

# A secretagodin fehérje eloszlása és szerepe emlős amygdalában

Doktori tézis

**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

## 1. Bevezetés

A sejtek működéséhez és homeosztázisának fenntartásához elengedhetetlen a kalciumszint intracelluláris szabályozása, melyben a kalcium-kötő fehérjék fontos szereppel bírnak. A kalcium-kötő fehérjék többsége az egész központi idegrendszer területén kimutatható, ám mennyiségük nem egyenletes eloszlású, így a különböző agyi régiókban jellegzetes mintázatot mutatnak. A kalcium-kötő fehérjék családjának legtöbb tagot számláló csoportja-, az „EF-hand” doménnel rendelkező fehérjék alcsaládjá. Az „EF-hand” motívum két alfa-hélixből, illetve a köztük lévő hurok régióból felépülő domén, mely nagy affinitással képes a kalcium megkötésére. Az „EF-hand” szerkezete a törzsfejlődésben konzervált, már prokarióta szervezetekben is kimutatható. Az EF-hand motívummal rendelkező kalcium-kötő fehérjék két nagy csoportot alkotnak: a kalcium puffer és a kalcium szenzor fehérjék csoportját. Az utóbbi csoporthoz tartozó fehérjék kalcium-kötés hatására konformációváltáson mennek keresztül, így képessé válnak különböző jelátviteli utak beindítására. Jelentős szereppel bírnak alapvető sejtelettani mechanizmusokban, mint például a sejtosztódás, az exocitózis, vagy az axonnövekedés.

A kalcium szenzor fehérjék családjának egyik újabban felfedezett tagja a secretagogin, melyet hasnyálmirigy béta sejtjeiből Ludwig Wagner izolált elsőként 2000-ben. Ezekben a sejtekben a secretagogin a klatrinburkos inzulin vezikulák ürítésében játszik szerepet. A secretagogin hat EF-hand motívumot tartalmaz, ám ebből csak öt képes a kalcium tényleges megkötésére. Gerinces élőlények között szerkezetében és funkciójában is konzervált. A secretagogin gén szekvenciája egy 276 aminosavból álló, 32kDa molekulatömegű fehérjét kódol. Frakcionálási és

elektronmikroszkópos vizsgálatok kimutatták, hogy a secretagogin legnagyobb mennyiségben a citoszolban található meg, de a sejtmag területén, illetve membránkompartimentekben is megfigyelhető. A secretagogin 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. A központi idegrendszeren belül a fajok között a secretagogin fehérje expressziós mintázatában jelentős különbségeket tapasztalhatunk.

Az amygdala a temporális lebenyben található agyi régió, melyet egy különálló magcsoportok összességéből felépülő komplexnek tekinthetünk. Három nagy magcsoportot különböztetünk meg: a bazolaterális, a centromediális-, és a kortikális magcsoportot. Ezekhez összesen több, mint 10 mag tartozik, melyek további divíziókra oszthatóak. Az amygdala változatos, alegységenként nagy diverzitást mutató kapcsolatrendszerét mára részletesen feltérképezték. A bazolaterális magcsoporthoz tartozó laterális mag az amygdala komplex „érző határőre”, így az elsődleges befogadója a talamuszból és a szenzoros kéregből beáramló érző információknak. A centrális mag ezzel szemben a legfőbb kimeneti terület, ahonnan főleg az agytörzs, a hipotalamusz és a kéreg felé indulnak projekciók. A 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.

Az amygdala komplexum diverzitása a magcsoport-eloszlásán kívül neurontípusainak sajátosságaiban is megnyilvánul. Az amygdala

bazolaterális részében található idegsejtek körülbelül 80%-a glutamáterg projekciós neuron, míg a centrális amygdala meghatározó sejtípusa a GABAerg neuron. 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. A centrolaterális divízió két nagy, gátló neuroncsoportját a szomatosztatinnal azonosítható „CeL-on”-, illetve a PKC $\delta$ -t kifejező „CeL-off” sejtek jelentik. A szomatosztatinerger neuronok a laterális amygdalából közvetlenül kapnak bemenetet, így egy veszélyhelyzetet jelző ingerre (például félelem kondicionálás során a kondicionált hangjelzésre) gyors aktivációt mutatnak. A PKC $\delta$ -t kifejező neuronok 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.

Az amygdala a limbikus rendszer részeként kiemelkedő szerepet játszik az érzelmi folyamatok szabályozásában, és egyaránt fontos szerepe a tanulásnak és a memória kialakulásának. Ezek a folyamatok bonyolult jelátviteli útvonalakon keresztül következnek be, melyek beindításához elengedhetetlen az intracelluláris kalcium-szint megemelkedése, mely többek között az NMDA receptor aktiválódásának hatására történik. Számos neurodegeneratív betegségben, és kognitív diszfunkcióban jellemző ezeknek a sejtélettani folyamatoknak a zavara, illetve az amygdala kóros elváltozása.

## 2. Célkitűzések

- A secretagodin fehérje eloszlásának immunhisztokémiai módszerekkel történő vizsgálata patkány amygdalából készült sorozatmetszeteken.
- A secretagodin-tartalmú idegsejtek morfológiai leírása, interneuron-, illetve projekciós neuron jellegének meghatározása szövettani módszerek, és pályakövetési eljárások felhasználásával.
- A secretagodin fehérje sejten belüli előfordulásának vizsgálata elektronmikroszkópos analízis, és sejtfractionálási eljárások segítségével.
- A secretagodin fehérje interaktív partnereinek feltérképezése-, és ismert neurális markerekkel való együttes előfordulásának vizsgálata.
- Rágcsálokon végzett viselkedésbiológiai módszerek felhasználásával a secretagodin fehérje szerepének meghatározása az amygdala működésében.
- A secretagodin 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 secretagodin fehérje előfordulási mintázatának meghatározása, a secretagodin-tartalmú idegsejtek morfológiai leírása, illetve mennyiségük meghatározása az amygdala komplex kóros elváltozásaihoz köthető betegségekben.

### **3. Módszerek**

#### **Kísérleti állatok**

Munkámhoz 8-12 hetes, Wistar típusú albínó patkányokat, és 6-18 hetes egereket használtam fel. A kísérletek során kétféle, C57BL/6 genetikai háttérrel rendelkező, transzgenikus egértörzssel dolgoztam: secretagogin-hiányos „knock-out”, illetve secretagogin-Cre egerekkel.

#### **Műtétek**

Az elvégzett műtétek alatt az állatok mélyaltatásban voltak, melyet intramuszkuláris ketamin-xylozin injekcióval, más esetekben izofluránnal biztosítottam.

A retrográd pályakövetés során biotinilált dextrán-amint (BDA) jutattam patkányok agyvelejébe. A vírusinjektálási kísérleteket secretagogin-Cre egereken, bilaterálisan végeztem. A BDA-t Hamilton pipettával, a vírusokat pedig üveg kapillárisal injektáltam. A koordináták pontos meghatározásához Paxinos és Watson atlaszát vettem alapul. A retrográd pályakövetés során az egy hetes túlélési idő kivárása után a transzkardiális perfúziót immunhisztokémiai analízis követte. A vírusinjektált egereken a műtét után 3 hét elteltével félelem kondicionálás kísérletet végeztem.

A transzkardiális perfúzió során fiziológiás sóoldattal átmostam az ereket az aortaíven keresztül, ezt követően pedig 4% paraformaldehidet és 0.1% glutáraldehidet tartalmazó foszfát pufferrel fixáltam az agyvelőt.

#### **Immunhisztokémia**

A kiválasztott metszeteket a foszfát-pufferrel történő többszöri mosást követően 5% szamárserumot, és 0,3% tritont tartalmazó elegyben blokkoltam, majd 2-3 éjszakán át inkubáltam az elsődleges ellenanyagot

tartalmazó oldattal 4°C-on. Ezt követően többször mostam 0,1M PB-vel a metszeteket, majd számrban termeltetett karbocianinnal konjugált másodlagos ellenanyaggal konjugáltam. Újabb, 4°C-on történő inkubálást követően rövid mosási lépések következtek. Az elkészült metszeteket zselatinnal bevont üveg tárgylemezre húztam fel majd xilol-alapú fedőoldattal fedtem le.

A fixált sejtenyészeten végzett immuncitokémiai jelölések során a sejteket 0,1M PB-vel mostam, majd a 4°C-on, 4%-os paraformaldehiddel történő fixálás következett. Ezután egy órán át inkubáltam a sejteket a blokkoló folyadékban mely 10% számrászérumot, és 5% marha szérum albumint tartalmazott. Az elsődleges ellenanyaggal egy éjszakán át, 4°C-on reagáltattam a sejteket. A következő napon a rövid mosási lépéseket egy másfél órás másodlagos ellenanyaggal történő inkubálás követte. A fedőlemezen lévő sejteket 56 °C-os zselatin-glicerol segítségével rögzítettem a tárgylemezhez.

Az elektronmikroszkópos előkészületek során a fixált agyvelőből izolált területeket ozmium-tetroxiddal történő kezelés után növekvő koncentrációjú etil-alkohol sorral víztelenítettem. Intermedier anyagnak propilén-oxidot, a beágyazáshoz pedig epoxi-típusú műgyantát használtam. A beágyazás után következő immunjelölés során ellenanyaggal és kolloidális aranyszemcsével konjugáltattam a grideken lévő mintákat. A kontrasztosítás során uranil-acetátot és ólom-nitrátot alkalmaztam.

### **Western blot analízis**

Western blot analízishez sejtvonalatokat, illetve patkányból és egerből származó mintákat is felhasználtam. Minden esetében proteáz inhibitor tartalmazó lízis pufferrel sejtlyázatumot készítettem. A centrifugálási lépés

során keletkezett felülúszót normalizáltam  $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ -re. Végül egynegyed rész ötszörös töménységű Laemmli oldattal  $95^{\circ}\text{C}$ -on forraltam a mintákat.

Az analízis első lépése a fehérjék méret szerinti szétválasztása poliakrilamid gélelektroforézissel ( $150\text{V}$ , 50 perc). Ezután a gélben molekulatömeg szerint szétvált fehérjéket metanollal aktivált polivinil-difluorid membránra transzferáltam egy órán át  $100\text{V}$ -on. A blokkolást 3% BSA-t tartalmazó mosó pufferben végeztem. A primer antitestet egy éjszakán át  $4^{\circ}\text{C}$ -on, rázógépen reagáltattam a membránnal. A következő napon hosszú mosási lépések után a membránt egy órán át inkubáltam a szekunder ellenanyaggal. Többszöri mosás után következett az előhívás. A normalizáláshoz  $\beta$ -actin fehérjét használtam.

### **Sejtfractionálás**

A sejtfractionálási eljárás során az egyes sejtalkotókat különböző töménységű cukoroldatok segítségével, centrifugálással különítettem el egymástól. Ehhez a patkányokat narkózisban hideg fiziológiás sóoldattal perfundáltam, majd az izolált célterületet proteáz inhibitor tartalmozó szacharóz-HEPES oldatban homogenizáltam. Az első rövid, kis fordulatszámú történő centrifugálással a sejtmagi frakciót jelentő pelletet eltávolítottam, majd a felülúszót további centrifugálási lépéseknek vettem alá a pre-, illetve a posztzinaptikus frakciók kinyeréséhez. A mintákat Western blot analízisre használtam fel.

### **Immunprecipitáció**

A vizsgálni kívánt sejtizátum fehérje-fehérje kapcsolatainak felderítésére alkalmas módszer az immunprecipitáció. Az eljárás során egy specifikus antitesthez kapcsoltuk a vizsgálni kívánt fehérjét, majd antitesthez



kapcsolódni képes „mágnest” adunk a rendszerhez, melyet egy erre specifikus eszközzel ki tudunk nyerni a mintából. Az ellenanyagokon 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 proteáz gátlót tartalmazó HEPES pufferben homogenizáltam. Egy centrifugálási lépés után a felülúszót normalizáltam  $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ -re.

### **Félelem kondicionálás**

Az első kísérleti napon minden állat 10 percet töltött a kondicionáló dobozban annak érdekében, hogy megszokják a környezetet. A második napon egy 10 perces program során 5 feltételes-feltétlen inger párosítást kaptak. Feltételes ingerként egy 80 decibel erősségű síp hangot alkalmaztam. A feltétlen, averzív inger 0,8 milliamper erősségű áram volt. A síphang 20 másodpercig tartott, ennek végén érte az állatot áramütés a padlórácson keresztül. A harmadik napon áramütés nélkül, csak síphangot kaptak a patkányok. A kísérlet végén az állatokat dekapitáltam, eltávolítottam az agyvelőket, majd izoláltam belőlük az amygdalát. A mintákat Western blot analízissel, és immunprecipitációval vizsgáltam.

A secretagogin-Cre egerek félelem kondicionálása során a beadott vírusnak megfelelően 3 kezelési csoport volt: aktiváló, gátló, és kontroll. Ebben a kísérletben minden állat megkapta a hanginger-sokk párosításokat, így csak stresszelt egerekkel dolgoztam. Az egerek a második kísérleti napon, a kondicionálás előtt 30 perccel intraperitoneális CNO injekciót kaptak. A kísérlet végeztével az állatokat perfundáltam, a fixált agyvelőkből készített metszeteken immunfestéseket alkalmaztam.

### ***In vitro* módszerek**

Kísérleteim során insulinoma-eredetű INS-1E-, és neuroblasztoma-eredetű SHSY-5Y sejtvonalat, illetve primer sejttenyészetet használtam. A primer sejttenyészetet 6-8 darab, 20 napos patkány embrió amygdalájából készítettem. A sejteket a megfelelő tápoldatot tartalmazó műanyag tenyésztő flaskában, fiziológias körülményeket biztosító termosztátban tartottam.

A géncsendesítési eljárás során rövid interferáló ribonukleinsavval, más kísérletekben pedig plazmiddal transzfektáltam a sejteket.

### **FRAP (florescence recovery after photobleaching)**

FRAP analízis során SHSY-5Y sejteket egy speciális, pH-érzékeny plazmiddal (pCI-SEP\_NR2B), illetve a kezelési csoportnak megfelelően secretagoin-, vagy kontroll kis interferáló RNS-sel transzfektáltam. Yokogawa CSU-X spinning disk-kel ellátott Zeiss Cell Observer rendszerrel végeztük a kísérleteket. A kijelölt területeken a fluoreszcencia kioltása 473nm-es Rapp lézerrel történt. Minden esetben PlanApochromat 40x/1,4 objektívvel vizsgálódtunk. A kísérlet során 10 kontroll, és 9 secretagoin géncsendesített sejt került elemzésre.

### **Képfeldolgozás, kvantitatív analízis**

A képfeldolgozás során konfokális lézer-pásztázó mikroszkópot (Zeiss LSM780) és JEOL típusú elektronmikroszkópot használtam. Az adatelemzésekhez ZEN szoftver, ImageLab program, EthoVision-, és Solomon Coder állt rendelkezésemre. A statisztikai analíziseket Statistica szoftverrel végeztem. A vizsgálatok kiértékelésekor Student-féle t próbát, ANOVA varianciaanalízist, vagy Mann-Whitney tesztet alkalmaztam.

#### 4. Eredmények

##### **A secretagogin-tartalmú idegsejtek az emlős amygdalában az interneuronok egy csoportját jelölik**

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

A secretagogin-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 interneuronális jelleget 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 neuronális markerekként tartanak számon.

Az *in vivo* retrográd pályakövetési vizsgálat során BDA-t jutattam be három ismert amygdaláris projektív területre, majd BDA+/scgn+ sejteket kerestem

az amygdala területén. A kiértékelés során kettősjelölt sejtet nem találtam, ami az eddigi eredményekkel összhangban arra utal, hogy az amygdala secretagogin-tartalmú neuronjai nem projekciós neuronok.

### **A secretagogin intracelluláris lokalizációjának vizsgálata**

Az ultrastrukturális vizsgálataink során kimutattuk patkány amygdalában a secretagogint szimmetrikus szinapszisok preterminális kompartmentjeiben, azonban leggyakrabban posztszinaptikusan figyeltük meg a fehérje jelenlétét. A továbbiakban patkány agyvelőből izolált mintákból sejtfrakcionálási eljárásokkal előbb szinaptoszóma-, majd pre-, és posztszinaptikus denzitás frakciót készítettem. A kísérlet során azt tapasztaltam, hogy a secretagogin a preszinaptikus frakcióban is kimutatható, ám ez a mennyiség a posztszinaptikus frakcióban detektálható mennyiséghez képest elhanyagolható. Ez arra enged következtetni, hogy a secretagogin funkciója valamely posztszinaptikus kompartmentre jellemző jelátviteli mechanizmusban keresendő. Így, egy korábbi tömegspektrometriai adatsort újraelemelve, posztszinaptikusan lokalizálódó lehetséges interaktív partnereket kerestem. Választásom az NMDA receptor 2B alegységére (NR2B) esett. 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, hogy a két fehérje ugyanabban a membrán régióban koncentrálódik, szuperrezolúciós mikroszkóppal elemezve is közvetlen közelségben.

## **A secretagoin fehérje NMDA receptorra kifejtett hatása**

Az NMDA receptor aktivációjához szükséges az alegységeinek összeszerelődése, és a receptor rögzülése a sejtmembránban. Utóbbi horgonyzófehérjék segítségével valósulhat meg, melyekhez a receptor 2B alegysége képes kötődni a 1472-s tirozinján történő foszforilációjának következtében. *In vitro* a secretagoin géncsendesítését követően kimutattuk, hogy a kevesebb secretagoint tartalmazó sejtekben a foszforilált NR2B mennyisége is kevesebb a kontroll sejtekhez képest, míg az össz- NR2B mennyisége változatlan. Ebből arra következtethetünk, hogy a secretagoin az NMDA receptor 2B alegységének a 1472-s tirozin helyén történő foszforilációját segíti elő, ezáltal befolyással bírhat a receptor sejt felszíni mennyiségének a szabályozására.

Az NR2B és a secretagoin kapcsolatának további vizsgálatához SEP-NR2B konstrukciót tartalmazó plazmidot használtam, melynek előnye, hogy a jelölt molekula csak az extracelluláris, magasabb pH-n detektálható. Ezzel az NR2B plazmiddal és secretagoin siRNS-vel neuroblasztoma sejteket kotranszfektálva megfigyeltem, hogy a géncsendesített, kevesebb secretagoint tartalmazó neuronok perifériás területein - ahol az NMDA receptorok összeszerelődése és aktivációja zajlik - az NR2B-GFP jelintenzitás is kisebb.

Az eddigi eredményekből kiindulva a következő kísérletem egy transzportfolyamatok vizsgálatra alkalmas, élősejtes FRAP analízis volt. Ugyanazt a sejt vonalat, plazmidot és transzfektálási technikát alkalmazva a sejten belüli receptor-mozgást vizsgáltam. A sejtekben mérhető alapszintű NR2B jelintenzitás is már eltérő volt a géncsendesített és a kontroll sejtekben: a kevesebb secretagoin-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 secretagogin géncsendesítésének következtében kevesebb NR2B horgonyzódik a plazmamembránban. Ez a jelenség a secretagogin-receptor interakció következménye, és nem a géncsendesített neuronok NMDA receptorainak össz mennyisége miatt tapasztalható. Utóbbi lehetőségét egy kontroll kísérlettel kizártuk. A secretagogin tehát közvetlen hatással van az NR2B sejt felszíni lokalizációjára, ezáltal pedig az NMDA receptor működésére, és az általa katalizált sejtaktivációs folyamatokra.

### **A secretagogin viselkedésbiológiai szerepének vizsgálata**

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 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 korábban ugyanilyen eredménnyel elvégeztek egy hasonló kísérletet, amelyben PKC $\delta$ -Cre egereket használtak. Megállapították, hogy a centrolaterális amygdala PKC $\delta$ -pozitív sejtjei azonosak az irodalomban korábban leírt „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 secretagogin-tartalmú neuronok esetében. A hasonlóságok tükrében új hipotézist állítottunk fel, mely szerint a secretagogin-pozitív sejtek a CeL-off neuronok csoportjába tartoznak. A scgn-Cre vírusinjektált egerekből származó mintákon végzett PKC $\delta$  immunfestés alátámasztotta, hogy a centrális amygdala területén található secretagogin-tartalmú neuronok azonosak a PKC $\delta$ -pozitív CeL-off sejtcsoporttal. A centrolaterális amygdalában a secretagogin-tartalmú sejtek döntő többsége, 92%-a PKC $\delta$ -immunoreaktív neuron.

A centrális amygdala a kondicionált félelemhez kapcsolódó stresszfolyamatokon kívül, az akut stresszben, és a stresszrel kiváltható viselkedési reakciókban is fontos. 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. CRH-GFP transzgenikus egereken végzett secretagogin immunfestés kimutatta, hogy az amygdala komplexben a secretagogin-, illetve a CRH fehérjét kifejező idegsejtek külön sejtcsoportot alkotnak. Ez a megállapítás alátámasztja, hogy a secretagogin-pozitív sejtek PKC $\delta$ -

tartalmú „CeL-off” sejtek, melyekről tudni lehet, hogy nem fejeznek ki CRH-t. Formalin injekcióval kiváltott akut fájdalom okozta stresszt patkányokon vizsgálva megmutattam, hogy a stresszor által kiváltott c-fos expressziója az amygdaláris secretagogin-tartalmú neuronokban nem jellemző. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy az amygdalában a secretagogin-tartalmú neuronok akut fájdalom hatására nem aktiválódnak, illetve nem vesznek részt a klasszikus stresszválasz kiváltásában. A centrolaterális amygdalában található secretagogin-pozitív sejtpopuláció szerepe főként a kondicionált stressz okozta viselkedési válasz kialakításában van.

### **A secretagogin fehérje funkciója az ember amygdalájában**

Számos neuropszichiátriai-, és neurodegeneratív betegség köthető az amygdala komplex kóros elváltozásához, rendellenes működéséhez. Az eddigi munkám alapján arra voltam kíváncsi, hogy az NMDA receptorral és az amygdalával egyaránt összefüggésbe hozható betegségekben a secretagogin szintje miként változik. Ehhez szuicid-, illetve kontroll amygdala minták secretagogin tartalmát hasonlítottam össze Western blot analízis segítségével. A kiértékelés során azt tapasztaltam, hogy az öngyilkosságban elhunytak mintáiból kimutatható secretagogin szint lényegesen kevesebb a kontroll mintákhoz képest.

A secretagoginnak a mennyiségi csökkenése, illetve az öngyilkosságot elkövetőkre jellemző mentális betegségek között a rendelkezésünkre álló adatokból nem vonhatunk le egyértelmű következtetéseket, azonban a viselkedésbiológiai eredményekkel összevetve a jövőben akár ígéretes diagnosztikus markernek bizonyulhat.



## 5. Következtetések

- Az emberi, patkány és egér amygdalában a legtöbb secretagogin-tartalmú neuron a centrális alegységben található.
- A secretagogin-tartalmú sejtek interneuronokra-jellemző morfológiát mutatnak, axonjaik a közelben végződnek. A secretagogin kolokalizál több, interneuronokra jellemző kalcium-kötő fehérjével.
- Az elektronmikroszkópos-, és molekuláris vizsgálatok a secretagogin fehérje posztszinaptikus előfordulását igazolják az amygdala neuronjaiban.
- Az NMDA-típusú glutamát receptor 2B alegysége a secretagogin fehérje interaktív partnere.
- A secretagogin-tartalmú neuronok, a centrolaterális amygdala „CeL-off” sejtcsoportjaként leírt, protein kináz C deltát kifejező neuronok közé tartoznak. Gátlással a centromediális régió diszinhibíció által aktiválódik, mely így célterületeinek aktiválásával viselkedésbeli változásokat eredményez.
- Az amygdalában található secretagogin-tartalmú neuronok a kondicionált stresszfolyamatokban vesznek részt.
- A secretagogin mennyisége szuicid egyedek amygdalájában csökken, ami a secretagogin fehérje szerepét feltételezi a félelmi diszfunkcióval összefüggésbe hozható humán betegségekben.

## 6. Saját publikációk jegyzéke

### 6.1 A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

Hevesi Z, Zelena D, Romanov RA, Hanics J, Ignác Z, Zambon A, Pollak DD, Lendvai D, Schlett K, Palkovits M, Harkany T, Hökfelt TGM, Alpár A. Secretagoin marks amygdaloid PKC $\delta$  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. Secretagoin 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, Piffl 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. Secretagoin-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)

## 6.2 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  $\Delta^9$ -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)