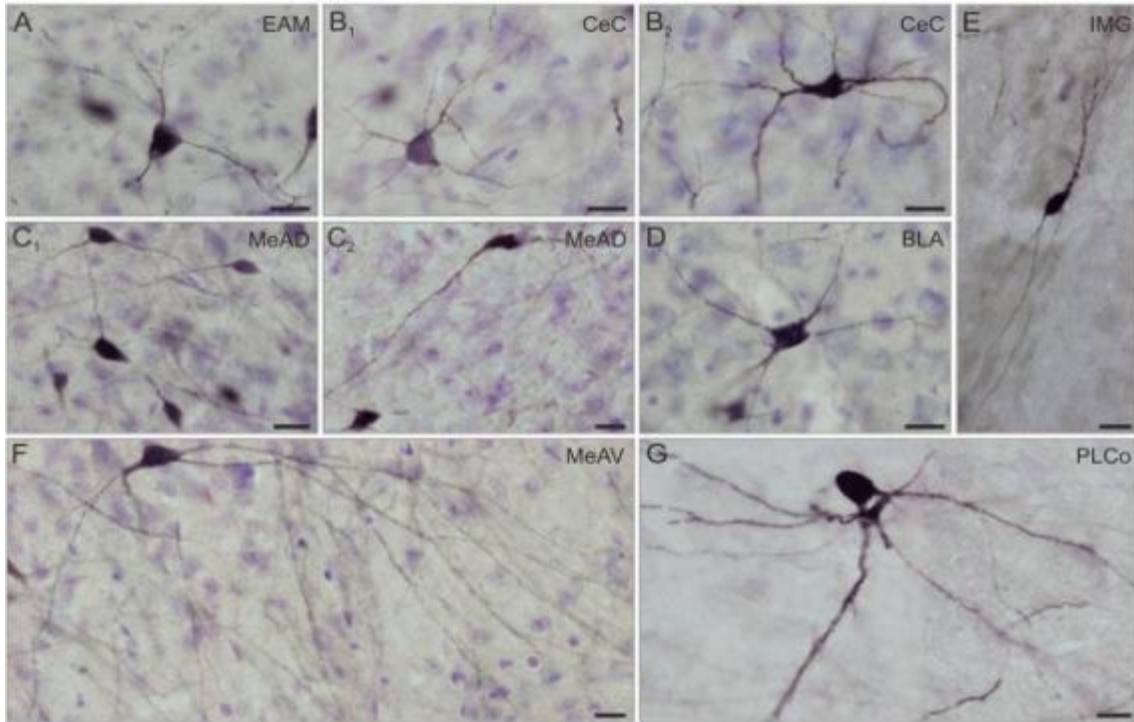
A secretagogin-immunoreaktív sejtek morfológiai szempontból multipolárisak (8/A, B₁, B₂, C₁, D, F, G ábra), megfigyeltem ugyanakkor néhány ovális sejttesttel rendelkező, orsó-alakú, bipoláris sejtet is (8/C₂, E ábra). A dendritfák alakja változatos, felszínük sima, dendrittüskék nem jellemzőek. Hasonló sejtalaktani megfigyeléseket az interneuronokkal kapcsolatban tettek korábban patkány amygdalában (McDonald 1982, Sah és mtsai 2003).



7. ábra: A secretagodin-pozitív neuronok expressziós térképe patkány amygdalában

A szövettani vizsgálatok secretagodin-pozitív idegsejteket mutattak ki a patkány amygdala komplex minden alegységében, különös tekintettel a centrális régióra. A piros pöttyök a relatív sűrűséget jelölik.

AA, anterior amygdaloid area; ACo, anterior cortical amygdaloid nucleus; AHiPL, amygdalohippocampal area, posterolateral part; BLA, basolateral amygdaloid nucleus, anterior part; BLP, basolateral amygdaloid nucleus, posterior part; BLV, basolateral amygdaloid nucleus, ventral part; BMP, basomedial amygdaloid nucleus, posterior part; CeC, central amygdaloid nucleus, capsular part; CeL, central amygdaloid nucleus, lateral division; CeM, central amygdaloid nucleus, medial division; CxA1-CxA3, cortex-amygdala transition zones, layers 1-3; EAC, sublenticular extended amygdala, central part; EAM, sublenticular extended amygdala, medial part; LaDL, lateral amygdaloid nucleus, dorsolateral part; LaVM, lateral amygdaloid nucleus, ventromedial part; MeAD, medial amygdaloid nucleus, ant dorsal; MePD, medial amygdaloid nucleus, posterodorsal part; MePV, medial amygdaloid nucleus, posteroventral part; PLCo, posterolateral cortical amygdaloid nucleus; PMCo, posteromedial cortical amygdaloid nucleus; STIA, bed nucleus of stria terminalis, intraamygdaloid division.



8. ábra: Secretagoin-tartalmú neuronok morfológiája patkány amygdalában

A secretagoin immunfestés főként multipoláris neuronokat (A, B₁, B₂, C₁, D, F, G), elvértve bipoláris idegsejteket (C₂, E) jelöl.

BLA basolateral amygdaloid nucleus, anterior part; CeC central amygdaloid nucleus, capsular part; EAM sublenticular extended amygdala, medial part; IMG amygdaloid intramedullary gray; MeAD medial amygdaloid nucleus, ant dorsal; MeAV medial amygdaloid nucleus, anteroventral part; PLCo posterolateral cortical amygdaloid nucleus. Méretskála: 10 μ m.

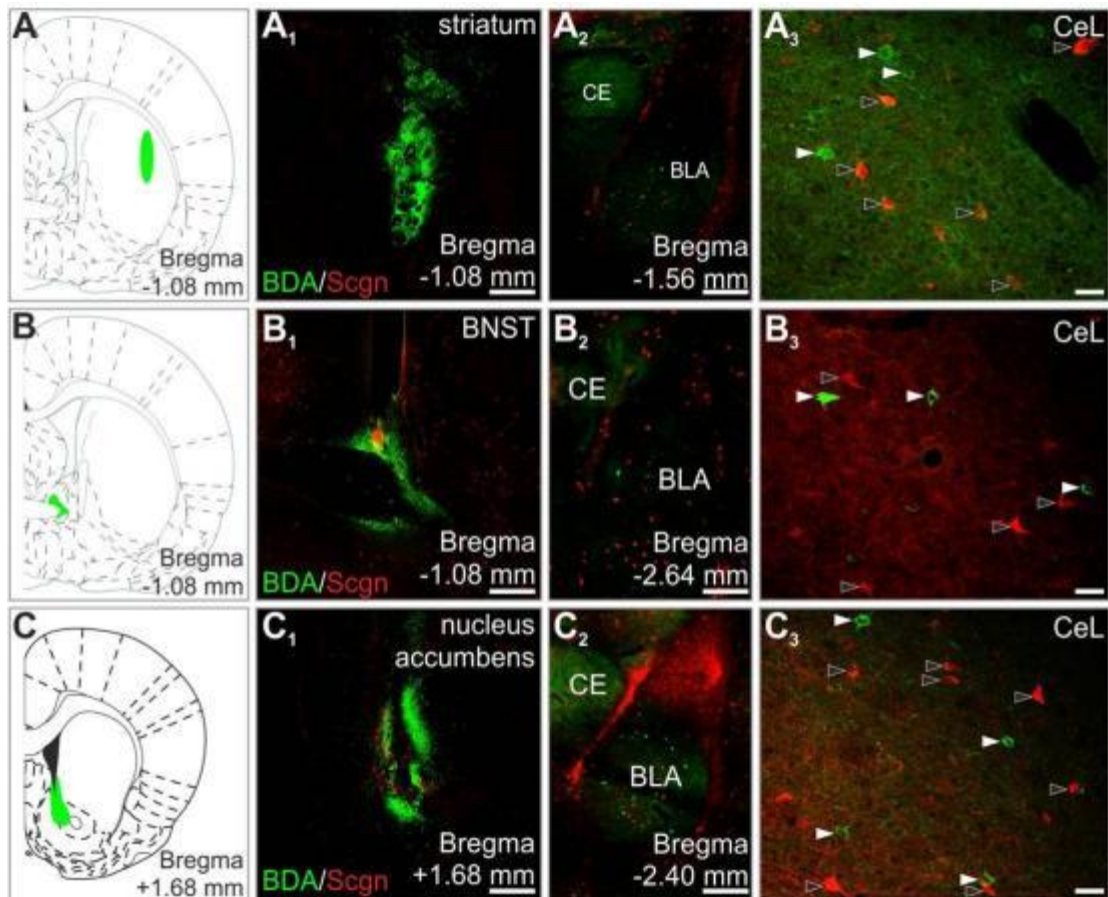
4.2. A secretagogin-pozitív idegsejtek interneuron-jellegének meghatározása

Az idegsejteket axonjaik alapján hagyományosan két nagy csoportra oszthatjuk: projekciós-, és interneuronokra. A projekciós neuronok axonjai a sejttesttől messze, más struktúrában végződnek, távoli agyterületekkel teremtve ezzel kapcsolatot. Ezzel szemben az interneuronok axonjai a közelben végződnek, dúsán arborizálnak, a közvetlen környezetükben lévő idegsejtek működését szabályozzák, azokat hálózatba integrálják.

Következő kérdésem ennek megfelelően az volt, hogy a secretagogin-tartalmú idegsejtek projekciós- vagy interneuron típusúak-e. Sejtalaktani megfigyeléseink (ld. előbb) első megközelítésben utóbbira engedtek következtetni, így a kérdést több további módszerrel közelítettem meg.

Elsőként *in vivo* retrográd pályakövetést végeztem patkányokban. Ennek során retrográd pályakövető anyagot, biotinilált dextrán amint juttattam be három ismert amygdaláris projektív területre: a striatumba, a nucleus accumbensbe, és a bed nucleus of stria terminalisba (9/A, B, C ábra). A kiértékelés során BDA⁺/scgn⁺ kettősjelölt sejteket kerestem a centrális és bazolaterális amygdala területén, hiszen az itt megfigyelhető BDA jelölődés a sejt projekciós neuron jellegére utal (9/A₂-A₃, B₂-B₃, C₂-C₃ ábra). Az említett területek közül, csak a striatumba való beadást követően találtam kettősjelölt sejtet: több száz retrográd feltöltött sejtől mindösszesen egyet. Ez az eredmény a morfológiai tipizálással összhangban arra utal, hogy a secretagogin-immunoreaktív sejtek patkány amygdalában interneuron-jellegűek.

Másodszor olyan neurokémiai markerekkel való együttes előfordulást kerestem, melyek jellemzően interneuronokban figyelhetőek meg (10. ábra). Az amygdaláris interneuronokat jól jellemzi a központi idegrendszerben előforduló kalciumkötő fehérjék expressziója. Három ilyen fehérjével, calbindinnel, calretininnel, és parvalbuminnal végeztem többszörös immunhisztokémiai festést a secretagoginnal való kolokalizáció, és ezzel az interneuron-jelleg megerősítésének a vizsgálatára (Morys és mtsai 1999, Kemppainen és Pitkanen 2000).



9. ábra: A secretagoin-pozitív idegsejtek projekciós neuron-jellegének vizsgálata patkány amygdalában

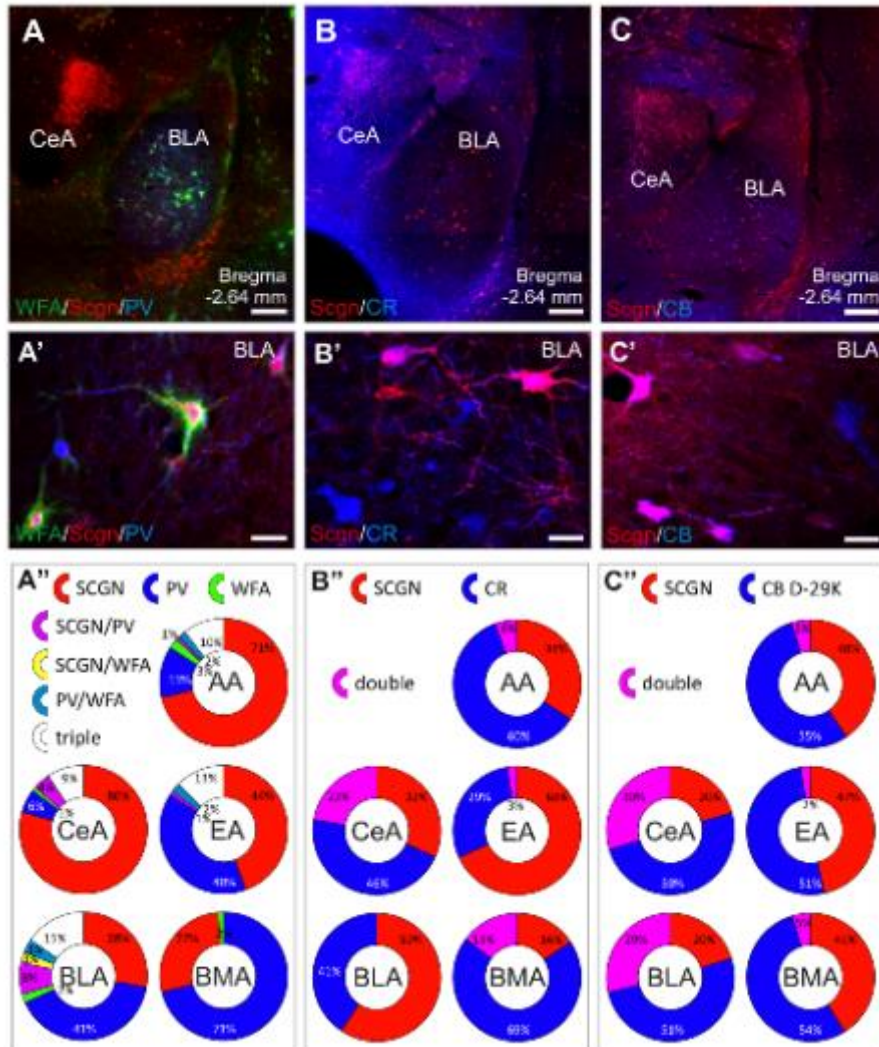
*Retrográd pályakövetés a striatum (A-A₃), a BNST (B-B₃), és a nucleus accumbens (C-C₃) területéről. Az amygdala centrolaterális (A₃, B₃, C₃) területén nem találhatóak kettősjelölt (*scgn*⁺/*BDA*⁺) sejtek.*

*A fehér nyilak a *BDA*⁺/*scgn*⁻ sejteket, a fekete nyilak a *BDA*⁻/*scgn*⁺ sejteket jelzik.*

BDA biotinylated dextran amine; BLA basolateral amygdaloid nucleus; BNST bed nucleus of stria terminalis; CE central amygdala; CeL centrolateral amygdala; Scgn secretagoin. Méretskála: 500 μ m (A₁, B₁, C₁), 300 μ m (A₂, B₂, C₂), 10 μ m (A₃, A₄, B₃, B₄, C₃, C₄).

Azt tapasztaltam, hogy a secretagoin mindhárom fehérjével kolokalizál, ám alegységként és markerekként eltérő denzitással és mintázattal. Eredményeim szerint a parvalbumin-tartalmú secretagoinnal jelölt neuronok 15-25%-ban vannak jelen a bazális amygdala laterális részében, a centromediális, illetve az elülső amygdalában (10/A-A'' ábra). A kettősjelölt sejtek kétharmada körül lektin-tartalmú, *Wisteria floribunda agglutininnel* (WFA) jelölhető extracelluláris mátrix is kimutatható, ami a gyorsüzelő interneuronokra jellemző perineurális hálót jelöli (Bruckner és mtsai 1993, Celio és mtsai 1998). A calretinin-pozitív idegsejtek secretagoinnal csak a

bazomediális és a centrális divíziókban mutathatóak ki együtt, 15-20%-os előfordulási gyakorisággal (10/B-B'' ábra). A jelölt sejtek 30%-ában calbindin és secretagogin együttesen van jelen a bazolaterális és centrális alegységekben, illetve kisebb denzitásban a bazomediális, és az elülső régiókban (10/C-C'' ábra).



10. ábra: A secretagogin kolokalizációjának vizsgálata más kalcium-kötő fehérjékkel

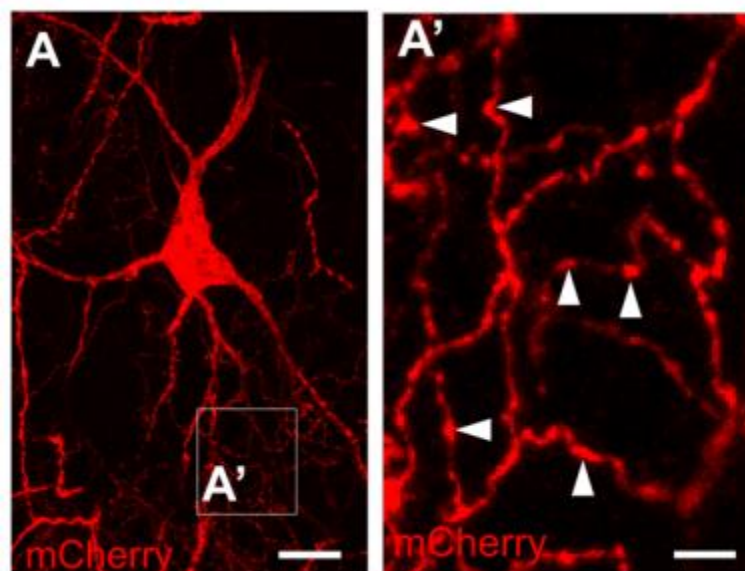
A patkány agyvelőkön végzett többszörös immunhisztokémiai festések megmutatták, hogy a secretagogin parvalbuminnal legnagyobb mértékben a bazolaterális alegységben kolokalizál, ahol a kettősjelölt sejtek aránya 20% (A-A''). A calretinin (B-B'') és a calbindin (C-C'') immunfestés is a centrális amygdala laterális régiójában mutatja a legnagyobb jelintenzitást a secretagogin-tartalmú neuronokban.

AA anterior amygdaloid area; CB calbindin; CeA central amygdaloid nucleus; CR calretinin; BLA basolateral amygdaloid nucleus; BMA basomedial amygdaloid nucleus; EA extended amygdala; PV parvalbumin; Scgn secretagogin; WFA Wisteria Floribunda Agglutinin. Méretek: 300 μ m (a, b, c), 10 μ m (A', B', C').

Harmadszor, az ultrastruktúra szintjén is tettem megfigyeléseket: megvizsgáltam, milyen típusú végződéseket képeznek a secretagogin-tartalmú terminálisok. Az amygdalában vizsgálódva secretagogin-immunoreaktivitást bizonyító DAB-csapadékot mind pre- mind posztzinaptikus kompartmentben találtam. Azok a szinapszisok, melyekben secretagogin-immunjelet a preszinaptikus oldalon találtam, jellemzően szimmetrikus típusúak voltak, ami az interneuronok által képzett gátló kapcsolatra jellemző. Az ezekkel kapcsolatos képanyagot a secretagogin intracelluláris lokalizációját ismertető fejezetben mutatom be (12. ábra).

Végül megvizsgáltam az amygdala területén – különös tekintettel a centrolaterális régióra- a secretagogin-tartalmú neuronok axonhálózatát vírusinjektált (AAV-hSyn-DIO-mCherry) secretagogin-Cre egerek agyvelejéből készült metszeteken (11. ábra). A fluoreszcnes fehérje erős expressziójának köszönhetően a secretagoginnal jelölt idegsejtek axonjainak dús, lokális hálózata jól nyomonkövethető, ami ezen sejtek interneuron-jellegét tovább erősíti.

A secretagogin-tartalmú sejtek multipoláris, túske nélküli dendritfával jellemezhető külalakja, a pályakövetési vizsgálat eredményei, a különböző kalciumkötő markerekkel való kolokalizáció, valamint a szimmetrikus szinapszisok preszinaptikus kompartmentjében való előfordulás mind arra utalnak, hogy ezek a sejtek patkány amygdalában az interneurális hálózathoz tartoznak.



11. ábra: A centrális amygdala secretagogin-tartalmú neuronjainak axonhálózata

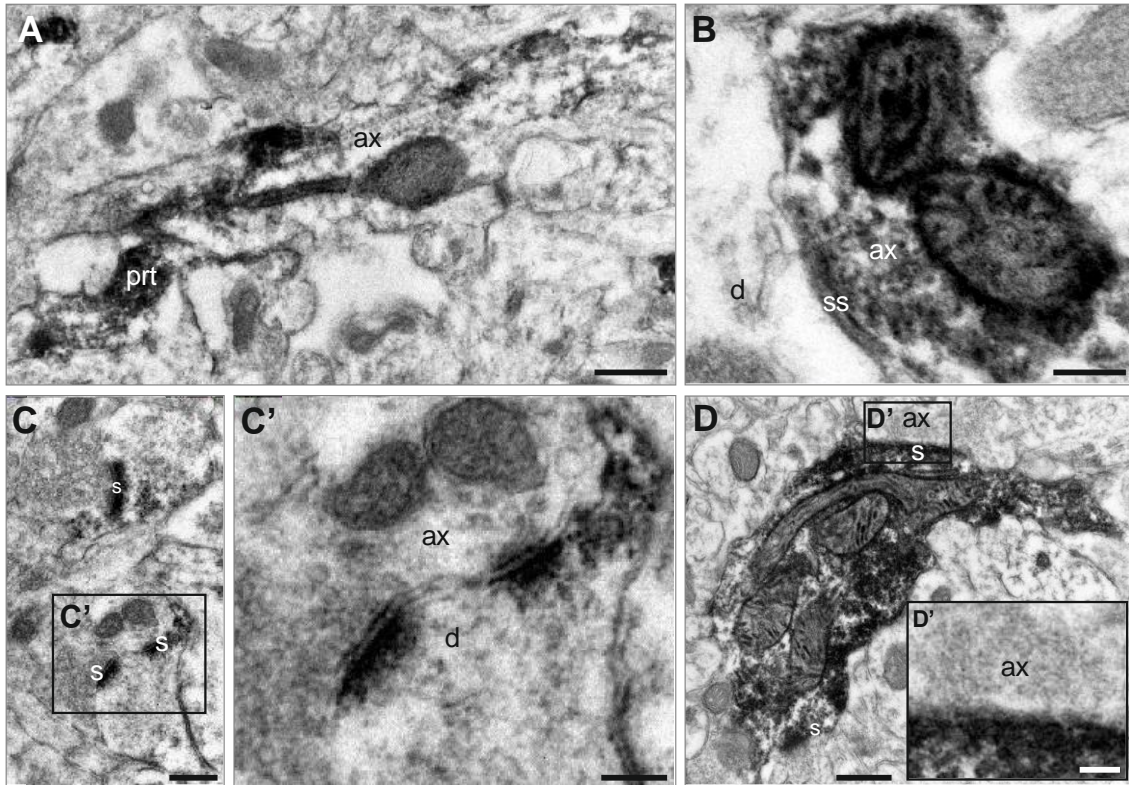
Vírusinjektált (AAV8-hSyn-DIO-mCherry) secretagogin-Cre egér centrolaterális amygdalájából készült mikroszkópos felvétel. Az mCherry fluoreszcens fehérje a secretagogin tartalmú sejteket jelöli (A), melyeknek ezáltal az interneuronokra jellemző lokális axonhálózata élesen kirajzolódik (A'). Méretskála: 15µm (A), 4µm (A').

4.3. A secretagogin intracelluláris lokalizációjának vizsgálata

Az eddigi kísérletekkel megmutattam a secretagogin-tartalmú idegsejtek előfordulási mintázatát és morfológiai sajátosságait patkány agyvelőben, illetve több különböző módszerrel bizonyítottam interneuron-jellegüket. A következőkben a secretagogin sejten belüli lokalizációjára voltam kíváncsi.

Az amygdaláris neuronokban a secretagogin kompartmentalizációjának vizsgálatát elsőként elektronmikroszkóppal végeztem. Az elektronmikroszkópos felvételeken a DAB-csapadék által jelölt secretagogin minden sejtalkotóban megtalálható, azonban túlnyomó többségben az aszimmetrikus szinapszisok posztzinaptikus oldalán figyelhetőek meg (12/C-D' ábra). DAB-csapadék mutatható ki ugyanakkor axonokban, és szimmetrikus szinapszisok preterminális kompartmentjeiben is (12/A, B ábra). Erre a megfigyelésre a secretagogin-tartalmú idegsejtek interneuron jellegével kapcsolatban az előző fejezetben már utaltam.

Összességében az elektronmikroszkópos vizsgálatok során tett megfigyeléseim a várttól eltérő eredménnyel szolgáltak. Laborunk korábbi munkái, és más szakirodalmi adatok alapján secretagogin-tartalmú neuronokat eddig főként preszintaptikus terminálisokban írták le, ahol funkciója a vezikuláris exocitózishoz köthető (Gartner és mtsai 2007, Alpar és mtsai 2012, Romanov és mtsai 2015, Alpar és mtsai 2018).

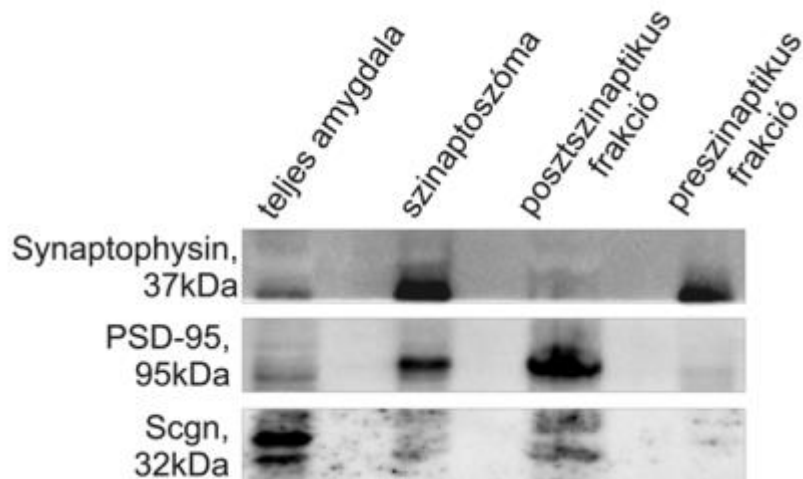


12. ábra: A secretagogin intracelluláris lokalizációjának ultrastrukturális vizsgálata

A patkányból készült elektronmikroszkópos felvételeken secretagogint jelölő DAB csapadékot figyelhetünk meg az interneuronokra jellemző szimmetrikus szinapszisok preszinaptikus terminálisaiban (A,B). Leggyakrabban a secretagogin a posztzinaptikus denzitás területén fordul elő (C-D').

ax axon; d dendrite; prt preterminális axon; s szinapszis; ss szimmetrikus szinapszis. Méretskála: 200nm (A), 200nm (B), 100nm (C), 70nm (C'), 100nm (D), 10nm (D').

Az elektronmikroszkópos vizsgálati eredményekből kiindulva a secretagogin posztzinaptikus lokalizációjának a megerősítésére patkány agyvelőből izolált („puncholt”) amygdala mintákból előbb szinaptoszóma-, majd pre-, és posztzinaptikus denzitás frakciót készítettem. A sejtfrakciók azonosítását, illetve fehérjetartalmuk összehasonlítását Western blot analízissel végeztem (13. ábra). Ehhez két szinaptikus markerként ismert molekulát: a preszinaptikus vezikulákra jellemző synaptophysint, és a posztzinaptikus denzitás 95 fehérjét választottam. Mennyiségük alapján elmondható, hogy mind a szinaptoszóma-, mind pedig a pre-, és posztzinaptikus frakció izolálása sikeres volt, a minták tisztasága megfelelőnek bizonyult.



13. ábra: A secretagoin előfordulása a szinaptikus frakciókban

A secretagoin mennyisége a sejtfractionálási eljárásokkal kinyert szinaptikus kompartmentekben. A teljes, patkány amygdalában található secretagoin nagyrésze a (PSD-95 ellenanyaggal azonosított) posztzinaptikus denzitásban figyelhető meg. A preszinaptikus frakcióban a secretagoin alig kimutatható mennyiségben van jelen. kDa kilodalton, PSD-95 posztzinaptikus fehérje 95, Scgn secretagoin.

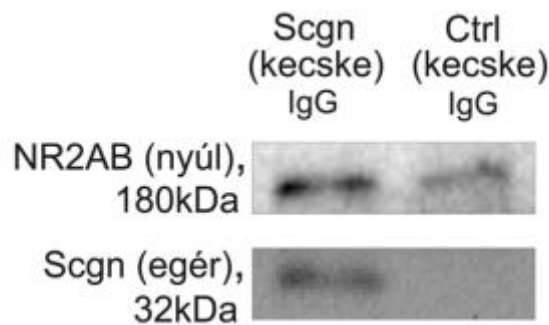
A 13. ábrán láthatjuk, hogy a posztzinaptikus frakcióban Western blot vizsgálattal jelentős secretagoin-immunoreaktivitás mérhető, ezzel szemben a preszinaptikus frakcióban a secretagoin mennyisége alig kimutatható. A kontrollként szolgáló teljes amygdala mintákban mindhárom marker jelenléte megfigyelhető.

A secretagoin kompartmentalizációjának a vizsgálatára használt mindkét módszer azt igazolja, hogy a secretagoin fehérje jellemzően az amygdaláris idegvégződések posztzinaptikus oldalán van jelen.

A következőkben posztzinaptikusan előforduló, lehetséges interaktív partnereket kerestem, hogy közelebb kerüljek az amygdalában található secretagoin-tartalmú idegsejtek funkciójának megfejtéséhez. Ehhez rendelkezésemre állt egy laborunk által korábban elkészített tömegspektrometriai adatsor, mely a secretagoinhoz kapcsolódó fehérjéket listázza (Hanics és mtsai 2017). Ebben a secretagoin interaktív partnereként azonosítottam az idegsejtek posztzinaptikus terminálisaira jellemző N-metil-D-aszparaginsav típusú ionotróp glutamát receptor 2-es alegységét. Ez a receptor a

kalcium intracelluláris mennyiségének a szabályozása, a jelátviteli folyamatokhoz köthető sokrétű funkciója, illetve az amygdaláris mechanizmusokban betöltött kulcsszerepe miatt keltette fel a figyelmemet.

Az NMDA receptor és a secretagoin közötti kapcsolatot elsőként immunprecipitációval vizsgáltam (14. ábra). Ennek során patkány amygdala homogenizátumból egy speciális mágnes segítségével nyertem ki a secretagoin interaktómát, mely a secretagoinon kívül az ahhoz kapcsolódó molekulákat is tartalmazza. A Western blot analízis kimutatta, hogy az NMDA receptor 2 típusú AB alegysége megtalálható a secretagoin interaktómában. Ebből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a secretagoin és az NMDA receptor 2AB alegységek interaktív partnerek.

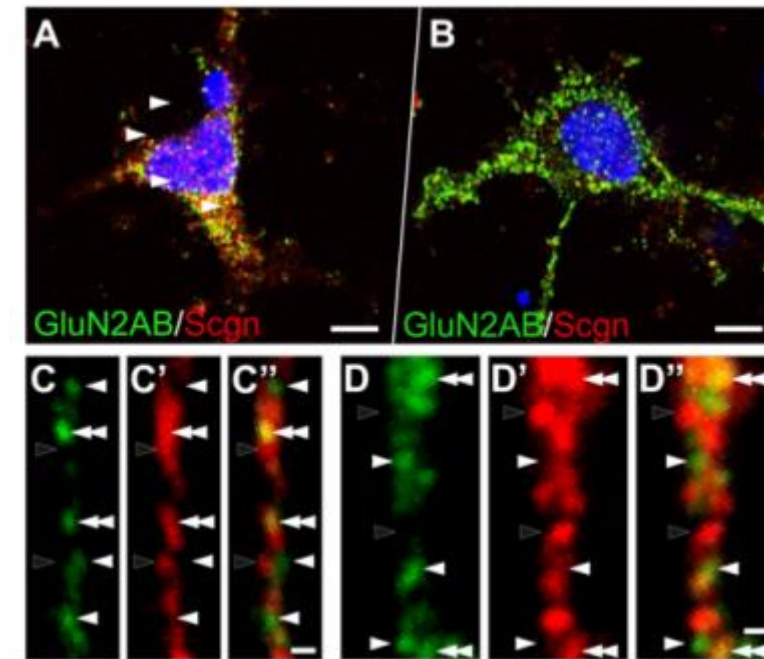


14. ábra: Az immunprecipitáció alapján az NMDA receptor 2-es alegysége a secretagoin kötőpartnere

A patkány amygdalából végzett immunprecipitáció kimutatta, hogy a secretagoin és az NR2B alegység egymás interaktív partnerei. ctrl kontroll ("non-target"), kDa kilodalton, IgG immunoglobulin G, NR2AB N-metil-D-aszpartát receptor 2-es típusú alegység AB variánsa, Scgn secretagoin.

A következő kísérletemben *in vitro* patkány amygdalából készített primer sejtenyészeten vizsgáltam a secretagoin és az NMDA receptor 2AB alegység együttes előfordulását (15. ábra). A nano-rezolúciós mikroszkóppal készített felvételeken (15/C-D" ábra) láthatjuk, hogy *in vitro* a secretagoin és az NMDA receptor 2AB alegysége ugyanabban a szubmembrán régióban koncentrálnak, helyenként egymással kolokalizálnak.

A fenti kísérletek egyhangúan azt mutatják, hogy az amygdaláris neuronokban a secretagogin jellemzően posztzinaptikusan fedezhető fel, ahol az NMDA receptor 2AB alegységével áll közvetlen kapcsolatban.



15. ábra: A secretagogin és az NR2AB alegység kolokalizációs vizsgálata *in vitro* primer sejtenyészetben

Az NR2AB+ sejtek secretagogint is expresszálnak patkányból származó primer amygdala sejtenyészetben (A, B). A nanorezolúciós eljárással készült felvételeken a két molekula kolokalizációja látható (C-D''). A fehér nyilak az NR2AB+, a fekete nyilak a scgn+ felhalmozódásokat-, míg a kettős nyilak a kolokalizációs helyeket jelölik.

NR2 NMDA receptor 2-es alegység, Scgn secretagogin. Méretskála: 15 μ m (A, B), 1 μ m (C'', D'').

4.4 A secretagoin viselkedésbiológiai szerepének vizsgálata

Munkám következő szakaszában a secretagoin amygdalában betöltött szerepére összpontosítottam, így górcső alá vettem azokat a sejtelettani folyamatokat, melyek ezen az agyterületen jellemzően előfordulnak.

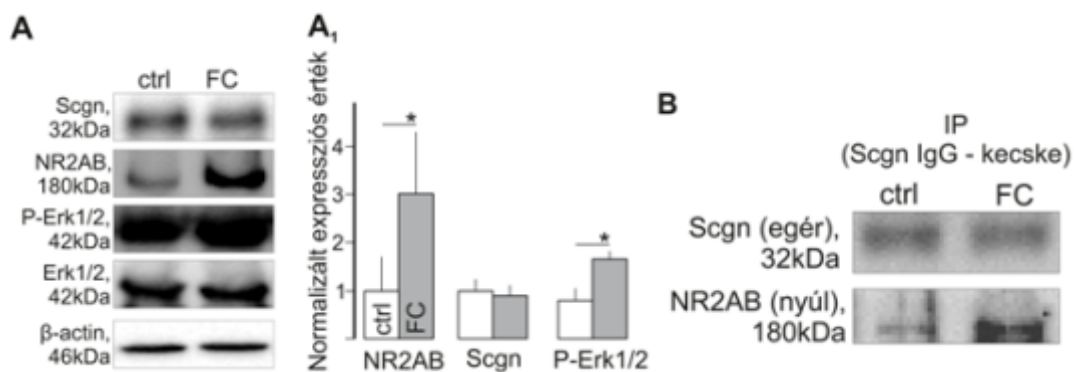
A fenyegetettség, vagy a veszélyhelyzet – úgy, mint a klasszikus félelem kondicionálás – által előidézett védekezési viselkedésmechanizmus során az amygdala komplex szerepe kiemelkedő jelentőséggel bír. A külvilágból érkező ingerek az amygdalában integrálódnak, ahonnan a feldolgozott információ az effektor-régiók irányába továbbvetülve végül a válaszreakciók kiváltását eredményezi. Ezekhez a folyamatokhoz éppúgy, mint a hozzájuk köthető szinaptikus plaszticitás kialakulásához egyaránt nélkülözhetetlen az NMDA receptor 2B-típusú alegysége (Groc és mtsai 2006). Ezeknek a szakirodalmi adatoknak az ismeretében a soron következő kísérlet egy klasszikus Pavlovi kondicionálás volt (6/A ábra).

Az általam alkalmazott protokollban a kondicionált, semleges inger egy 80 decibel erősségű hang volt, melyhez áramütést társítottam. Annak érdekében, hogy az állatok számára önmagában a környezet (kísérleti doboz) semmiképpen se jelentsen fenyegetettséget (mely folyamat az amygdalán kívül a hippocampuszhoz is köthető lenne), a kísérlet utolsó napján több paramétert is megváltoztattam (Phillips és Ledoux 1992).

A felnőtt patkányokon végzett félelem kondicionálás után az izolált amygdalák felét immunprecipitációval, másik felét pedig Western blot analízissel vizsgáltam (16. ábra). Kíváncsi voltam a secretagoinhoz kapcsolódó, illetve az összes NMDA receptor mennyiségére is. A Western blot analízis a szakirodalomban megtalálható adatoknak megfelelően, a stresszelt állatokban kimutatta az NMDA receptor 2-es alegység-, valamint a foszforilált Erk1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2) mennyiségének emelkedését, ami egyúttal tükrözi a kísérlet sikerességét (16/A-A' ábra). A fehérjeelemzésből az is kiderült, hogy a secretagoin szintje a két csoportban közel azonos, a kezelés hatására tehát nem változott. Ezzel szemben a secretagoinhoz kapcsolódó NMDA receptor 2-es alegységének mennyisége lényegesen nagyobb volt a stresszelt állatokban, mint a kontroll csoportban (16/B ábra).

A viselkedések elemzése során azt tapasztaltam, hogy a félelem kondicionálás paradigmájának megfelelően a kontoll állatok alig, vagy egyáltalán nem mutattak ledermedési reakciót, ellentétben a stresszelt egyedekkel.

A fenti eredmények alapján félelem kondicionálás során a veszélyinger hatására a secretagogin több NMDA receptor 2es alegységével teremt közvetlen kapcsolatot. Ez feltételezi a secretagogin klasszikus kondicionálással kiváltott viselkedésbiológiai hatásmechanizmusban betöltött szerepét.



16. ábra: A félelem kondicionálás hatása a secretagoginra

A félelem kondicionálás hatására bekövetkező molekuláris mechanizmusok, és szinaptikus változások memória kialakulásához vezetnek. A folyamat során az NMDA receptor szintjének megemelkedése egy jelátviteli kaskádót indít be, melynek fontos állomása az Erk1/2 foszforilációja. A félelem kondicionált patkányok amygdalájából készült Western blot analízis kimutatta a kezelt állatokban az NR2AB-, és a P-Erk1/2 mennyiségének növekedését, ami a kísérlet sikerességét tükrözi (A-A'). Ezzel szemben a secretagogin mennyisége a kísérlet hatására nem változott. Immunprecipitációval a secretagoginhoz kapcsolódó NR2AB mennyiségének a növekedése figyelhető meg (B).

ctrl control, Erk1/2 extracellular signal-regulated kinase, FC félelem kondicionált csoport, IgG immunoglobulin G, IP immunprecipitáció, NR2AB N-Metil-D-aszpartát 2-es alegység AB variáns, P-Erk1/2 foszforilált Erk1/2, Scgn secretagogin

*: $p < 0,05$

A secretagogin fehérje viselkedésben betöltött szerepének további vizsgálatára a fentebb ismertetett kísérletet olyan egerek felhasználásával ismételt meg, melyekben a secretagogin expresszióját egy génszekvenciába ékelt terminációs jel gátolja (scgn^{-/-}). A célom az volt, hogy secretagogin hiányában figyelhessem meg a félelem kondicionálás hatására kialakuló viselkedésbeli változásokat.

A kondicionálás a secretagoin-hiányos állatokban is kiváltotta a védekezési reakciót („freezing”), melynek intenzitása a vad típusú egerekhez képest mérsékelten nagyobb volt (17/A ábra), bár statisztikai különbséget nem tudtam kimutatni. A kísérleti csoportok között, a freezinggel töltött időben tapasztalt eltérés kicsi, illetve a csoportokon belüli szórás nagysága is nagy. Ez a géntünetű állatoknál előforduló kompenzációs mechanizmussal magyarázható: könnyen elképzelhető, hogy a secretagoin funkcióját részben vagy egészben más molekulák vették át az egyedfejlődés során. Lényeges szempont továbbá, hogy a secretagoint az érzelmi viselkedés központjaként számon tartott limbikus rendszer szinte minden részében megtalálhatjuk, így teljes hiánya az állat minden viselkedésformáját érintheti.



17. ábra: A secretagoin szerepe az averzív viselkedésben

A secretagoin-hiányos (*scgn*^{-/-}) egereken végzett félelem kondicionálás során a *scgn*^{-/-} egerek félelmi reakciója valamelyest erőteljesebb volt, a kondicionált hang alatt több időt töltöttek mozdulatlanul, de a különbség nem szignifikáns (A).

A rágszálókban a természetes ragadozó szaga önmagában kiváltja az elkerülési védekezési reakciót abban az esetben is, ha korábban még nem találkoztak a ragadozóval. Ez az ösztönös válaszreakció jellemzően a teljes mozdulatlanságban nyilvánul meg. A jelenség vizsgálatára macska vizelettel átitatott alom kísérleti dobozba helyezése a legelterjedtebb eljárás (B). A kísérlet után a kezelt állatok amygdalájából végzett immunprecipitáció megmutatta, hogy a ragadozó szagának hatására a secretagoinhoz kapcsolódott NR2AB mennyisége megnövekedett, különösen amikor a kísérlet és a dekapitáció között több idő (90 perc) telt el (B').

ctrl kontroll, kont hangok közötti periódus, NR2AB N-metil-D-aszpartát 2-s alegység AB variáns, Scgn secretagoin, wt vad típusú állat

*: $p < 0,05$

Az eddig ismertett viselkedésbiológiai vizsgálatok megmutatták a secretagoin szerepét a veszélyinger által kiváltott védekezési mechanizmusokban, és az ehhez

kapcsolódó molekuláris folyamatokban. A természetben a leggyakrabban előforduló fenyegetettséget a ragadozó megjelenése jelenti. Ennek következtében egy ragadozó szagának az érzékelése az első pillanattól kezdve erős hatással van a rágcsálókra még akkor is, ha azok korábban sosem tapasztaltak hasonlót. Ez az állatokból egy veleszületett, ösztönös védekezési reakciót vált ki, mely az egyedfejlődés során már a születés utáni tizedik napon megjelenik (Ganella és Kim 2014). A folyamat központja az amygdala, és fontos résztvevő eleme az NMDA receptor 2-es alegység. Az eddigi magatartásbiológiai eredményeim, és a fentebb ismertetett összefüggések miatt érdekesnek tartottam a védekezési viselkedésnek ebben a formájában is megvizsgálni a secretagogin szerepét.

A jelenség tanulmányozására felnőtt patkányokat rövid időre egy kísérleti dobozba helyeztem, amibe nem kezelt, illetve macska vizelettel átitatott almot tettem (17/B ábra). A kezelés után 30, 60 és 90 perccel történt az amygdalák izolálása. A secretagogin interaktóma immunprecipitációval történő kinyerését követően az NR2AB szintjét vizsgáltam.

A kondicionálási kísérletekben tapasztaltakhoz hasonlóan-, a ragadozó szaga önmagában kiváltotta az elkerülési viselkedést (freezing), melynek során ugyancsak növekedett a secretagoginhoz kapcsolódó NR2AB szintje (17/B¹ ábra). A legmarkánsabb szintemelkedést azoknál az egyedeknél tapasztaltam, amelyeknél a leghosszabb (90 perc) volt az expozíció.

Az eddig elvégzett kísérletek alapján az amygdalában főként posztszinaptikusan lokalizálódó secretagogin képes az NMDA receptor 2AB alegységéhez kapcsolódni, és ezen a kapcsolaton keresztül olyan intracelluláris jelátviteli folyamatokat befolyásolni, melyek az állatok túlélését elősegítő viselkedésbiológiai változásokhoz vezetnek.

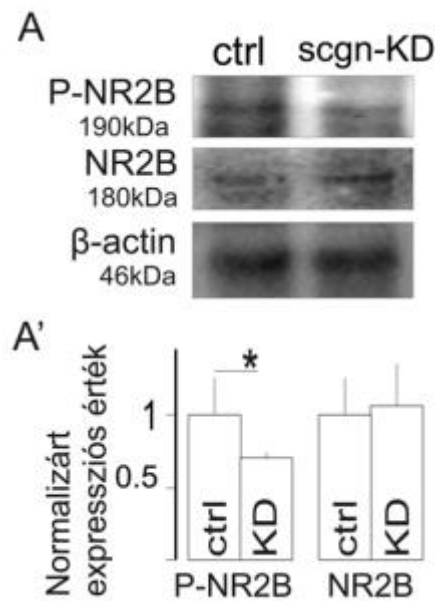
4.5 A secretagoin fehérje NMDA receptorra kifejtett hatása

A secretagoin viselkedésbiológiai szerepének a tanulmányozása után, a következő lépésben azt szerettem volna megvizsgálni, hogy a secretagoin milyen hatást fejt ki az NMDA receptor működésére. Mivel a receptor által közvetített intracelluláris változások secretagoin nélkül is kiváltották a várt viselkedésformát (esetünkben a ledermedési reakciót), így a választ a receptor aktiválódásához szükséges korábbi fázisokban kerestem.

A tetramer szerkezetű NMDA receptor aktiválódásának feltétele, hogy az alegységek összeszerelődési helyükre, a posztzinaptikus membránhoz szállítódjanak. A receptor csak ezután képes rögzülni a membránban. A hipotézisem tehát az volt, hogy a secretagoin szerepe az alegységek membránhoz- való eljutásában („trafficking”-ben), illetve az ahhoz történő kihorgonyzódásában lehet.

Elsőként azt vizsgáltam meg, hogy a secretagoin mennyiségének a csökkenése hatással van-e a 1472-s tirozin helyen történő NR2B foszforilációra, mely a receptor membránban való rögzülését befolyásolja (Lavezzari és mtsai 2003). Egy erre a foszforilációs helyre specifikus ellenanyaggal vizsgáltam a foszforilálódott NR2B mennyiségét *in vitro*, patkány eredetű insulinoma sejtvonalban (INS-1E) secretagoin géncsendesítést követően.

A kiértékelés során azt tapasztaltam, hogy a kevesebb secretagoint tartalmazó, géncsendesített sejtek foszfo-NR2B mennyisége kisebb volt a kontroll sejtekhez képest, míg az össz- NR2B mennyisége változatlan maradt (18. ábra). Ebből arra következtethetünk, hogy a secretagoin az NMDA receptor 2B alegységének a 1472-s tirozin helyén történő foszforilációját segíti elő, ezáltal befolyással bír a receptor sejtfelszíni mennyiségének a szabályozására.



18. ábra: A secretagogin hatása az NR2B 1472-s tirozinján történő foszforilációjára *in vitro*

Az NMDA receptor poszt-szinaptikus membránban történő rögzüléséhez szükséges az NR2B alegység foszforilációja a 1472-s tirozinon. Az insulinoma sejtvonalon végzett secretagogin géncsendesítés hatására a sejtek foszforilálódott NR2B-tartalma is kevesebb, a P-NR2B és a secretagogin mennyisége korrelál (A-A').

ctrl control, NR2B N-metil-D-aszpartát receptor 2B alegység, P-NR2B NMDA receptor 2B alegység 1472-s tirozin foszforilált formája, Scgn-KD secretagogin géncsendesítés.

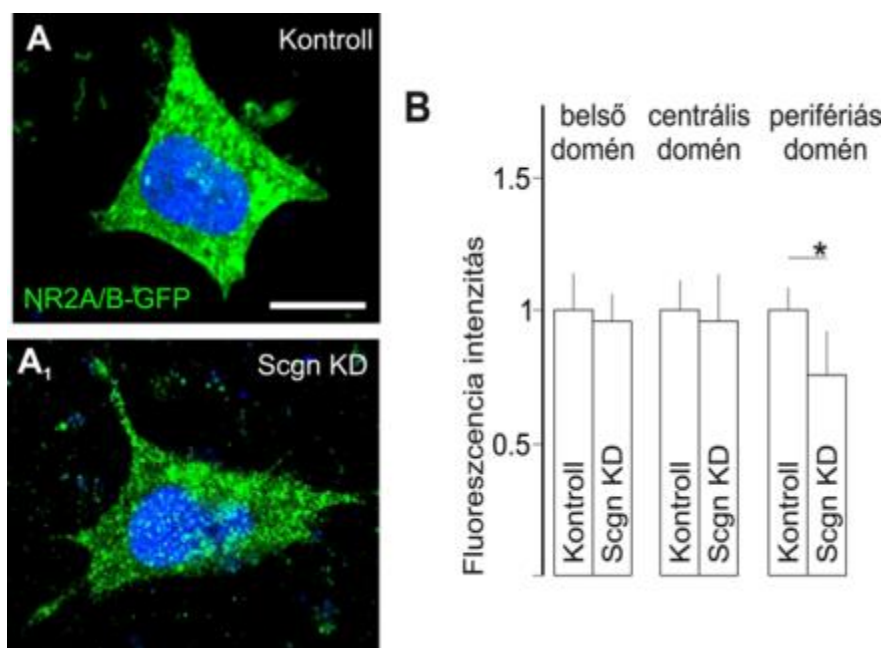
*: $p < 0,05$

A secretagogin NMDA receptor plazmamembránhoz történő kapcsolódásában betöltött szerepét további kísérletekkel vizsgáltam. Kíváncsi voltam az NR2B sejten belüli lokalizációjának változására a secretagogin fehérje mennyiségének a függvényében. Ehhez SHSY-5Y sejteket egy speciális GFP-konstrukcióval jelölt NR2B-t tartalmazó plazmiddal (Super Ecliptic phluorin, SEP) transzfektáltam, ezt követően pedig a secretagogin expresszióját géncsendesítéssel csökkentettem (19/A, A¹ ábra). Fixálás után a könnyebb detektálhatóság érdekében anti-GFP immunfestést végeztem. Erre azért volt szükség, mert a SEP pH-érzékenysége miatt fixált metszeteken a fluoreszcens jel nehezebben detektálható.

Konfokális mikroszkóppal mértem a sejtekben található NR2B mennyiségét (fluoreszcencia intenzitását) három különböző régióban: a sejtmaghoz-, és a nyúlványokhoz közeli, illetve a köztük lévő területeken (19/B ábra). A kapott értékeket

összevettem a különböző kezelési csoportok között. Ennek alapján az NR2B mennyisége a kontroll csoportokban magasabb, mint a kevesebb secretagogin tartalmazó sejtekben. Ez a mennyiségi eltérés a három vizsgált terület közül a nyúlványokhoz közeli helyeken a legmarkánsabb, éppen ott, ahol az NMDA receptor összeszerelődése és aktivációja történik.

A fejezetben eddig tárgyalt két kísérlet megerősíteni látszik azt az elképzelést, mely szerint a secretagogin az NR2B-vel való összeköttetésén keresztül befolyásolni tudja az NMDA receptor rögzülését a posztszinaptikus membránban.



19. ábra: A secretagogin hatása az NR2B alegység intracelluláris lokalizációjára *in vitro*

Humán eredetű neuroblasztóma sejtvonalat SEP-NR2B plazmival transzfektálva azt tapasztaljuk, hogy a sejtek NR2B-tartalma secretagogin géncsökkentés hatására lecsökken (A, A₁). A jelintenzitás-különbséget külön mérve a belső-, centrális-, és perifériás részeken elmondható, hogy a kevesebb secretagogin-tartalmú sejtekben leginkább a perifériás részeken mérhető kisebb SEP-NR2B jel (B).

*NR2AB N-metil-D-aszpartát 2-es alegység AB variáns, Scgn KD secretagogin géncsökkentés. *: $p < 0,05$*

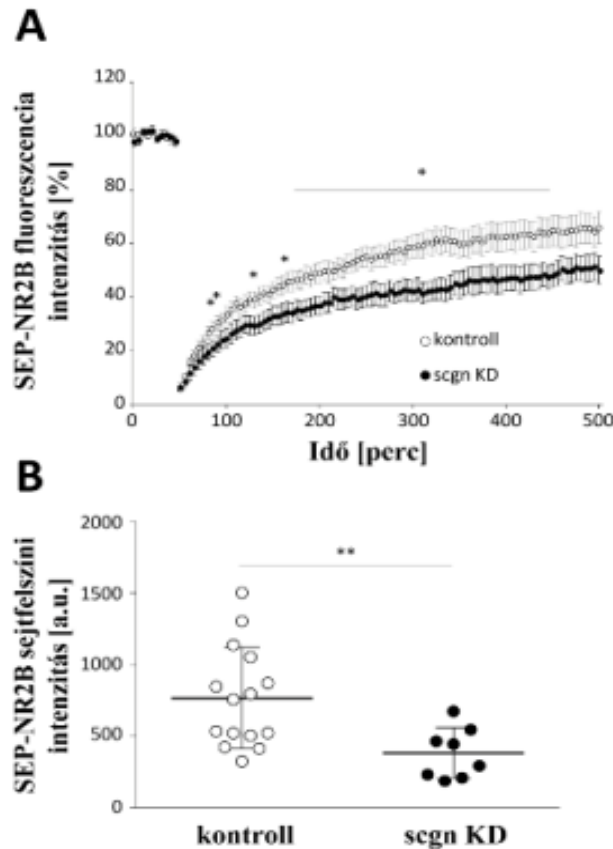
Az eddigi eredményekből kiindulva a következő kísérlettel az volt a célom, hogy kimutassam a secretagogin szerepét az NR2B alegység plazmamembránhoz történő kijutásában („trafficking”-ben) *in vitro*. A sejtekbe ez esetben is olyan plazmid

konstrukciót juttattam be, melyben az NR2B alegység kémhatásra érzékeny GFP-vel jelölt. A SEP használatának előnye a trafficking vizsgálatokban, hogy a fluoreszcencia csak extracelluláris kémhatáson detektálható (Sankaranarayanan és mtsai 2000). Amennyiben a jelölt molekula savas kémhatású kompartmentben található, a jel kioltódik. Ennek alapján a mért fluoreszcens jel erősségéből következtethetünk a jelölt molekula sejtfelszíni mennyiségére, és vizsgálhatjuk a receptor transzportfolyamatait (Ashby és mtsai 2004).

FRAP analízis (fluorescence recovery after photobleaching) során a kiválasztott sejt meghatározott területén lézerrel fakítunk („bleaching”), ezzel kioltva az összes fluoreszcens jelet. A sejtekben zajló diffúzióknak köszönhetően új molekulák kerülnek a fakított területre, aminek következtében a fluoreszcens jel egy idő után újra detektálható. A jel visszatérésének idejéből és erősségéből kapott értékek a jelölt molekulák mennyiségét tükrözik, illetve összevethetőek a különböző kezelési csoportok között.

A kísérlet során SHSY-5Y sejteket SEP-NR2B plazmával transzfektáltam, és kis interferáló RNS hozzáadásával csökkentettem a secretagoin mennyiségét. A FRAP analízis kiértékelésekor összehasonlítottam a géncsendesített-, és a kontroll sejtekben található NR2B szintjét, illetve fakítás után a visszatérő jel intenzitását (20. ábra).

A 20. ábra B grafikonján látható, hogy a sejtekben a SEP-NR2B fluoreszcencia intenzitása szignifikánsan csökkent secretagoin géncsendesítés hatására, tehát a secretagoin szintjének a csökkenése kevesebb membránhoz rögzült NR2B jelhez vezet. Az eddigiekkel összhangban ebből arra lehet következtetni, hogy a secretagoin mennyiségének csökkenése az NR2B membránhoz való kijutásában zavart okoz. Ennek megfelelően a fakított membránszakaszokban a fluoreszcens jel visszatérése a géncsendesített sejtekben lassabb volt, illetve a kontroll sejtekben tapasztalhatóhoz képest kisebb intenzitású, és kevésbé meredek lefutású görbét kaptunk (20/A ábra).

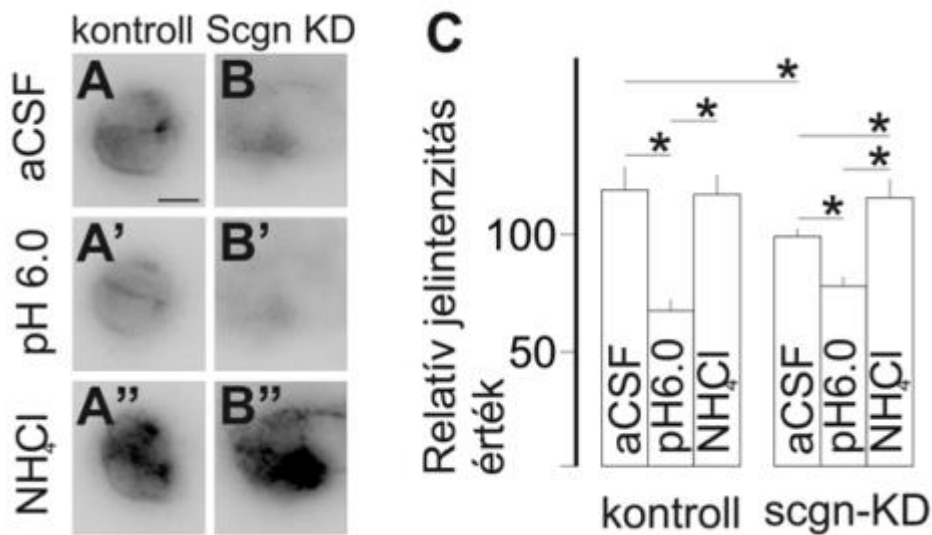


20. ábra: A secretagogin és az NR2B alegység kapcsolatának vizsgálata FRAP analízissel

FRAP analízis során a secretagogin-géncsenedesített sejtekben a sejtfelszíni NR2B mennyisége kevesebb a kontroll sejtekben tapasztalhatóhoz képest (B). A fakítás (bleaching) után a kevesebb secretagogint tartalmazó sejtekben a sejtfelszíni NR2B alegységet jelölő fluoreszcens jel később tért vissza (A), és kisebb amplitúdóval, amiből az NR2B kisebb mennyiségére következtethetünk. Scgn KD secretagogin géncsenedesítés. *:p<0,05

A FRAP analízis során azt tapasztaltuk, hogy amennyiben a secretagogin mennyiségét a sejtekben csökkentjük, az NR2B alegység sejtfelszíni mennyisége is lecsökken. Mivel a FRAP során csak a sejtfelszíni molekulák fluoreszcenciáját tudjuk mérni, így felvetődik a kérdés, miszerint a secretagogin gén csenedesítése nem okozza-e a receptor jelölt alegységének csökkenését az egész sejtben, nem csupán a sejtfelszínen. Ehhez egy olyan kontroll kísérletet végeztünk el, melynek során semleges, savas, és lúgos kémhatású médiummal kezeltük a sejteket mindkét csoportban (21. ábra). A fiziológiás oldat (aCSF) alkalmazásakor a jelintenzitás az elvárásainknak megfelelően alakult: a géncsenedesített sejtekben kisebb jelintenzitást, kevesebb NR2B alegységet mértünk (21/A, B ábra). A médium savasításának hatására mindkét csoportban csökkent a pH-

érzékeny fluoreszcens jel mennyisége (21/A', B' ábra). Az ammónium-klorid-tartalmú oldat használatával az eddigiektől eltérően a sejtekben található összes NR2B mennyiségét detektálhatjuk. Esetünkben nagyobb jelintenzitás növekedés volt tapasztalható a géncsendesített sejtekben (21/A'', B'', C ábra).



21. ábra: Az NR2B alegység sejtfelszíni és intracelluláris mennyisége secretagogin géncsendesítés hatására.

Fiziológiás körülmények között (aCSF) a pH-érzékeny SEP-NR2B plazmid terméke a sejtfelszínen detektálható (A,B), ahol kisebb jelintenzitást tapasztalhatunk a secretagogin géncsendesített sejtekben. A SEP-NR2B jel savasabb közegben (pH 6.0) gyengült, de az ammónium-kloridos (NH₄Cl) kezelés hatására visszatért (A-B'') mindkét kezelési csoportban. Az aCSF oldatban detektált értékhez képest az NH₄Cl oldat hatására a jelintenzitás növekedése csak a secretagogin géncsendesített sejtekre volt jellemző (C).

aCSF artificial cerebrospinal fluid, ctrl kontroll, NH₄Cl ammónium-klorid, scgn-KD secretagogin géncsendesítés. *: <0,05

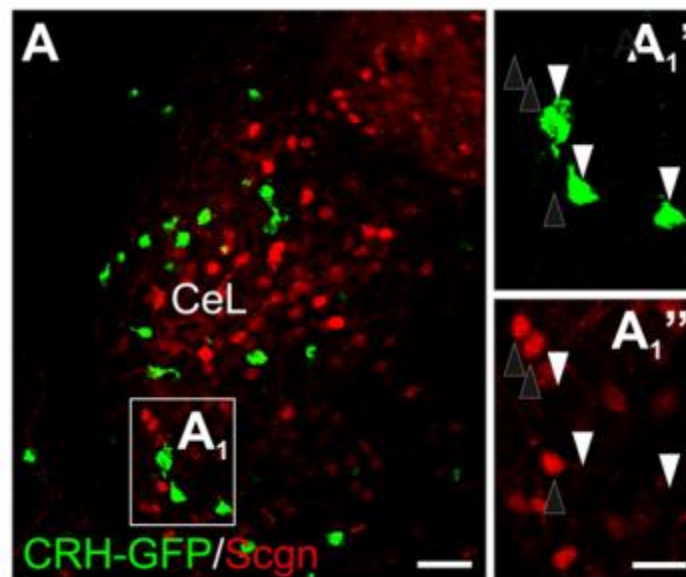
A fenti kísérlettel bebizonyosodott, hogy a FRAP analízis során tapasztalható sejtfelszíni NR2B csökkenés nem annak köszönhető, hogy ezen alegység össz mennyisége kevesebb a secretagogin géncsendesített sejtekben, hanem valóban a sejtfelszínen található, sejtmembránhoz rögzült alegység mennyisége a kevesebb.

4.6 A secretagogin szerepe a stresszválaszban

A veszélyhelyzetben kialakult védekezési folyamat során stresszhelyzetbe kerülnek az állatok, ami számos élettani változást von maga után. A klasszikus stresszválasz a hipotalamusz-agyalapi mirigy-mellékvese útvonalon (HPA axis) keresztül valósul meg, melyben a hipotalamusz paraventriculáris magjának CRH -tartalmú neuronjai játszanak kulcsfontosságú szerepet (Selye és Fortier 1949, Bale és Vale 2004, McEwen 2008). A stressz hatására felszabaduló CRH aktiválja az agyalapi mirigy adrenokortikotrop hormon termelését, mely végül a mellékvesekéregben kortizol és glukokortikoidok elválasztását stimulálja (Swanson és Sawchenko 1980, Kovacs és Sawchenko 1996). A kortizol felszabadulása a HPA útvonaltól függetlenül, közvetlenül a limbikus-, és a jutalmazó rendszer aktiválása által is megtörténhet (Sapolsky 2003).

Kutatócsoportunk korábbi eredményei megmutatták, hogy a hipotalamusz paraventriculáris magjában a secretagogint kifejező idegsejtek gazdag sejtpopulációja figyelhető meg, ahogy a rilizing hormonok leadási helyén, az eminentia mediana területén is (Romanov és mtsai 2015). Leírták továbbá, hogy a secretagogin-pozitív sejtekre CRH-immunaktivitás is jellemző, illetve hogy ezek a sejtek stressz hatására aktiválódnak (Romanov és mtsai 2015, Alpar és mtsai 2018).

A felsorolt ismeretek tükrében kíváncsi voltam arra, hogy a secretagoginnak az amygdalában is van-e szerepe a stresszválasz kialakításában. A szakirodalom alapján a centrális amygdala területén számos CRH-t kifejező neuron található (Palkovits 2000). Első lépésben ezeknek a sejteknek a secretagogin-tartalmát vizsgáltam. CRH-GFP transzgenikus egerekből készített sorozatmetszeteken secretagogin immunfestést alkalmaztam, majd kettősjelölt sejteket kerestem az amygdala centrális régiójában (22. ábra). A vizsgálat során nem találtam olyan sejtet, amely egyaránt mutat secretagogin-, és CRH immunoreaktivitást. A kettősjelölt sejtek hiánya arra enged következtetni, hogy az amygdalában található secretagogin-tartalmú neuronok nem vesznek részt a klasszikus stresszválasz kiváltásában.



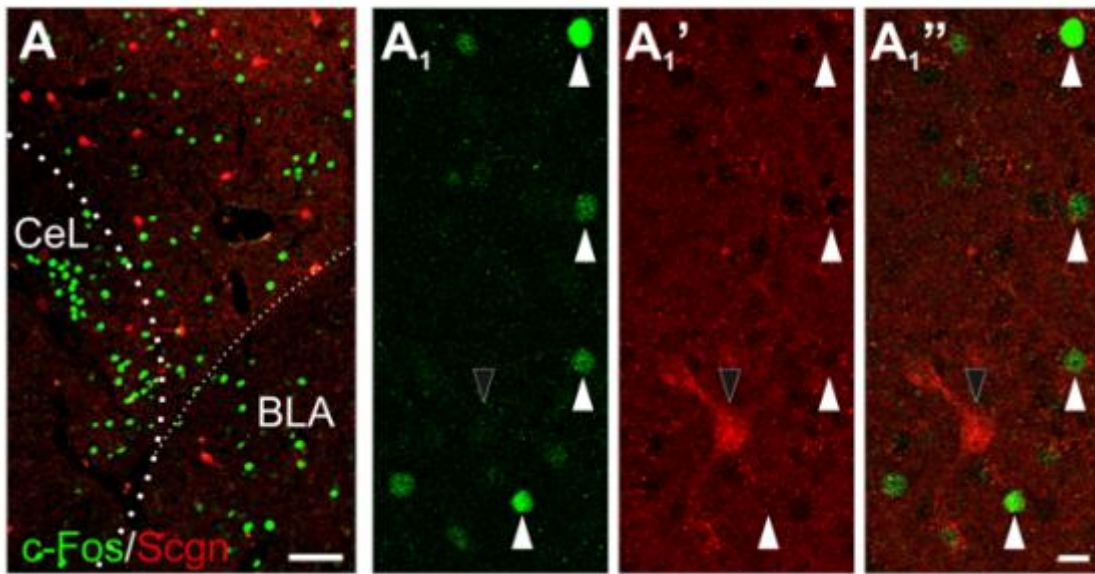
22. ábra: A secretagodin előfordulása CRH-GFP egér centrális amygdalájában

A secretagodin⁺ (fekete nyilak, A₁'), és a GFP-vel jelölt CRH⁺ sejtek (fehér nyilak, A₁'') a centrális amygdalában külön sejtpopulációt alkotnak.

CeL central amygdaloid nucleus lateral part, CRH kortikotróp rilízing hormon, Scgn secretagodin. Méretskála: 50 μ m (A), 20 μ m (A₁', A₁'').

A következő lépésben az akut fájdalom által okozott stresszválaszt vizsgáltam patkányban. Az amygdaláris neuronokban a stresszor egy korai gén, a c-fos aktiválódását váltja ki (De Francesco és mtsai 2015). Ebben a kísérletben formalin injekciót adtam patkányok hátsó combjába, majd vizsgáltam a bazolaterális és centrális amygdalában kifejeződő c-fos előfordulását (23. ábra). Az idegsejtek között nem találtam secretagodinra és c-fosra is immunopozitív sejtet, tehát a secretagodin-tartalmú neuronok akut fájdalom hatására nem aktiválódtak.

A stresszhatás vizsgálatára végzett kísérleteim eredményei alapján a secretagodin fehérje az amygdalában elsősorban azokat a stresszfolyamatokat szabályozhatja, melyekben a kondicionált stressz jelen van, de más, félelemhez kapcsolt mechanizmusokban is szerepet játszhat.



23. ábra: A c-fos expressziójának vizsgálata akut formalin stresszt követően patkány amygdalában.

A formalin injekció által okozott akut stressz a c-fos korai gén expresszióját eredményezi, ami azonban az amygdaláris secretagoin-pozitív sejtekben nem mutatható ki (A, A₁'').

Fekete nyilak: scgn⁺ (A₁'), fehér nyilak: c-fos⁺ (A₁) sejtek.

CeL central amygdaloid nucleus lateral part, BLA basolateral amygdaloid nucleus, Scgn secretagoin. Méretskála: 80μM (A), 15μM (A₁, A₂, A₃)

4.7 Secretagogin-tartalmú neuroncsoport azonosítása, és szerepe egér centrolaterális amygdalájában

Az eddigi kísérletek alapján a secretagogin fehérje elősegíti az NMDA receptor 2B alegységének a sejtmembránhoz történő rögzülését, mely egy foszforilációs lépésen keresztül valósul meg.

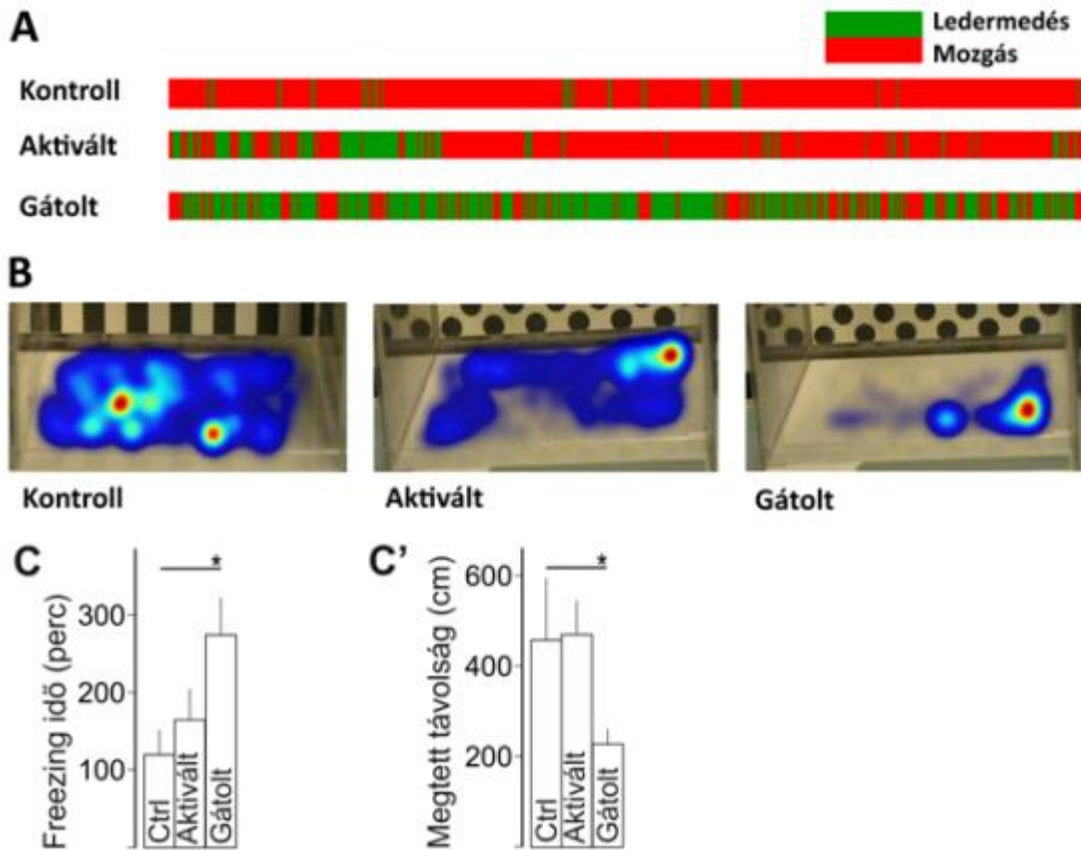
A továbbiakban arra voltam kíváncsi, hogy pontosan mi a secretagogin-tartalmú neuronok funkciója az amygdalában, illetve hogy ezek a neuronok önálló sejtcsoportot alkotnak-e. Ehhez először azt szerettem volna megtudni, hogy milyen magatartásbeli, és/vagy molekuláris változást vált ki az amygdalában található secretagogin-tartalmú idegsejtek gátlása, illetve aktiválása *in vivo*.

A kérdés megválaszolásához scgn-Cre egerek centrális amygdalájába injektáltam bilaterálisan különböző víruskonstrukciókat (Krashes és mtsai 2011). Ezen konstrukciók nagy előnye, hogy CNO injekcióval a kívánt időben, a kísérlet adott napján indukálhatóak, és típustól függően a Cre-expresszió gátlását, illetve aktiválását váltják ki. A beadott vírusrészeg megfelelő kiválasztásával, illetve a koordináták betartásával a kísérlet térben is szabályozható: adott sejtcsoportok működését vizsgálhatjuk meg adott területen. A műtétek után három héttel az egereken félelmi kondicionálás tesztet végeztem, így lehetőségem nyílt a centrális amygdalában található secretagogin-tartalmú neuronok félelem kondicionálásban betöltött szerepének a vizsgálatára (24. ábra).

Az agyvelőkből készült sorozatmetszeteken ellenőriztem a beadási helyeket. Ezt megkönnyítette a víruskonstrukcióban található, secretagogint jelölő mCherry fluoreszcens fehérje, melynek erős expressziója sejtalaktani és pályakövetési megfigyeléseket is lehetővé tett. Az injektálás területén a terminálisok szépen kirajzolódtak, távolabbi területen projekciókat nem találtam (11. ábra).

A különböző kezelési csoportok viselkedésmintázatait a kísérlet során rögzített videófelvételek elemzésével készítettem el. A kiértékelése során azt tapasztaltam, hogy a gátló vírussal injektált egerek „freezing” reakciója intenzívebb volt a kontroll állatokhoz képest: több, mint kétszer annyi időt töltöttek mozdulatlanul (24/A, C ábra). Ennek megfelelően a kísérlet alatt megtett távolságban is markáns eltérést tapasztaltam: a secretagogin-gátolt egerek a kondicionáló doboz jóval kisebb területét járták be (24/B, C' ábra).

Mindkét adatsor azt mutatja, hogy a centrális amygdala területén a secretagogin hiánya a védekezési, freezing reakciók fokozódáshoz vezet. Itt fontos megjegyezni, hogy – bár lényegesen kisebb különbséggel- a secretagogin génkiütött egerekkel végzett félelem kondicionálás ugyanezt az eredményt mutatta.



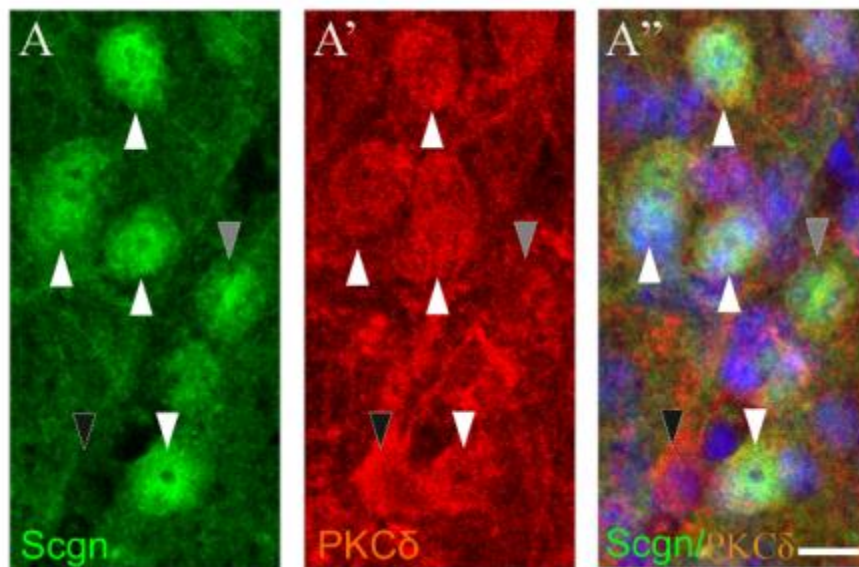
24. ábra: Secretagogin-Cre egerek viselkedésmintázatbeli különbségei félelem kondicionálás során

Félelem kondicionálás során a veszélyt jelző hanginger az állatokból védekezési válaszreakciót vált ki, amelynek legjellemzőbb formája a mozdulatlan ledermedés, a freezing reakció. A gátló vírussal injektált secretagogin-Cre egerek hosszabb ideig freezingelnek (A, C), a kísérleti dobozban kevesebbet mozognak (B, C'), tehát erőteljesebb védekezési reakciót produkálnak a kontroll állatokhoz képest.

ctrl kontroll. *: $p < 0,05$

Haubensak és munkatársai a centrális amygdala laterális területén található protein kináz C delta immunoreaktív sejtcsoportot célzott gátlásakor ugyanezt a megnövekedett dermedési reakciót tapasztalták (Haubensak és mtsai 2010). Ezek olyan interneuronok („CeL-off sejtek”), melyek gátolják a centromediális amygdala projekciós neuronjait, így azok nem tudnak projekciókat küldeni a védekezési („freezing”) reakciók kiváltásáért felelős agyi régiók felé, a PKC δ -tartalmú sejtek gátlásával diszinhibíció következik be, amit a megnövekedett dermedési reakcióval tapasztalhatunk. Ugyanezt figyelhetjük meg a secretagogin-tartalmú neuronok célzott gátlása esetén is.

A saját eredményeimet összevetve a szakirodalomban fellelhető adatokkal, a továbbiakban arról szerettem volna megbizonyosodni, hogy a secretagogin-tartalmú neuronok azonosak-e a centrolaterális amygdalában korábban leírt PKC δ + CeL-off sejtekkel. Egerek agyvelejéből készült metszeteken immunfestést végeztem, amely kimutatta a PKC δ -, és a secretagogin-tartalmú idegsejtek kolokalizációját (25. ábra). A secretagogint kifejező neuronok 92%-ban bizonyultak PKC δ -pozitívnak, míg utóbbi sejtcsoport csupán 26%-ában mutatható ki secretagogin.



25. ábra: A secretagogin és a PKC δ kolokalizációja a centrolaterális amygdala neuronjaiban

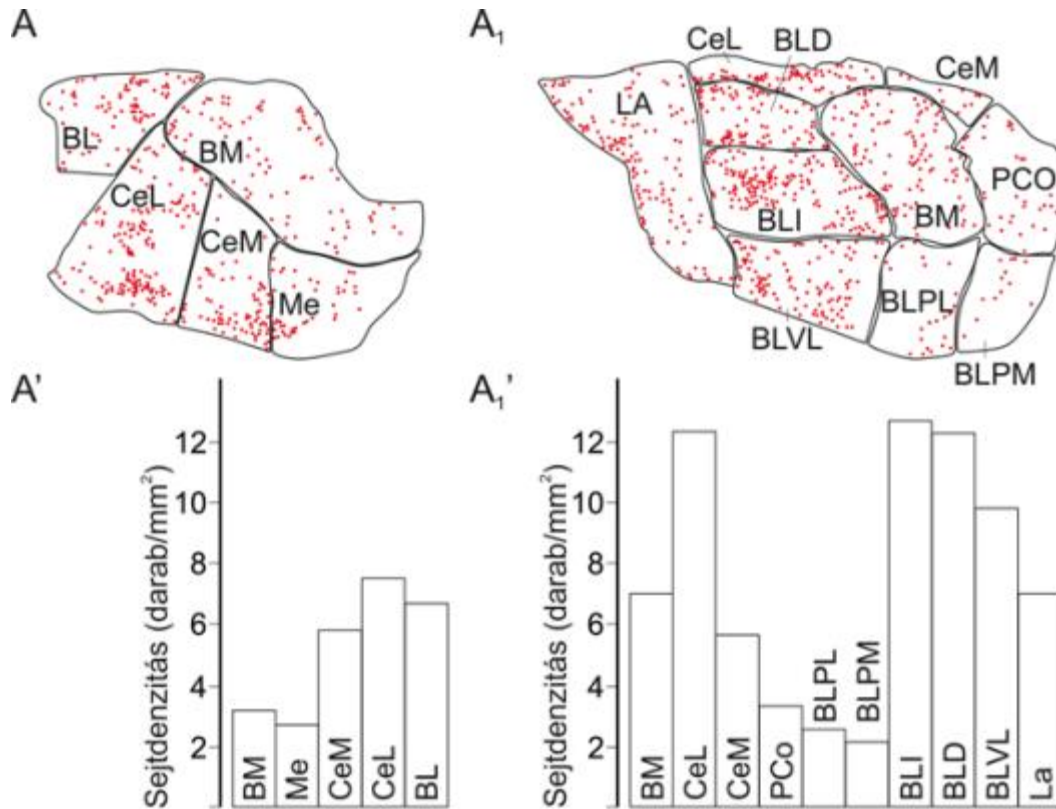
A centrolaterális amygdala területén a secretagogin-tartalmú sejtek PKC δ -t is kifejeznek. Fehér nyilak: Scgn+/PKC δ +, fekete nyíl: PKC δ +Scgn-, szürke nyíl: Scgn+/PKC δ -. PKC δ protein kináz C δ , Scgn secretagogin. Méretskála: 15 μ m (A-A”).

A magatartásbiológiával kombinált kemogenetikai kísérletekből fény derült arra, hogy a centrolaterális amygdalában a secretagogin-tartalmú neuronok a szakirodalomból már ismert CeL-off interneuronok közé tartoznak, azoknak egy szubpopulációját alkotják. Ezek, a PKC δ -t kifejező, gátló interneuronok a félelmi kondicionálás során kiváltott válaszreakciók intenzitását csökkentik, a centromediális alegység gátlásán keresztül.

4.8 A secretagogin fehérje előfordulása és funkciója az ember amygdalájában

Emberi amygdala mintákból készített sorozatmetszetek felhasználásával elkészítettem a secretagogin fehérje expressziós térképét (26. ábra). A secretagogin előfordulási mintázata hasonló a patkányban tapasztaltakéhoz. Humán minták esetében is secretagogin-tartalmú neuronokat a legnagyobb számban és denzitásban a centrális amygdala területén figyeltem meg, ezen belül is a laterális régióban. Nagy jelintenzitás tapasztalható még a bazolaterális alegységen belül a dorzális, az intermediális, valamint a ventrolaterális részeken. A patkány metszeteiken látottaktól eltérően, az ember centrális amygdalájában a mediális régióban jóval több secretagogin-tartalmú neuront találunk. A legkevesebb secretagogin-immunoreaktív sejtet a mediális-, és a kérgi amygdala területén figyeltem meg.

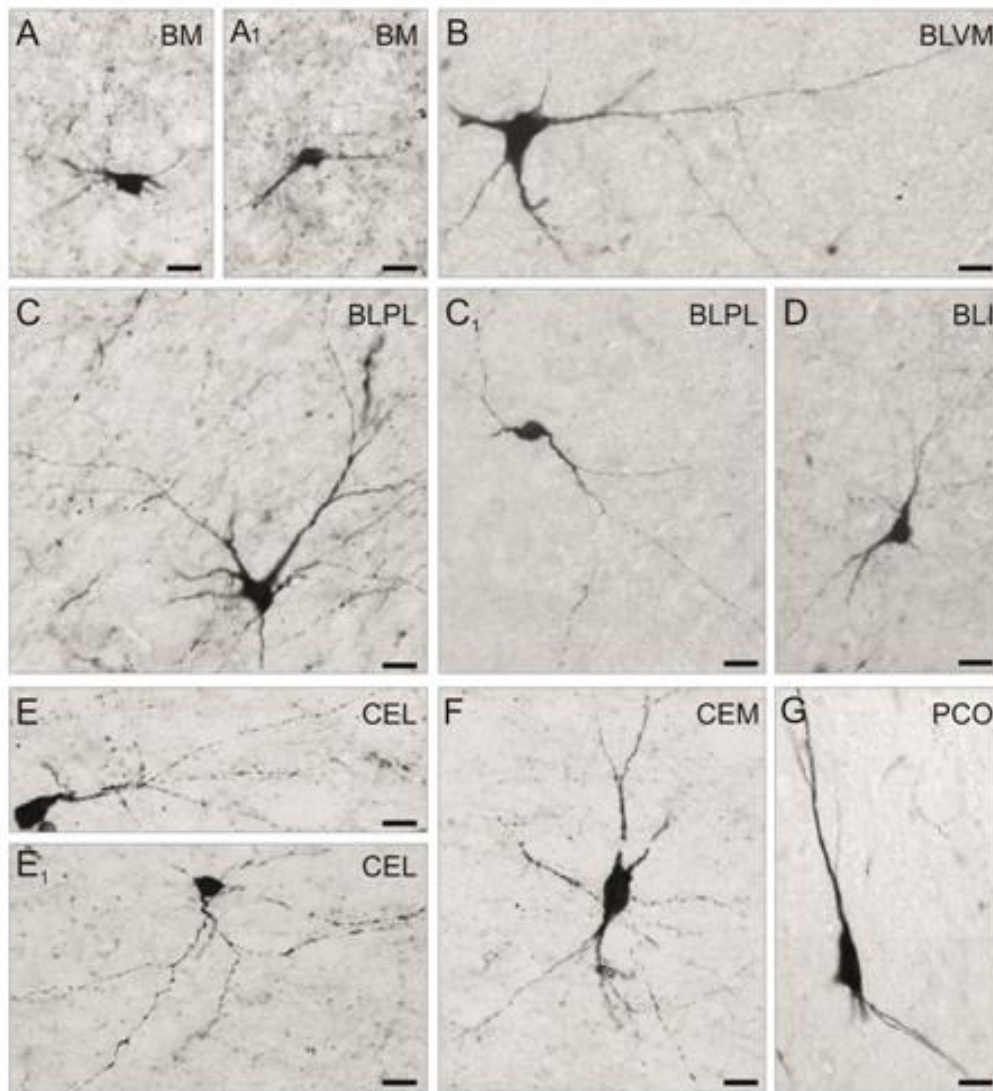
A sejtalaktani vizsgálatok során azt tapasztaltam, hogy a secretagogin-immunoreaktív neuronok többsége emberi amygdalában is multipoláris, interneuronokra jellemző morfológiát mutat (27. ábra). Kisebb számban bipoláris idegsejtek itt is megfigyelhetők, illetve a bazolaterális alegységben elvéve piramissejt-szerű neuronok is előfordulnak. A humán mintákon végzett eloszlási-, és morfológiai vizsgálatok több hasonlóságot is felfedtek az emberben-, és a rágcsálókban lévő amygdaláris secretagogin-tartalmú neuronok között. Ez alátámasztja a rágcsálókon végzett kísérletek jelentőségét, illetve elővetíti ezek preklinikai hasznának lehetőségét a humán betegségek vonatkozásában.



26. ábra: Secretagogin-pozitív sejtek eloszlása a humán amygdalában

A secretagogin-pozitív idegsejtek eloszlása a human amygdala különböző divízióiban (A, B). A pirossal jelölt pontok a secretagogint kifejező sejteket jelölik. A legnagyobb sejtdenzitás a centrolaterális területen figyelhető meg, de sok secretagogin-tartalmú neuron található a centromediális, illetve a bazolaterális amygdalában is (A₁, B₁).

BL basolateral amygdaloid nucleus; CeL central amygdaloid nucleus, lateral division; CeM central amygdaloid nucleus, medial division; BM basomedial amygdaloid nucleus; Me medial amygdaloid nucleus; La lateral amygdaloid nucleus; BLVL basolateral amygdaloid nucleus, ventrolateral part; BLD basolateral amygdaloid nucleus, dorsal part; BLI basolateral amygdaloid nucleus, intermediate part; BLPM basolateral amygdaloid nucleus, posteromedial part; BLPL basolateral amygdaloid nucleus, paralamina part; PCo posterior cortical amygdaloid nucleus.



27. ábra: A secretagodin-tartalmú neuronok morfológiája humán amygdalában

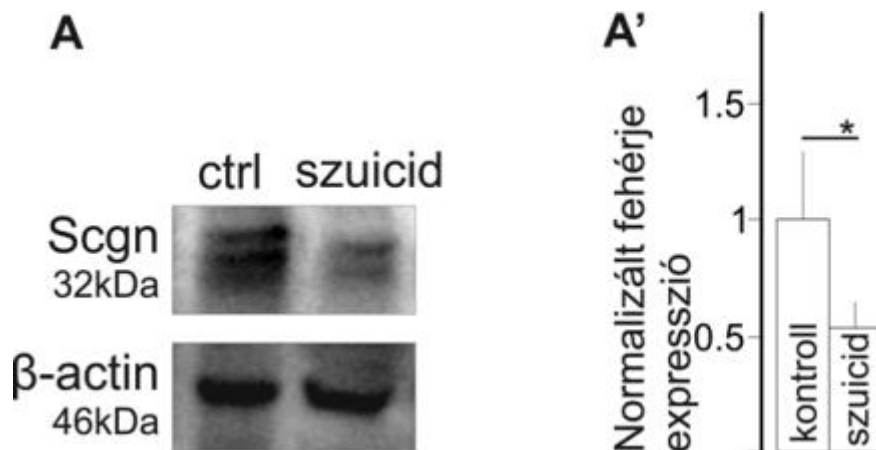
A secretagodin-pozitív idegsejtek morfológiai vizsgálata human amygdala mintákon végzett immunhisztokémiai eljárással. A secretagodin antitest főleg multipoláris neuronokat (A, B, C, F), ritkábban bipoláris idegsejteket (A1, C1, G) jelöl.

CeM central amygdaloid nucleus, medial division; CeL central amygdaloid nucleus, lateral division; BLI basolateral amygdaloid nucleus, intermediate part; BLPL basolateral amygdaloid nucleus, paralamina part; BLVM basolateral amygdaloid nucleus, ventromedial part; BM basomedial amygdaloid nucleus; PCo posterior cortical amygdaloid nucleus. Méretskála: 15 μ m.

Számos neuropszichiátriai-, és neurodegeneratív betegség köthető az amygdala komplex kóros elváltozásához, rendellenes működéséhez. Depresszióban szenvedő, és skizofrén betegek poszt-mortem vizsgálata alapján ezeknél a betegségeknél az amygdala

disztrófiája mellett az NMDA receptor szintjének a csökkenése is kimutatható (Balu 2016). Ezen irodalmi adatok, és az eddigi munkám alapján arra voltam kíváncsi, hogy az NMDA receptorral és az amygdalával egyaránt összefüggésbe hozható betegségekben a secretagodin szintje miként változik. Ehhez a Humán Agybankból rendelkezésemre bocsátott szuicid-, illetve ezekkel korban megegyező kontroll amygdala minták secretagodin tartalmát hasonlítottam össze Western blot analízis segítségével (28. ábra). A kiértékelés során azt tapasztaltam, hogy az öngyilkosságban elhunytak mintáiból kimutatható secretagodin szint lényegesen kevesebb a kontroll mintákhoz képest.

A secretagodin mennyiségi csökkenése, illetve az öngyilkosságot elkövetőkre jellemző mentális betegségek (depressziós, szorongás, poszttraumás stressz szindróma) között a rendelkezésünkre álló adatokból nem vonhatunk le egyértelmű következtetéseket, azonban a viselkedésbiológiai eredményekkel összevetve a jövőben ígéretes kutatási témának bizonyulhat. A humán minták hozzáférési, és felhasználásának technikai nehézségei miatt ez azonban nem tartozik a rövidtávú kutatási céljaim közé.



28. ábra: A secretagodin szintjének változása szuicid páciensek amygdalájának posztmortem vizsgálatakor.

*Szuicid egyedek amygdalájának posztmortem vizsgálata során a Western blot analízis kimutatta a secretagodin szintjének a csökkenését a kontroll mintához képest. ctrl kontroll, Scgn secretagodin. *: $p < 0,05$*

5. Megbeszélés

5.1 A secretagodin-tartalmú idegsejtek az emlős amygdalában az interneuronok egy csoportját jelölik

A temporális lebenyben található amygdala komplexet különálló magcsoportok alkotják, melyek további magokra és divíziókra oszthatók fel. Az általános felosztás szerint a három fő alegységet a bazolaterális-, a centromediális-, és a kortikális magcsoportok képezik. Korábban magokra és divíziókra lebontva feltérképezték az expresszióját számos neurális markerként is használt kalcium-kötő fehérjének, mint például a calbindinnek, parvalbuminnak, calretininnek, calmodulinnak, vagy a synaptophysinnek. Ezek a fehérjék sokrétű, és nélkülözhetetlen szerepet töltenek be a sejtek homeosztázisának fenntartásában éppúgy, mint számos sejtelettani folyamat során. A kalcium-kötő fehérjék családjához puffer és szenzor fehérjék sorolhatóak. Utóbbiak kalcium-kötés hatására konformációváltozáson mennek keresztül, ezzel képessé válva különböző jelátviteli utak aktiválására. A kalcium-szenzor fehérjék újabban felfedezett tagjának, a secretagodin fehérjének mind az eloszlási, és morfológiai, mind pedig a funkcionális jellemzői ez ideig ismeretlenek voltak az emlős amygdalában.

Munkám során elsőként patkány-, és emberi amygdala minták feldolgozásával készítettem el a secretagodin-immunopozitivitást mutató neuronok általános jellemzését. Az expressziós térképek alapján a secretagodin-tartalmú sejtek mindkét fajban az amygdala minden divíziójában egyaránt jelen vannak. A sejtdenzitás kimagasló az amygdala centrolaterális részében. Mindkét fajban a kortikális magcsoportok secretagodin-tartalma bizonyult a legkevesebbnek. A legszembetűnőbb különbség, hogy emberben a centromediális divízióban, illetve a bazolaterális alegységben is nagyszámú secretagodin-tartalmú idegsejt található.

A secretagodin-tartalmú idegsejtek patkány, és ember amygdalában egyaránt az interneuronokra jellemző morfológiai tulajdonságokkal bírnak: többségük változatos dendritfával rendelkező, multipoláris sejt. Főként a bazolaterális alegység területén találhatunk közöttük bipoláris neuronokat, és piramissejt-szerű idegsejteket is, ám ezek ritkán fordulnak elő. A sejtalaktani vizsgálatoknál tapasztalt interneurális jellegű erősíti

a vírusinjektált secretagogin-Cre egerek centrolaterális amygdalájában megfigyelt lokális axonhálózat.

A secretagogin fehérjét tartalmazó sejtek döntő többségében olyan kalcium-kötő fehérjék (parvalbumin, calretinin, calbindin) jelenléte is kimutatható, melyeket a szakirodalomban az interneuronokban előforduló neurális markerekként tartanak számon (Kemppainen és Pitkanen 2000). Mindemellett a centrolaterális régió secretagogin-tartalmú neuronjai 92%-ban PKC δ -t is kifejeznek, ami pedig a nemrégiben karakterizált CeL-off interneuronokat jellemzi.

A projekciós neuronoktól eltérően – melyek hosszú axonjaikkal képesek távoli agyterületekre vetíteni – az interneuronok rövid axonjai csak a sejttestükhöz közeli hálózatok kialakítását teszik lehetővé. Ezért, ha ismert projektív területekre retrográd pályakövető anyagot (BDA-t) fecskendezünk be, azt a vizsgált agyterület interneuronjainak axonjai a távolság miatt nem képesek felvenni. Pályakövetéssel végzett vizsgálataink arra utalnak, hogy az amygdala secretagogin-tartalmú neuronjai nem projekciós neuronok.

Az amygdala területén a secretagogin-tartalmú idegsejteket mind morfológiai-, mind projekciós sajátosságaik az interneuronok közé sorolják. A központi idegrendszerben az interneuronok lokális hálózatot alkotnak, és összehangolt működésükkel a projekciós neuronokat szabályozzák. Ez a szabályozás megvalósulhat gátló hálózat által, vagy éppen ellenkezőleg, diszinhibíció révén létrejövő serkentéssel. Az utóbbi években az amygdala különböző alegységei között megvalósuló összetett magok közötti kapcsolatrendszerben az interneuronok szerepének egyre nagyobb jelentőséget tulajdonítanak (Ehrlich és mtsai 2009). Funkciójukat egyre több viselkedésbiológiai mechanizmusban kimutatták. Habár az ezzel kapcsolatos szakirodalom folyamatosan bővül, még számos felfedezésre váró részlet maradt.

5.2 A secretagogin fehérje leginkább az amygdaláris neuronok posztszinaptikus terminálisaiban fordul elő

A secretagogint a hasnyálmirigy β sejtjeiben fedezték fel, ahol az inzulinvezikulák kalcium-függő ürülésében játszik szerepet. Kompartmentalizációs vizsgálata során kiderült, hogy ezekben a sejtekben 90%-ban a citoplazmában lokalizálódik (Wagner és mtsai 2000). A későbbiekben a secretagogint preszinaptikus terminálisokban jegyezték le, ahol a vezikuláris exocitózisban tulajdonítottak neki szerepet (Alpar és mtsai 2012, Romanov és mtsai 2015, Alpar és mtsai 2018). Az ultrastrukturális vizsgálataink során mi is kimutattuk patkány amygdalában a secretagogint szimmetrikus szinapszisok preterminális kompartmentjeiben, azonban posztszinaptikusan is megfigyeltük a fehérje jelenlétét. Szinaptikus molekulák vizsgálatára alkalmas sejtfrakcionálási eljárásokkal megmutattuk, hogy a secretagogin expressziója az idegsejtek posztszinaptikus terminálisaira koncentrálódik. Ez arra enged következtetni, hogy funkciója a vezikuláris exocitózis helyett-, valamely posztszinaptikus kompartmentre jellemző jelátviteli mechanizmusban keresendő. Az intracelluláris útvonalak katalizátorai a sejtfelszíni receptorok, és ioncsatornák. Az ionotróp glutamát receptorok közé tartozó NMDA receptor fontos kulcsmolekulája az amygdalához köthető sejtélettani folyamatoknak, mint a szinaptikus plaszticitás-, vagy a memória kialakulása. Ezenkívül az NMDA receptor – mint kísérleteink alapján a secretagogin az amygdaláris neuronokban - az idegsejtek posztszinaptikus membránjában található meg. Egy rendelkezésünkre álló, korábbi tömegspektrometriai adatsort újraelemelve bukkant fel az NMDA receptor 2B alegység (NR2B), mint a secretagogin lehetséges interaktív partnere. Az ezt követő immunprecipitációs vizsgálat kimutatta, hogy az NR2B megtalálható a secretagogin interaktómájában patkány amygdalában. A továbbiakban *in vitro* primer sejtenyészeten végzett immuncitokémiai eljárással mutattam meg a két fehérje kolokalizációját. Ez az interakció fontos szerepet töltött be kutatásom további, a secretagogin intracelluláris funkciójának vizsgálatára irányuló szakaszában.

5.3 A secretagodin szerepe az NMDA receptor aktivációjában

Az NMDA-típusú glutamát receptor egy idegsejtekben előforduló heterotetramer receptor, mely a szinaptikus plaszticitáshoz kapcsolódó celluláris mechanizmusok katalizátoraként közismert. A receptort a posztszinaptikus membrán depolarizációja aktiválja, ehhez azonban szükséges az alegységek összeszerelődése, és a receptor rögzülése a sejtmembránban. Utóbbi horgonyzófehérjék segítségével valósulhat meg, melyekhez a receptor 2B alegysége képes kötődni. Ez a kapcsolat foszforiláció révén jön létre, ami ugyanezen alegység 1472-s tirozinján következik be.

Az NR2B és a secretagodin kapcsolatának további vizsgálatához SEP-NR2B konstrukciót tartalmazó plazmidot használtam (Kopec és mtsai 2006). Ez a plazmid egy különleges, pH-érzékeny GFP szekvenciát tartalmaz. Ennek segítségével a jelölt molekula csak az extracelluláris, magasabb pH-n detektálható, mert savas kémhatású közegben a fluoreszcencia kioltódik. A rendszer ezáltal alkalmas a vizsgálni kívánt receptor mozgásának, transzport-, és trafficking folyamatainak nyomonkövetésére (Ashby és mtsai 2004). Ezzel az NR2B plazmiddal és secretagodin siRNS-vel neuroblasztoma sejteket kotranszfectálva megfigyeltem, hogy a géncsendesített, kevesebb secretagodint tartalmazó neuronok perifériás területein - ahol az NMDA receptorok összeszerelődése és aktivációja zajlik - az NR2B-GFP jelintenzitás is kisebb. Ennek alapján a secretagodin nem csak interaktív partnere az NMDA receptor 2B alegységének, hanem annak sejt felszíni mennyiségére is hatást gyakorol.

A fixált metszeteken végzett megfigyelések feltételezték a secretagodin szerepét az NMDA receptor transzportfolyamataiban. Ezek a mechanizmusok legjobban élősejtes („live-imaging”) technológiával követhetőek nyomon. Ilyen technológia az általunk alkalmazott FRAP is. Ugyanazt a sejt vonalat, plazmidot és transzfectálási technikát alkalmazva a sejtben belüli receptor-mozgást is megvizsgáltam. A sejtekben mérhető alapszintű NR2B jelintenzitás is már eltérő volt a géncsendesített és a kontroll sejtekben: a kevesebb secretagodin-tartalmú neuronokban kevesebb sejt felszíni NR2B alegységet jelölő GFP volt detektálható. Ennek megfelelően a kontroll sejtekhez képest a géncsendesített neuronokban a fakítást követően a fluoreszcens jel később, és kisebb amplitúdóval tért vissza. A FRAP kísérletben a riporter fehérje jelintenzitásából következtethetünk a jelölt molekula, esetünkben az NR2B alegység mennyiségére. A

secretagodin géncsendesítésének következtében kevesebb NR2B horgonyzódik a plazmamembránban. Ez a jelenség a secretagodin-receptor interakció következménye, és nem a géncsendesített neuronok NMDA receptorainak össz mennyisége miatt tapasztalható. Utóbbi lehetőségét egy kontroll kísérlettel kizártuk. A secretagodin tehát közvetlen hatással van az NR2B sejtfelszíni lokalizációjára, ezáltal pedig az NMDA receptor működésére, és az általa katalizált sejtaktivációs folyamatokra.

Az NR2B alegység a poszt-szinaptikus membránban horgonyzófehérjékhez kapcsolódik. Az ehhez szükséges, 1472-es tirozin foszforilációt segíti elő a secretagodin. Az *in vitro* géncsendesített neuronokban kisebb mértékű foszforiláció mérhető a kontroll sejtekhez képest, vagyis a secretagodin mennyisége korrelál az NR2B alegység Tyr-1472-s foszforilációjával.

A secretagodin fehérje az NMDA receptor 2B alegységének a 1472-s tirozinján történő foszforilációját segíti elő, ezáltal hatást gyakorol a receptor poszt-szinaptikus membránban történő lokalizációjára. A secretagodin-tartalmú neuronok ebből fakadóan befolyásolják az NMDA receptor közvetítésével megvalósuló celluláris mechanizmusokat.

5.4 A centrolaterális amygdalában található secretagogin-tartalmú gátló neuroncsoport szabályozza a viselkedési válaszokat kondicionált stressz során

Az eddigi vizsgálataim alapján a secretagogin fehérje az NR2B alegységgel való kölcsönhatásán keresztül szabályozhatja azokat a sejtélettani folyamatokat, melyekben az NMDA receptornak központi szerepe van. Az amygdala területére fókuszálva ezek a mechanizmusok a tanulási folyamatokkal, illetve a viselkedési reakciók kiváltásával kapcsolatosak. A klasszikus félelem-kondicionálás lehetőséget ad arra, hogy az amygdalához köthető, tanulás révén kialakuló viselkedésbiológiai folyamatokat tanulmányozzuk. Az eddigi eredményeimet (a secretagogin expressziós mintázata és interneuron-jellege) figyelembe véve figyelmem az amygdala centrolaterális interneuronjaira irányult. A centrális amygdalán belül működő gátló neuronhálózatnak egyre nagyobb jelentőséget tulajdonítanak a kondicionált veszéllyel kapcsolatos válaszreakciók kialakításában (Ehrlich és mtsai 2009, Haubensak és mtsai 2010). A laterális divízió gátló- (CeL-off), és aktiváló (CeL-on) sejtcsoportjain keresztül szabályozza a mediális divízió működését. Utóbbi pedig projekciókat küld a viselkedési válaszok kiváltásáért felelős agyi régiók felé, az agytörzs és a hipotalamusz területére. A secretagogin szerepét a centrolaterális amygdala interneurális hálózatában kemogenetikával kombinált félelem kondicionálással vizsgáltam. A kondicionált stresszre a különböző vírussal (aktiváló, gátló, kontroll) injektált secretagogin-Cre egerek eltérő válaszreakciót mutattak. A centrolaterális amygdala secretagogin-tartalmú idegsejtjeinek gátlása erőteljes hatással van az egerek védekezési magatartására, mely leginkább a mozdulatlan ledermedés időtartamában, illetve a kísérleti idő alatt megtett távolságban mutatkozik meg. A secretagogint gátló vírussal injektált egerek sokkal több ideig maradtak mozdulatlanok („freezing”), illetve kisebb területet jártak be a kondicionáló dobozban a kontroll, és az aktivált csoporthoz képest. Haubensak és munkatársai (Haubensak és mtsai 2010) korábban ugyanilyen eredménnyel elvégeztek egy hasonló kísérletet, amelyben PKC δ -Cre egereket használtak. Megállapították, hogy a centrolaterális amygdala PKC δ -pozitív sejtjei azonosak az irodalomban korábban leírt (Ehrlich és mtsai 2009) „CeL-off” sejtekkel, melyek alapállapotban gátolják a centrális amygdala mediális divíziójának projekciós neuronjait, ezáltal megakadályozzák a PAG-által kiváltott védekezési viselkedés kialakulását. Ezen sejtcsoport amygdaláris

gátlásakor az egerek sokkal erőteljesebb „freezing” reakciót mutattak, akár csak a secretagoin-tartalmú neuronok esetében. A hasonlóságok tükrében új hipotézist állítottunk fel, mely szerint a secretagoin-pozitív sejtek a CeL-off neuronok csoportjába tartoznak. A scgn-Cre vírusinjektált egerekből származó mintákon végzett PKC δ immunfestés alátámasztotta, hogy a centrális amygdala területén található secretagoin-tartalmú neuronok azonosak a PKC δ -pozitív CeL-off sejtcsoporttal. A centrolaterális amygdalában a secretagoin-tartalmú sejtek döntő többsége, 92%-a PKC δ -immunoreaktív neuron.

A centrális amygdala a kondicionált félelemhez kapcsolódó stresszfolyamatokon kívül, az akut stresszben, és a stresszrel kiváltható viselkedési reakciókban is fontos (Kalin és mtsai 1994, De Francesco és mtsai 2015, Zhang és mtsai 2017). A klasszikus stresszválasz során megvalósuló hipotalamusz-agyalapi mirigy-mellékvese útvonalban a CRH kulcsfontosságú szerepet tölt be. A szakirodalomból már ismert, hogy a centrális amygdala területén CRH-t kifejező neuronok találhatóak nagy mennyiségben (Palkovits 2000). CRH-GFP transzgenikus egereken végzett secretagoin immunfestés kimutatta, hogy az amygdala komplexben a secretagoin-, illetve a CRH fehérjét kifejező idegsejtek külön sejtcsoportot alkotnak. Ez a megállapítás alátámasztja, hogy a secretagoin-pozitív sejtek PKC δ -tartalmú „CeL-off” sejtek, melyekről tudni lehet, hogy nem fejeznek ki CRH-t (Haubensak és mtsai 2010). Formalin injekcióval kiváltott akut fájdalom okozta stresszt patkányokon vizsgálva megmutattam, hogy a stresszor által kiváltott c-fos expressziója az amygdaláris secretagoin-tartalmú neuronokban nem jellemző. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy az amygdalában a secretagoin-tartalmú neuronok akut fájdalom hatására nem aktiválódnak, illetve nem vesznek részt a klasszikus stresszválasz kiváltásában. A centrolaterális amygdalában található secretagoin-pozitív sejtpopuláció szerepe főként a kondicionált stressz okozta viselkedési válasz kialakításában van.

6. Következtetések

- A sorozatmetszeteken végzett immunfestés alapján elmondható, hogy mind az emberi-, mind pedig a patkány és egér amygdalában a legtöbb secretagoin-tartalmú neuron a centrális alegységben található. Mindkét esetben a legkevesebb immunoreaktív sejtet a kortikális területeken figyeltem meg.
- A secretagoin-tartalmú sejtek főként multipoláris, interneuronokra-jellemző morfológiát mutatnak, ennek megfelelően axonjaik a közelben végződnek. Ezzel összhangban a secretagoin kolokalizál több kalcium-kötő fehérjével, melyek előfordulása leginkább interneuronokra jellemző.
- Az intracelluláris lokalizáció vizsgálatára végzett elektronmikroszkópos-, és molekuláris vizsgálatok a secretagoin fehérje posztszinaptikus előfordulását igazolják az amygdalában.
- A posztszinaptikus membránban lokalizálódó, NMDA-típusú glutamát receptor 2B alegysége a secretagoin fehérje interaktív partnere.
- A secretagoin szabályozza az NR2B alegység posztszinaptikus membránban történő lokalizációját, ezáltal az NMDA receptor által közvetített sejtaktivációt. A secretagoin mennyiségének a csökkentése kevesebb sejt felszíni NR2B-t eredményez.
- A secretagoin szerepe az NMDA receptor 2B alegység foszforilációjának az elősegítése, mely foszforiláció szükséges a receptor membránba való rögzüléséhez.
- A secretagoin-tartalmú neuronok, a centrális amygdala laterális részében „CeL-off” sejtcsoportként leírt, protein kináz C deltát (PKC δ) kifejező neuronok közé tartoznak. Ennek megfelelően gátlásukkal a centromediális régió diszinhibíció által aktiválódni fog, mely így célterületeinek aktiválásával viselkedésbeli változásokat (magnövekedett ledermedési reakció) eredményez.
- Az amygdalában található secretagoin-tartalmú neuronok a kondicionált stresszfolyamatban vesznek részt.
- A secretagoin fehérje mennyisége szuicid egyedek amygdalájában csökken, ami a secretagoin szerepét feltételezi a félelmi diszfunkcióval összefüggésbe hozható humán betegségekben.

7. Összefoglalás

Az amygdalát a védekezési viselkedés központjaként tartják számon, így kiemelten fontos a veszélyingerre adott elkerülési reakció kialakításában. Ezekben a folyamatokban a centrális magok szerepe a legfontosabb, melyek működését GABAerg idegsejtek kapcsolattrendszere határozza meg. Neurokémiai és neuroanatómiai jellegük alapján új idegsejt populációt azonosítottunk az egér, patkány és ember amygdalájának centrolaterális részében. Kemogenetikai vizsgálatokkal igazoltuk, hogy a sejtcsoport az effektor régiók felé projiciáló neuronokat gátolja. A félelem kondicionálás során lejátszódó asszociatív tanulás NMDA receptor függő folyamat. Kimutattuk, hogy a sejtekben található secretagogin kalcium szenzor fehérje posztszinaptikus helyzetű, és az NMDA receptor 2B alegységének a felszíni sejtmembránba juttatásához szükséges folyamatot szabályozza. Eredményeinket széles eszköztárral értük el: a képalkotásban fény, fluoreszcens-szuperrezolúciós és elektronmikroszkópos módszerekkel, mennyiségi RNS- és fehérje analízisekkel követtük a funkcionális változásokat, a sejtalkotókat és a szinapszisok kompartmentjeit szelektív frakcionálásokkal különítettük el, a valós idejű receptor alegységmozgásokat FRAP-mikroszkóppal végeztük. *In vivo* kemogenetikai beavatkozásokkal célzottan befolyásoltuk vizsgált sejtjeink aktivitását viselkedés vizsgálatainkban, míg *in vitro* körülmények között géncsendesítéssel a secretagogin-függő sejtbiológiai folyamatokat tanulmányoztuk. Összességében, egy eddig kevésbé ismert kalcium-kötő fehérje pontos funkciójára világítottunk rá az amygdala egy meghatározott területének egy speciális sejtcsoportjában, és tisztáztuk annak viselkedésben betöltött szerepét.

8. Summary

The amygdala is considered to be the center of emotional processes and defensive behavior. It coordinates the avoidance response to the dangerous stimulus, specifically during fear conditioning. The central nuclei are known to play an important role in these processes through the inhibitory system of GABAergic neurons. Based on their neurochemical and neuroanatomical characteristics we identified a novel cell population in the centrolateral amygdala of mice, rats and human. Using chemogenetics we showed that these cells inhibit effector neurons which gate motor control. Associative learning in fear conditioning is a NMDA receptor dependent process. We showed that the calcium sensor protein secretagoin is localized in the postsynapse and shapes the availability of the NMDA 2B subunit in the cell membrane. We combined a wide methodology in our research: light-, superresolution and electron microscopy helped morphological characterization, quantitative RNA and protein analysis to trace functional changes, cell- and synaptic compartments were isolated using special fractionations, whereas receptor subunit trafficking was diagrammed using real-time FRAP microscopy. *In vivo* chemogenetics allowed us to control cell activity of the targeted cell population in behavioural analysis, whilst secretagoinin-dependent cellular machineries were identified using *in vitro* gene silencing. Conclusively, we explored the exact cell biological role of a hitherto less characterized calcium sensor protein in a specific neuron population of a select brain region and identified its role in behaviour.

9. Irodalomjegyzék

Al-Hallaq RA, Conrads TP, Veenstra TD and Wenthold RJ (2007). "NMDA di-heteromeric receptor populations and associated proteins in rat hippocampus." J Neurosci 27(31): 8334-8343.

Alheid GF (2003). "Extended amygdala and basal forebrain." Ann N Y Acad Sci 985: 185-205.

Alheid GF and Heimer L (1988). "New perspectives in basal forebrain organization of special relevance for neuropsychiatric disorders: the striatopallidal, amygdaloid, and corticopetal components of substantia innominata." Neuroscience 27(1): 1-39.

Alpar A, Attems J, Mulder J, Hokfelt T and Harkany T (2012). "The renaissance of Ca²⁺-binding proteins in the nervous system: secretogin takes center stage." Cell Signal 24(2): 378-387.

Alpar A, Tortoriello G, Calvigioni D, Niphakis MJ, Milenkovic I, Bakker J, Cameron GA, Hanics J, Morris CV, Fuzik J, Kovacs GG, Cravatt BF, Parnavelas JG, Andrews WD, Hurd YL, Keimpema E and Harkany T (2014). "Endocannabinoids modulate cortical development by configuring Slit2/Robo1 signalling." Nat Commun 5: 4421.

Alpar A, Zahola P, Hanics J, Hevesi Z, Korchynska S, Benevento M, Pifl C, Zachar G, Perugini J, Severi I, Leitgeb P, Bakker J, Miklosi AG, Tretiakov E, Keimpema E, Arque G, Tasan RO, Sperk G, Malenczyk K, Mate Z, Erdelyi F, Szabo G, Lubec G, Palkovits M, Giordano A, Hokfelt TG, Romanov RA, Horvath TL and Harkany T (2018). "Hypothalamic CNTF volume transmission shapes cortical noradrenergic excitability upon acute stress." EMBO J 37(21).

Andressen C, Blumcke I and Celio MR (1993). "Calcium-binding proteins: selective markers of nerve cells." Cell Tissue Res 271(2): 181-208.

Ashby MC, De La Rue SA, Ralph GS, Uney J, Collingridge GL and Henley JM (2004). "Removal of AMPA receptors (AMPA receptors) from synapses is preceded by transient endocytosis of extrasynaptic AMPARs." J Neurosci 24(22): 5172-5176.

Bagur R and Hajnoczky G (2017). "Intracellular Ca²⁺ Sensing: Its Role in Calcium Homeostasis and Signaling." Mol Cell 66(6): 780-788.

Bale TL and Vale WW (2004). "CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors." Annu Rev Pharmacol Toxicol 44: 525-557.

Balu DT (2016). "The NMDA Receptor and Schizophrenia: From Pathophysiology to Treatment." Adv Pharmacol 76: 351-382.

Batiuk MY, de Vin F, Duque SI, Li C, Saito T, Saido T, Fiers M, Belgard TG and Holt MG (2017). "An immunoaffinity-based method for isolating ultrapure adult astrocytes based on ATP1B2 targeting by the ACSA-2 antibody." J Biol Chem 292(21): 8874-8891.

Bickart KC, Dickerson BC and Barrett LF (2014). "The amygdala as a hub in brain networks that support social life." Neuropsychologia 63: 235-248.

Blechert J, Michael T, Vriends N, Margraf J and Wilhelm FH (2007). "Fear conditioning in posttraumatic stress disorder: evidence for delayed extinction of autonomic, experiential, and behavioural responses." Behav Res Ther 45(9): 2019-2033.

Botta P, Demmou L, Kasugai Y, Markovic M, Xu C, Fadok JP, Lu T, Poe MM, Xu L, Cook JM, Rudolph U, Sah P, Ferraguti F and Luthi A (2015). "Regulating anxiety with extrasynaptic inhibition." Nat Neurosci 18(10): 1493-1500.

Brose N, Petrenko AG, Sudhof TC and Jahn R (1992). "Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface." Science 256(5059): 1021-1025.

Bruckner G, Brauer K, Hartig W, Wolff JR, Rickmann MJ, Derouiche A, Delpesch B, Girard N, Oertel WH and Reichenbach A (1993). "Perineuronal nets provide a polyanionic, glia-associated form of microenvironment around certain neurons in many parts of the rat brain." Glia 8(3): 183-200.

Bucy PC and Kluver H (1955). "An anatomical investigation of the temporal lobe in the monkey (*Macaca mulatta*)." J Comp Neurol 103(2): 151-251.

Burgoyne RD and Haynes LP (2012). "Understanding the physiological roles of the neuronal calcium sensor proteins." Mol Brain 5(1): 2.

Caillard O, Moreno H, Schwaller B, Llano I, Celio MR and Marty A (2000). "Role of the calcium-binding protein parvalbumin in short-term synaptic plasticity." Proc Natl Acad Sci U S A 97(24): 13372-13377.

Calvigioni D, Mate Z, Fuzik J, Girach F, Zhang MD, Varro A, Beiersdorf J, Schwindling C, Yanagawa Y, Dockray GJ, McBain CJ, Hokfelt T, Szabo G, Keimpema E and Harkany T (2017). "Functional Differentiation of Cholecystokinin-Containing Interneurons Destined for the Cerebral Cortex." Cereb Cortex 27(4): 2453-2468.

Carafoli E and Krebs J (2016). "Why Calcium? How Calcium Became the Best Communicator." J Biol Chem 291(40): 20849-20857.

Celio MR, Spreafico R, De Biasi S and Vitellaro-Zuccarello L (1998). "Perineuronal nets: past and present." Trends Neurosci 21(12): 510-515.

Chareyron LJ, Banta Lavenex P, Amaral DG and Lavenex P (2011). "Stereological analysis of the rat and monkey amygdala." J Comp Neurol 519(16): 3218-3239.

Chen BS and Roche KW (2007). "Regulation of NMDA receptors by phosphorylation." Neuropharmacology 53(3): 362-368.

Ciocchi S, Herry C, Grenier F, Wolff SB, Letzkus JJ, Vlachos I, Ehrlich I, Sprengel R, Deisseroth K, Stadler MB, Muller C and Luthi A (2010). "Encoding of conditioned fear in central amygdala inhibitory circuits." Nature 468(7321): 277-282.

Cuenod CA, Denys A, Michot JL, Jehenson P, Forette F, Kaplan D, Syrota A and Boller F (1993). "Amygdala atrophy in Alzheimer's disease. An in vivo magnetic resonance imaging study." Arch Neurol 50(9): 941-945.

Cull-Candy SG and Leszkiewicz DN (2004). "Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses." Sci STKE 2004(255): re16.

Dalton GL, Wu DC, Wang YT, Floresco SB and Phillips AG (2012). "NMDA GluN2A and GluN2B receptors play separate roles in the induction of LTP and LTD in the amygdala and in the acquisition and extinction of conditioned fear." Neuropharmacology 62(2): 797-806.

De Francesco PN, Valdivia S, Cabral A, Reynaldo M, Raingo J, Sakata I, Osborne-Lawrence S, Zigman JM and Perello M (2015). "Neuroanatomical and functional characterization of CRF neurons of the amygdala using a novel transgenic mouse model." Neuroscience 289: 153-165.

Dingledine R, Borges K, Bowie D and Traynelis SF (1999). "The glutamate receptor ion channels." Pharmacol Rev 51(1): 7-61.

Dosemeci A, Tao-Cheng JH, Vinade L and Jaffe H (2006). "Preparation of postsynaptic density fraction from hippocampal slices and proteomic analysis." Biochem Biophys Res Commun 339(2): 687-694.

Duvarci S and Pare D (2014). "Amygdala microcircuits controlling learned fear." Neuron 82(5): 966-980.

Ehrlich I, Humeau Y, Grenier F, Ciocchi S, Herry C and Luthi A (2009). "Amygdala inhibitory circuits and the control of fear memory." Neuron 62(6): 757-771.

Fadok JP, Krabbe S, Markovic M, Courtin J, Xu C, Massi L, Botta P, Bylund K, Muller C, Kovacevic A, Tovote P and Luthi A (2017). "A competitive inhibitory circuit for selection of active and passive fear responses." Nature 542(7639): 96-100.

Freund TF and Buzsaki G (1996). "Interneurons of the hippocampus." Hippocampus 6(4): 347-470.

Ganella DE and Kim JH (2014). "Developmental rodent models of fear and anxiety: from neurobiology to pharmacology." Br J Pharmacol 171(20): 4556-4574.

Gartner W, Lang W, Leutmetzer F, Domanovits H, Waldhausl W and Wagner L (2001). "Cerebral expression and serum detectability of secretagoin, a recently cloned EF-hand Ca(2+)-binding protein." Cereb Cortex 11(12): 1161-1169.

Gartner W, Vila G, Daneva T, Nabokikh A, Koc-Saral F, Ilhan A, Majdic O, Luger A and Wagner L (2007). "New functional aspects of the neuroendocrine marker secretagoin based on the characterization of its rat homolog." Am J Physiol Endocrinol Metab 293(1): E347-354.

Gewirtz JC and Davis M (2000). "Using pavlovian higher-order conditioning paradigms to investigate the neural substrates of emotional learning and memory." Learn Mem 7(5): 257-266.

Groc L, Heine M, Cousins SL, Stephenson FA, Lounis B, Cognet L and Choquet D (2006). "NMDA receptor surface mobility depends on NR2A-2B subunits." Proc Natl Acad Sci U S A 103(49): 18769-18774.

Gu Y, Piper WT, Branigan LA, Vazey EM, Aston-Jones G, Lin L, LeDoux JE and Sears RM (2020). "A brainstem-central amygdala circuit underlies defensive responses to learned threats." Mol Psychiatry 25(3): 640-654.

Gut IM, Beske PH, Hubbard KS, Lyman ME, Hamilton TA and McNutt PM (2013). "Novel application of stem cell-derived neurons to evaluate the time- and dose-dependent progression of excitotoxic injury." PLoS One 8(5): e64423.

Hamilton JP, Siemer M and Gotlib IH (2008). "Amygdala volume in major depressive disorder: a meta-analysis of magnetic resonance imaging studies." Mol Psychiatry 13(11): 993-1000.

Hanics J, Szodorai E, Tortoriello G, Malenczyk K, Keimpema E, Lubec G, Hevesi Z, Lutz MI, Kozsurek M, Puskar Z, Toth ZE, Wagner L, Kovacs GG, Hokfelt TG, Harkany T and Alpar A (2017). "Secretagogen-dependent matrix metalloprotease-2 release from neurons regulates neuroblast migration." Proc Natl Acad Sci U S A 114(10): E2006-E2015.

Hanics J, Teleki G, Alpar A, Szekely AD and Csillag A (2017). "Multiple amygdaloid divisions of arcopallium send convergent projections to the nucleus accumbens and neighboring subpallial amygdala regions in the domestic chicken: a selective pathway tracing and reconstruction study." Brain Struct Funct 222(1): 301-315.

Haubensak W, Kunwar PS, Cai H, Cioocchi S, Wall NR, Ponnusamy R, Biag J, Dong HW, Deisseroth K, Callaway EM, Fanselow MS, Luthi A and Anderson DJ (2010). "Genetic dissection of an amygdala microcircuit that gates conditioned fear." Nature 468(7321): 270-276.

Hevesi Z, Zelena D, Romanov RA, Hanics J, Ignacz A, Zambon A, Pollak DD, Lendvai D, Schlett K, Palkovits M, Harkany T, Hokfelt TGM and Alpar A (2021). "Secretagogen marks amygdaloid PKCdelta interneurons and modulates NMDA receptor availability." Proc Natl Acad Sci U S A 118(7).

Hunt S, Sun Y, Kucukdereli H, Klein R and Sah P (2017). "Intrinsic Circuits in the Lateral Central Amygdala." eNeuro 4(1).

Izquierdo I, Furini CR and Myskiw JC (2016). "Fear Memory." Physiol Rev 96(2): 695-750.

Janak PH and Tye KM (2015). "From circuits to behaviour in the amygdala." Nature 517(7534): 284-292.

Johansen JP, Cain CK, Ostroff LE and LeDoux JE (2011). "Molecular mechanisms of fear learning and memory." Cell 147(3): 509-524.

Jollant F, Lawrence NL, Olie E, Guillaume S and Courtet P (2011). "The suicidal mind and brain: a review of neuropsychological and neuroimaging studies." World J Biol Psychiatry 12(5): 319-339.

Kalin NH, Takahashi LK and Chen FL (1994). "Restraint stress increases corticotropin-releasing hormone mRNA content in the amygdala and paraventricular nucleus." Brain Res 656(1): 182-186.

Kamat PK, Kalani A and Tyagi N (2014). "Method and validation of synaptosomal preparation for isolation of synaptic membrane proteins from rat brain." MethodsX 1(2014): 102-107.

Kemppainen S and Pitkanen A (2000). "Distribution of parvalbumin, calretinin, and calbindin-D(28k) immunoreactivity in the rat amygdaloid complex and colocalization with gamma-aminobutyric acid." J Comp Neurol 426(3): 441-467.

Kluver H and Bucy PC (1997). "Preliminary analysis of functions of the temporal lobes in monkeys. 1939." J Neuropsychiatry Clin Neurosci 9(4): 606-620.

Kopec CD, Li B, Wei W, Boehm J and Malinow R (2006). "Glutamate receptor exocytosis and spine enlargement during chemically induced long-term potentiation." J Neurosci 26(7): 2000-2009.

Kovacs KJ and Sawchenko PE (1996). "Sequence of stress-induced alterations in indices of synaptic and transcriptional activation in parvocellular neurosecretory neurons." J Neurosci 16(1): 262-273.

Krashes MJ, Koda S, Ye C, Rogan SC, Adams AC, Cusher DS, Maratos-Flier E, Roth BL and Lowell BB (2011). "Rapid, reversible activation of AgRP neurons drives feeding behavior in mice." J Clin Invest 121(4): 1424-1428.

Kreczmanski P, Heinsen H, Mantua V, Woltersdorf F, Masson T, Ulfing N, Schmidt-Kastner R, Korr H, Steinbusch HW, Hof PR and Schmitz C (2007). "Volume, neuron density and total neuron number in five subcortical regions in schizophrenia." Brain 130(Pt 3): 678-692.

Kunjiappan S, Panneerselvam T, Somasundaram B, Sankaranarayanan M, Parasuraman P, Joshi SD, Arunachalam S and Murugan I (2018). "Design Graph Theoretical Analysis and In Silico Modeling of Dunaliella Bardawil Biomass Encapsulated N-Succinyl Chitosan Nanoparticles for Enhanced Anticancer Activity." Anticancer Agents Med Chem 18(13): 1900-1918.

Lavezzari G, McCallum J, Lee R and Roche KW (2003). "Differential binding of the AP-2 adaptor complex and PSD-95 to the C-terminus of the NMDA receptor subunit NR2B regulates surface expression." Neuropharmacology 45(6): 729-737.

LeDoux JE (2000). "Emotion circuits in the brain." Annu Rev Neurosci 23: 155-184.

Lee EC, Yu D, Martinez de Velasco J, Tessarollo L, Swing DA, Court DL, Jenkins NA and Copeland NG (2001). "A highly efficient Escherichia coli-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA." Genomics 73(1): 56-65.

Lendvai D, Morawski M, Negyessy L, Gati G, Jager C, Baksa G, Glasz T, Attems J, Tanila H, Arendt T, Harkany T and Alpar A (2013). "Neurochemical mapping of the human hippocampus reveals perisynaptic matrix around functional synapses in Alzheimer's disease." Acta Neuropathol 125(2): 215-229.

Lewit-Bentley A and Rety S (2000). "EF-hand calcium-binding proteins." Curr Opin Struct Biol 10(6): 637-643.

Ling YZ, Ma W, Yu L, Zhang Y and Liang QS (2015). "Decreased PSD95 expression in medial prefrontal cortex (mPFC) was associated with cognitive impairment induced by sevoflurane anesthesia." J Zhejiang Univ Sci B 16(9): 763-771.

Luo J, Wang Y, Yasuda RP, Dunah AW and Wolfe BB (1997). "The majority of N-methyl-D-aspartate receptor complexes in adult rat cerebral cortex contain at least three different subunits (NR1/NR2A/NR2B)." Mol Pharmacol 51(1): 79-86.

Maren S and Holmes A (2016). "Stress and Fear Extinction." Neuropsychopharmacology 41(1): 58-79.

Martinez-Garcia F, Novejarque A and Lanuza E (2008). "Two interconnected functional systems in the amygdala of amniote vertebrates." Brain Res Bull 75(2-4): 206-213.

McDonald AJ (1982). "Neurons of the lateral and basolateral amygdaloid nuclei: a Golgi study in the rat." J Comp Neurol 212(3): 293-312.

McDonald AJ (2003). "Is there an amygdala and how far does it extend? An anatomical perspective." Ann N Y Acad Sci 985: 1-21.

McDonald AJ and Augustine JR (1993). "Localization of GABA-like immunoreactivity in the monkey amygdala." Neuroscience 52(2): 281-294.

McDonald AJ, Shammah-Lagnado SJ, Shi C and Davis M (1999). "Cortical afferents to the extended amygdala." Ann N Y Acad Sci 877: 309-338.

McEwen BS (2008). "Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators." Eur J Pharmacol 583(2-3): 174-185.

McGovern S, Maguire ME, Gurd RS, Mahler HR and Moore WJ (1973). "Separation of adrenergic and cholinergic synaptosomes from immature rat brain." FEBS Lett 31(2): 193-198.

Merglen A, Theander S, Rubi B, Chaffard G, Wollheim CB and Maechler P (2004). "Glucose sensitivity and metabolism-secretion coupling studied during two-year continuous culture in INS-1E insulinoma cells." Endocrinology 145(2): 667-678.

Mikhaylova M, Hradsky J and Kreutz MR (2011). "Between promiscuity and specificity: novel roles of EF-hand calcium sensors in neuronal Ca²⁺ signalling." J Neurochem 118(5): 695-713.

Mobbs D, Adolphs R, Fanselow MS, Barrett LF, LeDoux JE, Ressler K and Tye KM (2019). "Viewpoints: Approaches to defining and investigating fear." Nat Neurosci 22(8): 1205-1216.

Morys J, Berdel B, Kowianski P, Majak K, Tarnawski M and Wisniewski HM (1999). "Relationship of calcium-binding protein containing neurons and projection neurons in the rat basolateral amygdala." Neurosci Lett 259(2): 91-94.

Mulder J, Spence L, Tortoriello G, Dinieri JA, Uhlen M, Shui B, Kotlikoff MI, Yanagawa Y, Aujard F, Hokfelt T, Hurd YL and Harkany T (2010). "Secretagoin is a Ca²⁺-binding protein identifying prospective extended amygdala neurons in the developing mammalian telencephalon." Eur J Neurosci 31(12): 2166-2177.

Mulder J, Zilberter M, Spence L, Tortoriello G, Uhlen M, Yanagawa Y, Aujard F, Hokfelt T and Harkany T (2009). "Secretagoin is a Ca²⁺-binding protein specifying subpopulations of telencephalic neurons." Proc Natl Acad Sci U S A 106(52): 22492-22497.

Newman SW (1999). "The medial extended amygdala in male reproductive behavior. A node in the mammalian social behavior network." Ann N Y Acad Sci 877: 242-257.

Ortega F, Gascon S, Masserdotti G, Deshpande A, Simon C, Fischer J, Dimou L, Chichung Lie D, Schroeder T and Berninger B (2013). "Oligodendroglial and neurogenic adult subependymal zone neural stem cells constitute distinct lineages and exhibit differential responsiveness to Wnt signalling." Nat Cell Biol 15(6): 602-613.

Palkovits M (2000). "Stress-induced expression of co-localized neuropeptides in hypothalamic and amygdaloid neurons." Eur J Pharmacol 405(1-3): 161-166.

Pape HC and Pare D (2010). "Plastic synaptic networks of the amygdala for the acquisition, expression, and extinction of conditioned fear." Physiol Rev 90(2): 419-463.

Pereno GL, Balaszczuk V and Beltramino CA (2011). "Detection of conspecific pheromones elicits fos expression in GABA and calcium-binding cells of the rat vomeronasal system-medial extended amygdala." J Physiol Biochem 67(1): 71-85.

Phillips RG and LeDoux JE (1992). "Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning." Behav Neurosci 106(2): 274-285.

Pitkanen A, Savander V and LeDoux JE (1997). "Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala." Trends Neurosci 20(11): 517-523.

Pitts MW, Kremer PM, Hashimoto AC, Torres DJ, Byrns CN, Williams CS and Berry MJ (2015). "Competition between the Brain and Testes under Selenium-Compromised Conditions: Insight into Sex Differences in Selenium Metabolism and Risk of Neurodevelopmental Disease." J Neurosci 35(46): 15326-15338.

Renner E, Puskas N, Dobolyi A and Palkovits M (2012). "Glucagon-like peptide-1 of brainstem origin activates dorsomedial hypothalamic neurons in satiated rats." Peptides 35(1): 14-22.

Riedel A, Hartig W, Seeger G, Gartner U, Brauer K and Arendt T (2002). "Principles of rat subcortical forebrain organization: a study using histological techniques and multiple fluorescence labeling." J Chem Neuroanat 23(2): 75-104.

Rogstam A, Linse S, Lindqvist A, James P, Wagner L and Berggard T (2007). "Binding of calcium ions and SNAP-25 to the hexa EF-hand protein secretagoin." Biochem J 401(1): 353-363.

Romanov RA, Alpar A, Zhang MD, Zeisel A, Calas A, Landry M, Fuszard M, Shirran SL, Schnell R, Dobolyi A, Olah M, Spence L, Mulder J, Martens H, Palkovits M, Uhlen M, Sitte HH, Botting CH, Wagner L, Linnarsson S, Hokfelt T and Harkany T (2015). "A secretagoin locus of the mammalian hypothalamus controls stress hormone release." EMBO J 34(1): 36-54.

Sah P, Faber ES, Lopez De Armentia M and Power J (2003). "The amygdaloid complex: anatomy and physiology." Physiol Rev 83(3): 803-834.

Sankaranarayanan S, De Angelis D, Rothman JE and Ryan TA (2000). "The use of pHluorins for optical measurements of presynaptic activity." Biophys J 79(4): 2199-2208.

Sapolsky RM (2003). "Stress and plasticity in the limbic system." Neurochem Res 28(11): 1735-1742.

Schumann CM, Bauman MD and Amaral DG (2011). "Abnormal structure or function of the amygdala is a common component of neurodevelopmental disorders." Neuropsychologia 49(4): 745-759.

Schumann CM, Hamstra J, Goodlin-Jones BL, Lotspeich LJ, Kwon H, Buonocore MH, Lammers CR, Reiss AL and Amaral DG (2004). "The amygdala is enlarged in children but not adolescents with autism; the hippocampus is enlarged at all ages." J Neurosci 24(28): 6392-6401.

Schwaller B (2009). "The continuing disappearance of "pure" Ca²⁺ buffers." Cell Mol Life Sci 66(2): 275-300.

Schwaller B, Meyer M and Schiffmann S (2002). "'New' functions for 'old' proteins: the role of the calcium-binding proteins calbindin D-28k, calretinin and parvalbumin, in cerebellar physiology. Studies with knockout mice." Cerebellum 1(4): 241-258.

Selye H and Fortier C (1949). "Adaptive reactions to stress." Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis 29: 3-18.

Sheline YI, Gado MH and Price JL (1998). "Amygdala core nuclei volumes are decreased in recurrent major depression." Neuroreport 9(9): 2023-2028.

Skarnes WC, Rosen B, West AP, Koutourakis M, Bushell W, Iyer V, Mujica AO, Thomas M, Harrow J, Cox T, Jackson D, Severin J, Biggs P, Fu J, Nefedov M, de Jong PJ, Stewart AF and Bradley A (2011). "A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function." Nature 474(7351): 337-342.

Skelton NJ, Kordel J, Akke M, Forsen S and Chazin WJ (1994). "Signal transduction versus buffering activity in Ca(2+)-binding proteins." Nat Struct Biol 1(4): 239-245.

Stephenson FA, Cousins SL and Kenny AV (2008). "Assembly and forward trafficking of NMDA receptors (Review)." Mol Membr Biol 25(4): 311-320.

Sudhof TC and Rothman JE (2009). "Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins." Science 323(5913): 474-477.

Sun Y, Qian L, Xu L, Hunt S and Sah P (2020). "Somatostatin neurons in the central amygdala mediate anxiety by disinhibition of the central subnucleus extended amygdala." Mol Psychiatry.

Swanson LW and Petrovich GD (1998). "What is the amygdala?" Trends Neurosci 21(8): 323-331.

Swanson LW and Sawchenko PE (1980). "Paraventricular nucleus: a site for the integration of neuroendocrine and autonomic mechanisms." Neuroendocrinology 31(6): 410-417.

Tang YP, Shimizu E, Dube GR, Rampon C, Kerchner GA, Zhuo M, Liu G and Tsien JZ (1999). "Genetic enhancement of learning and memory in mice." Nature 401(6748): 63-69.

Tao Y, Chen YJ, Shen C, Luo Z, Bates CR, Lee D, Marchetto S, Gao TM, Borg JP, Xiong WC and Mei L (2013). "Erbin interacts with TARP gamma-2 for surface expression of AMPA receptors in cortical interneurons." Nat Neurosci 16(3): 290-299.

Tortoriello G, Morris CV, Alpar A, Fuzik J, Shirran SL, Calvigioni D, Keimpema E, Botting CH, Reinecke K, Herdegen T, Courtney M, Hurd YL and Harkany T (2014). "Miswiring the brain: Delta9-tetrahydrocannabinol disrupts cortical development by inducing an SCG10/stathmin-2 degradation pathway." EMBO J 33(7): 668-685.

Veres JM, Nagy GA and Hajos N (2017). "Perisomatic GABAergic synapses of basket cells effectively control principal neuron activity in amygdala networks." Elife 6.

Veres JM, Nagy GA, Vereczki VK, Andrasi T and Hajos N (2014). "Strategically positioned inhibitory synapses of axo-axonic cells potently control principal neuron spiking in the basolateral amygdala." J Neurosci 34(49): 16194-16206.

Wagner L, Oliyarnyk O, Gartner W, Nowotny P, Groeger M, Kaserer K, Waldhausl W and Pasternack MS (2000). "Cloning and expression of secretagogin, a novel neuroendocrine- and pancreatic islet of Langerhans-specific Ca²⁺-binding protein." J Biol Chem 275(32): 24740-24751.

Weiskrantz L (1956). "Behavioral changes associated with ablation of the amygdaloid complex in monkeys." J Comp Physiol Psychol 49(4): 381-391.

Wolff SB, Grundemann J, Tovote P, Krabbe S, Jacobson GA, Muller C, Herry C, Ehrlich I, Friedrich RW, Letzkus JJ and Luthi A (2014). "Amygdala interneuron subtypes control fear learning through disinhibition." Nature 509(7501): 453-458.

Zhang R, Asai M, Mahoney CE, Joachim M, Shen Y, Gunner G and Majzoub JA (2017). "Loss of hypothalamic corticotropin-releasing hormone markedly reduces anxiety behaviors in mice." Mol Psychiatry 22(5): 733-744.

10. Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

Hevesi Z, Zelena D, Romanov RA, Hanics J, Ignácz A, Zambon A, Pollak DD, Lendvai D, Schlett K, Palkovits M, Harkany T, Hökfelt TGM, Alpár A. Secretagogin marks amygdaloid PKC δ interneurons and modulates NMDA receptor availability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021 Feb 16;118(7):e1921123118. doi: 10.1073/pnas.1921123118. PMID: 33558223. (IF:9,412)

Zahola P, Hanics J, Pintér A, Máté Z, Gáspárdy A, Hevesi Z, Echevarria D, Adori C, Barde S, Töröcsik B, Erdélyi F, Szabó G, Wagner L, Kovacs GG, Hökfelt T, Harkany T, Alpár A. Secretagogin expression in the vertebrate brainstem with focus on the noradrenergic system and implications for Alzheimer's disease. *Brain Struct Funct*. 2019 Jul;224(6):2061-2078. doi: 10.1007/s00429-019-01886-w. Epub 2019 May 29. PMID: 31144035; PMCID: PMC6591208. (IF:3,298)

Alpár A, Zahola P, Hanics J, Hevesi Z, Korchynska S, Benevento M, Pifl C, Zachar G, Perugini J, Severi I, Leitgeb P, Bakker J, Miklosi AG, Tretiakov E, Keimpema E, Arque G, Tasan RO, Sperk G, Malenczyk K, Máté Z, Erdélyi F, Szabó G, Lubec G, Palkovits M, Giordano A, Hökfelt TG, Romanov RA, Horvath TL, Harkany T. Hypothalamic CNTF volume transmission shapes cortical noradrenergic excitability upon acute stress. *EMBO J*. 2018 Nov 2;37(21):e100087. doi: 10.15252/embj.2018100087. Epub 2018 Sep 12. PMID: 30209240; PMCID: PMC6213283. (IF:11,227)

Hanics J, Szodorai E, Tortoriello G, Malenczyk K, Keimpema E, Lubec G, Hevesi Z, Lutz MI, Kozsurek M, Puskár Z, Tóth ZE, Wagner L, Kovács GG, Hökfelt TG, Harkany T, Alpár A. Secretagogin-dependent matrix metalloprotease-2 release from neurons regulates neuroblast migration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Mar 7;114(10):E2006-E2015. doi: 10.1073/pnas.1700662114. Epub 2017 Feb 21. PMID: 28223495; PMCID: PMC5347634. (IF:9,504)

A disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények

Beiersdorf J, Hevesi Z, Calvigioni D, Pyszkowski J, Romanov R, Szodorai E, Lubec G, Shirran S, Botting CH, Kasper S, Guy GW, Gray R, Di Marzo V, Harkany T, Keimpema E. Adverse effects of Δ 9-tetrahydrocannabinol on neuronal bioenergetics during postnatal development. *JCI Insight*. 2020 Dec 3;5(23):e135418. doi: 10.1172/jci.insight.135418. PMID: 33141759; PMCID: PMC7714410. (IF:6,205)

Pintér A, Hevesi Z, Zahola P, Alpár A, Hanics J. Chondroitin sulfate proteoglycan-5 forms perisynaptic matrix assemblies in the adult rat cortex. *Cell Signal*. 2020 Oct;74:109710. doi: 10.1016/j.cellsig.2020.109710. Epub 2020 Jul 9. PMID: 32653642. (IF:3,968)

11. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Prof. Alpár Alánnak, aki szakmai és emberi támogatásával mindig mellettem állt. A tudomány iránti alázata, és elhivatottsága mindig követendő példaként fog szolgálni számomra.

Hálával tartozom Prof. Harkány Tibornak, akitől lehetőséget kaptam a kutatócsoportjához csatlakozva új technológiák elsajátítására, és aki nélkül a disszertációhoz szükséges kézirat nem készülhetett volna el.

Köszönettel tartozom a Kísérletes neuroanatómiai, és fejlődésbiológiai csoport munkatársainak, akik közül Dr. Hanics János és Németh Andrea fáradhatatlan türelmének, és szakmai precizitásának sokat köszönhetek.

Köszönöm az Anatómiai, Szövet-, és Fejlődéstani Intézet valamennyi munkatársának! Hálás vagyok, hogy egy ilyen inspiráló és támogató intézetben tölthettem az elmúlt éveket.

Köszönöm Deák Szilvinek és Gróti Zolinak, hogy a szükséges kísérleti feltételeket mindig biztosították, még ha sokszor erőn felül és időkorlát nélkül kellett is ezért dolgozniuk.

Munkám során olyan kiváló szakemberekkel volt lehetőségem együtt dolgozni, mint Dr. Zelena Dóra és Dr. Schlett Katalin, akik amellet, hogy szakmai fortélyaikat megosztották velem, motiválóan hatottak a gondolkodásomra.

Hálás vagyok Prof. Sass Miklósnak, akinek építő jellegű kritikái és iránymutatásai évek óta meghatározó jelentőségűek az életemben.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm szüleimnek, hogy mindig rendületlenül támogattak, bátorítottak, és a nehezebb időkben is segítettek a helyes irány megtalálásában.