

# A secretagoin kalciumkötő fehérje előfordulása humán és rágcsáló agytörzsében, valamint a központi idegrendszeri stresszválaszban betöltött szerepe

Doktori tézis

**Dr. Zahola Péter**

Semmelweis Egyetem  
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Alpár Alán, az MTA doktora, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Kovács Krisztina, az MTA doktora, tud. főmunkatárs  
Dr. Káldi Krisztina, PhD, egyetemi docens

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Dénes Ádám, PhD, tudományos főmunkatárs

Tagok: Dr. Réthelyi Miklós, az MTA doktora, professor emeritus

Dr. Dobolyi Árpád, az MTA doktora, egyetemi tanár

Budapest  
2021

## 1. Bevezetés, elméleti háttér

A secretagogin egy rövid, de izgalmas múltra visszatekintő kalcium szenzor fehérje. 2000-ben klónozták pancreas béta sejtekből, majd hamarosan az inzulin felszabadításában, a vezikulák dokkolásában, fúziójában játszott szerepét írták le. Az első eloszlási térképek alapján világossá vált, hogy a secretagogint endokrin sejtek, valamint központi idegrendszeri neuronok expresszálják. 2015 óta az is ismeretes, hogy a hipotalamikus nucleus paraventricularis kissejtes részének eminentia medianara vetülő idegsejtjei a secretagogin közreműködésével választanak ki CRH-t a központi idegrendszeri stresszválasz részeként. Annak ellenére, hogy az elmúlt két évtized egyre bővülő tudásanyaggal szolgált az előagyi előfordulással és funkciókkal kapcsolatban, az agytörzs vizsgálata elmaradt.

Az agytörzs felépítése bonyolult. A tegmentum nagy részét a formatio reticularis tölti ki, mely szürke- és fehérállomány szövevényes hálózata. Többféleképp rendszerezhetők az itt helyet foglaló sejtcsoportok, például lehetnek a medián-paramedián zónában, a mediális zónában, ahol jellemzően nagy sejtes magok vannak vagy a laterális zónában, ahol pedig kissejtes magok találhatóak. A klasszifikáció egy további alapja lehet a sejtek által használt neurotranszmitterek sokfélesége. A formatio reticularisban számos központi idegrendszeri neurotranszmitter jelen van, munkám szempontjából a monoamin transzmitterek fontosak, közülük is a noradrenalinnal, pontosabban a noradrenalint expresszáló neuronokkal foglalkoztam. A noradrenerg sejtek az úgynevezett „A” mezőkben foglalnak helyet az agytörzs mindhárom szintjében, melyek közül a locus coeruleus az A6-os mának felel meg. Munkám során erre a területre koncentráltam.

A locus coeruleus a rostrális hídi tegmentum dorzolaterális részén, közvetlenül a IV. kamra szomszédságában található. Kiterjedt rostrendszerével behálózza az egész neuraxist, a neocortex, a hippocampus, a kisagy, valamint egyes talamikus magok egyedüli noradrenalinforrásként szolgál. Különösen figyelemre méltó, és munkám szempontjából kiemelendő a stresszválasz részeként megjelenő küzdési-menekülési viselkedések szervezőközpontjába, a mediális prefrontális kéregbe futó igen gazdag rostállomány.

A noradrenerg neuronok egyik legmegbízhatóbb markere a tirozin-hidroxiláz, mely a katekolamin bioszintézis sebesség-meghatározó lépését katalizáló enzim. Mennyiségének és aktivitásának finom szabályozása lehetővé teszi a reakcióút végtermékeinek fokozott vagy csökkent képzését, közvetve több vagy kevesebb noradrenalin felszabadítását, így végül nagyobb vagy kisebb mértékű posztzinaptikus válasz kialakítását. A szabályozásnak klasszikusan transzkripciós és poszttranszlációs, ezen belül foszforilációs, illetve ubiquitinációs szintjeit szokás elkülöníteni. Munkám szempontjából a 31-es szerin reziduumon végbemenő, aktivitást és enzimstabilitást fokozó foszforiláció bír kiemelt jelentőséggel, mely a központi idegrendszeri akut stresszválasz egy locus coeruleusban jól megfigyelhető részjelensége.

A stressz pontos definícióját először Selye János határozta meg 1950-ben. Ő ekkor úgy fogalmazott, a stressz a szervezet nem specifikus reakciója minden olyan ingerre, amely kibillentí eredeti egyensúlyi állapotából, és alkalmazkodásra kényszeríti. Ma már tudjuk, hogy a szervezet némiképp különböző reakciókkal válaszol az egyes noxákra, stresszorokra, azonban az alapvetően helytálló, hogy a homeosztázis veszélyeztetésére adaptációs

válással reagál. Miután a stressz során a befutó szignálokat a különböző integratív központok feldolgozták, a két hagyományosan tárgyalt kimenet a sympathoadrenális rendszer, mely neurális összeköttetéseinek köszönhetően millisekundumok alatt aktiválódik, illetve a HPA tengely, mely a gyors hormonális jelátvitel révén másodperces időtávlatban közvetíti a központ izgalmát a perifériára. Emellé a két útvonal mellé egy percek-órák alatt érvényesülő hatású harmadikat, tulajdonképp egy visszacsatoló kört írtunk le munkánk során.

Az idegsejtek közti kommunikációnak egyéb válfajai is léteznek a szinaptikus jelátvitelen kívül. A volumen transzmisszió egy ezek közül. Ez gyakorlatilag a molekuláris szignálok agyi extracelluláris tér minden irányába történő diffúziójaként is elképzelhető, viszont gyakran annyiban több egy tényleges egyszerű diffúziónál, hogy a szekretált molekulák preformált terekben, mint perivaszkuláris vagy periaxonális rések áramlanak, vagy akár a meghatározott keringési iránnyal bíró liquorba választódnak ki. Ezutóbbi esetben különösen nagy távolságokra tud eljutni az információ a felszabadulásának helyétől, így nyilvánvalóan magas affinitású receptorokra van szükség, és maga a jelátvitel igencsak lassú lesz. Ezt kompenzálja valamelyest, hogy egy szinapszis létrehozásához és fenntartásához képest itt jóval kisebb a rendszer energiaigénye.

## 2. Célkitűzések

- A secretagogin fehérje agytörzsi előfordulásának vizsgálata rágcsőkból, majd emberből származó sorozatmetszeteken immunohisztokémiai módszerek segítségével. Az eloszlási mintázat egyéb kalciumkötő fehérjékkel, ismert funkcionális rendszerekkel való átfedésének megállapítása.
- A secretagogin tirozin-hidroxilázzal való nagyfokú kolokalizációja lehetséges okainak – főként az enzim génjének expressziójára, illetve szerin reziduumainak aktivitást befolyásoló foszforilációjára gyakorolt hatásainak vizsgálata. A secretagogin interaktív partnereinek feltérképezése, jelátviteli kaszkádba történő beillesztése.
- A CNTF szerepének tisztázása: felszabadulási helyének, transzmissziójának, tirozin-hidroxilázra gyakorolt hatásának, a központi idegrendszeri stresszválaszban betöltött funkciójának felderítése.
- A secretagogin jelenlétének és a tirozin-hidroxiláz foszforilációjának vizsgálata a locus coeruleus eredetű noradrenerg rostok nagyagykérgi célterületeiben, különös tekintettel az akut stresszben kulcsfontosságú mediális prefrontális kéregre.

### **3. Anyag és módszer**

#### **Állatok**

Állatkísérleteim során Wistar patkányokkal, valamint C57BL/6 egerekkel dolgoztam, mely utóbbiak vad genotípusúak vagy secretagogin-, illetve CNTF génkiütött (KO) állatok voltak. Az állatokat a műtétekhez és a perfúzióhoz ketamin és xilazin elegyével altattam. Az agyaikat perfúziós formalin fixálást követően vagy fixálás nélkül, azonnal szárazjégen fagyasztva távolítottam el. Mintavételezéshez több esetben a Palkovits-féle punch technikát alkalmaztam.

#### **Humán minták**

A humán agytörzsmetszeteken immunohisztokémiai vizsgálatokat, locus coeruleus punch mintákon Western blot fehérje analízist végeztem.

#### **Locus coeruleus szeletkultúra**

300 µm vastag, locus coeruleus szintjében készült koronális agyszeleteket rekombináns CNTF-fel (Sigma) kezeltem, a begyűjtött mintákat Western blot analízissel vizsgáltam.

#### **In vivo géncsendesítés**

In vivo géncsendesítéseim során sztereotaxisban végeztem secretagogin, illetve CNTF siRNS beadását patkányok agykamrarendszerének megfelelő részeire.

### **Formalin stressz**

Stressz kísérleteim során patkányok vagy egerek jobb oldali hátsó végtagjának izomzatába 50 µl 4%-os formalint adagoltam.

### **Pályakövetés**

A LC és a mPFC közötti kapcsolat vizsgálata érdekében anterográd, valamint retrográd pályakövetést végeztem 10, illetve 3 kDa molekulásúlyú BDA sztereotaxisban rögzített állat agyába történő befecskendezésével.

### **CNTF beadás intracerebroventrikuláris kanülön keresztül**

Génkiütött, illetve vad típusú egereknek és patkányoknak mély altatásos műtét során tartós kanült helyeztem az oldalkamrájába. A beépítés után 7 nappal aCSF-ben feloldott rekombináns CNTF-et fecskendeztem be, melynek hatásait open field teszttel, valamint Western blot módszerrel vizsgáltam.

### **Liquor mintavételezés**

ELISA kísérletemhez 8 mély altatott patkány IV. agykamrájából vettem 15-15 µl liquormintát a tarkórégió kiperarálását, és a cisterna magna feltárását követően az apertura mediana ventriculi quartin keresztül.

### **Metszés**

A metszésre kerülő agymintákból 50 vagy 300 µm vastagságú metszeteket készítettem, előbbieket immunohisztokémiai kísérleteimhez, utóbbiakat fehérje, valamint RNS analízis céljából.

### **Immunohisztokémia, képkeltés**

A fénymikroszkópos vizgálatra szánt metszeteimet foszfát-pufferrel többször mostam, a célstruktúrákat standard immunohisztokémiai eljárással jelenítettem meg. A blokkolást 5%-os számarész-úrdattal végeztem, biotin-konjugált másodlagos antitestekkel dolgoztam. A csapadékot avidin-biotin komplex képzésével tettem teljessé, amit végül diaminobenzidin-reagenssel, nikkell-intenzifikálással és hidrogén-peroxiddal tettem láthatóvá.

Egyes fehérjék kolokalizációjának vizgálatához kettős jelöléses immunohisztokémiai eljárást alkalmaztam. A blokkolást ugyanúgy végeztem, mint az egyszeres jelölés esetében. A primer antitesteket koktélban alkalmaztam. Szekunder antitestekként Cy2-, Cy3- és Cy5-konjugált immunoglobulinokat használtam, a pályakövetés után készült metszeteken a BDA-t Cy2-vel vagy Cy3-mal jelölt streptavidinnel tettem láthatóvá. A festett metszeteket felhúzást és fedést követően konfokális lézer szkennig mikroszkóppal vizgáltam.

### **Immunoprecipitáció**

A secretagoin molekulájához kapcsolódó interaktív partnerek azonosításához immunoprecipitációt végeztem mágnés-konjugált IgG segítségével.

### **Szinaptoszóma preparálás**

Egyes fehérjék szinaptoszisbeli jelenlétének igazolása érdekében szinaptoszómát preparáltam 0,32 M, majd 1,3 M koncentrációjú HEPES segítségével.



## **Primer agytörzsi neuronkultúra és géncsendesítés**

Az in vitro géncsendesítés hatásait primer agytörzsi neuronkultúrán, és inzulinóma sejteken vizsgáltam. Előbbit 18 napos patkány embriók agytörzséből készítettem. A sejtek túlélésének 4. napján végeztem a géncsendesítést. A kísérlethez secretagodin siRNS-t a kontrollhoz scramble siRNS-t használtam.

## **Western blot**

A fehérjék mennyiségi analíziséhez főként standard Western blot technikát alkalmaztam. A 2 µg/µl-es protein koncentrációra korigált, Laemmli-pufferrel denaturált mintákból 12-12 µl-t pipettáztam a 8 vagy 10%-os poliakrilamid gélek egyes zsebeibe. A fehérjék elválasztását 10 percig 40 voltos, majd további 50 percig 180 voltos feszültségen végeztem. Ezt követően a proteinsávokat a gélekből 60 perc alatt, 100 voltos feszültség segítségével polivinil-difluorid membránokba transzferáltam. A célfehérjéket immunohisztokémiai eljárással tettem láthatóvá. A membránokat 3%-os marha szérum albuminnal blokkoltam, majd a keresett fehérjék ellen termelt antitestek oldataival inkubáltam. Másodlagos antitestekként tormaperoxidáz-konjugált IgG-t alkalmaztam. Az előhívást kemolumineszcens reagenssel végeztem.

## **ELISA**

A CNTF liquorbeli koncentrációjának meghatározásához standard „szendvics” ELISA kísérletet végeztem. A mikrotiter lemez egyes mikrozsebeibe 100-100 µl mintát pipettáztam. Biotinilált szekunder antitest, streptavidin-tormaperoxidáz reagens, majd a színreakció kifejlődéséhez TMB szubsztrát hozzáadása után, végül a színreakció leállítását követően abszorbanciát mértem.

## **PCR**

Az RNS analíziseimhez mintáimból RNS-t izoláltam, majd az izolált RNS mennyiségét Nanodrop technikával határoztam meg. Ezt követően reverz transzkripciót végeztem, majd a cDNS-hez a megfelelő primer párok valamelyikét, illetve iTaq polimerázt, valamint valós idejű, kvantitatív vizsgálataim során SYBR Green nukleinsavfestéket is tartalmazó reagenst adtam, végül elvégeztem a polimeráz láncreakciót. A kvalitatív analízis során az amplifikációt követően mintáimat 1,5%-os agaróz gélen futtattam.

## **Nyílt aréna (open field) teszt**

Viselkedésbiológiai kísérleteimben a patkányokat 90 x 90 cm-es arénába helyeztük, ahol a mozgásukat egy aréna fölé erősített kamera rögzítette 10 percen keresztül. Az elkészült videófelvételeket offline, egy 1.51w verziójú ImageJ szoftverre fejlesztett Animal Tracker plug-in segítségével elemeztük ki.

## **Statisztikai analízis**

Az eredmények statisztikai analízisét a Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Inc.) szoftvercsomag 17.0-ás verziójának segítségével végeztem. Statisztikai próbaként Student-féle t-próbát vagy varianciaanalízist alkalmaztam.

## **4. Eredmények**

### **A secretagogin eloszlása patkány agytörzsében**

Kísérleteimben kiemelkedő immunoreaktivitásúnak bizonyult többek között a colliculus superior felületes rétege és a periaqueductalis szürkeállomány dorzolaterális része a középagyban, a nucleus parabrachialis, illetve a locus coeruleus a hídban, valamint a nucleus dorsalis nervi vagi a nyúltvelőben. Ezekon túlmenően további kisebb secretagogin tartalmú sejtsoportok rajzolódtak ki, melyek a C1/A1, A5 és A7 sejtsoportoknak megfelelő területeken helyezkedtek el.

### **A secretagogin eloszlása egér agytörzsében**

Patkánnyal való szoros evolúciós kapcsolata miatt közel azonos expressziós mintázatra számítottam egérben is, mely nagyrészt igazolódott is. Secretagogin immunoreaktív neuronokat azonosítottam a nucleus tegmentalis microcellularisban, a nucleus tractus solitariiben, a nucleus dorsalis nervi vagiban, a noradrenerg sejtsoportoknak megfelelő területeken – különös tekintettel a locus coeruleusra – továbbá a colliculus superiorban.

### **A secretagogin jelen van noradrenerg tirozin-hidroxiláz tartalmú locus coeruleus sejtekben**

Secretagogin/TH kettős immunfestés segítségével megállapítottam, hogy patkány locus coeruleusában a jelölődött sejtek döntő többsége koexpresszálja a két fehérjét. A kettősen jelölődött sejtek nyúlványai, melyek dendriteknek imponálnak, gyakran a kamrai felszín közvetlen közelében végződnek. Egereken végzett immunfestéseim hasonlóan magas koexpressziós arányt igazoltak e faj locus coeruleusában is.

## **A secretagodin interaktív partnere az Erk1/2**

Immunoprecipitációt végeztem egész agytörzsi homogenizátumokon, a secretagodin interaktív partnereit Western blot segítségével elemeztem. A kemolumineszcens jeldetektálás során igazolódott a secretagodin Erk1/2-vel való közvetlen kapcsolata, a PKA és a CaMPKII fehérjéket ugyanakkor nem tudtam detektálni az immunoprecipitátumban.

## **A secretagodin tirozin-hidroxiláz expresszióra gyakorolt hatása**

In vivo és in vitro kezeltem a secretagodin tartalmú sejteket rövid interferáló RNS-sel (siRNS), majd valós idejű PCR, Western blot, illetve immunohisztokémiai- és immunocitokémiai eljárásokkal elemeztem a génexpressziós szintű változásokat.

Primer agytörzsi neuronkultúrában a transzfektált neuronokban a secretagodin immunofluoreszcencia gyengébb volt, mint a nem transzfektált neuronokban, ami együtt járt a TH immunoreaktivitás látható csökkenésével. Párhuzamosan tenyésztett agytörzsi sejt kultúrából származó mintákon vizsgáltam az RNS-szintű, inzulinóma eredetű sejt kultúrában pedig a fehérje szintű változásokat. Mindkét esetben az immunocitokémiai vizsgálatokkal összecsengő eredményre jutottam: a secretagodin siRNS-sel transzfektált kultúrákban nemcsak a secretagodin fehérje és a mRNS szintje, hanem ezzel párhuzamosan a TH fehérje és a mRNS mennyisége is csökkenést mutatott. Az in vivo végzett géncsendesítéssel szintén hasonló eredményeket értem el. A IV. agykamrába juttatott siRNS hatására a harmadik napra csökkent a locus coeruleusbeli TH-t expresszáló sejtek denzitása.

## **A tirozin-hidroxiláz foszforilációja secretagogin-függő folyamat a locus coeruleusban**

Fizikai stresszorok képesek aktiválni a LC-t, mely a noradrenerg sejteken belüli TH enzimek szintjén fokozott 31-es szerin helyen történő foszforiláción keresztül valósul meg, a folyamatot az Erk1/2 katalizálja. Patkányok hátsó végtagjába injektált formalinnal valóban nagyobb mértékű 31-es szerin-foszforilációt figyeltem meg a formalin beadását követő 20. percben eltávolított agyminták feldolgozása során magam is.

Vad típusú és secretagogin génkiütött egereket formalinstressznek vetettem alá, hogy megvizsgáljam, a KO állat LC-ában is jelentkezik-e a 31-es szerin foszforiláció, és azt találtam, hogy a secretagogin gén hiánya a vad típusú állat stressze kapcsán megfigyelhető fehérjeszint emelkedést csökkenti.

Ezen eredményeket alátámasztandó egy in vitro neurofarmakológiai kísérletet is végeztem, mely géncsendesítésből és CNTF adminisztrációjából állt. A kísérletet inzulinóma eredetű sejt kultúrámon végeztem. A CNTF kezelés önmagában nem változtatta meg a secretagogin fehérje mennyiségét, de a TH 31-es szerinjén történő foszforilációt fokozta. A secretagogin génjének csendesítése megakadályozta ezt a hatást, nagymértékű 31-es szerinen foszforilált TH-szintbeli csökkenést okozva. A kísérlet során mértem az Erk1/2 foszforilálatlan és foszforilált formáinak sejteken belüli mennyiségét is. Az Erk1/2 foszforilációjára nem volt hatással a secretagogin génjének csendesítése CNTF-kezelés nélkül, azonban CNTF hozzáadását követően a géncsendesítés következtében a foszforiláció csökkent.

## **CNTF hatása agytörzsi szeletkultúrán Erk1/2 és TH foszforilációra**

300 µm vastag, LC-t tartalmazó agytörzsi szeleteket kezeltem rekombináns CNTF-fel, majd a minták begyűjtése után Western blot analízist végeztem. Ebben az ex vivo kísérletben az in vitro kísérlet során megfigyelt

változásokhoz hasonló eredményt kaptam. CNTF hatására emelkedett az agyszövetben a TH és az Erk1/2 enzimek foszforilált izoformáinak mennyisége.

### **A CNTF receptora elsősorban a mPFC-re vetülő LC neuronokon van jelen**

Kettős jelölést alkalmazó immunohisztokémiai kísérlet segítségével sikerült igazolnom, hogy a CNTF receptorát elsősorban TH tartalmú neuronok expresszálják a LC-ban, kamrai felszínig kinyúló dendritjeik koexpresszálják a két fehérjét.

BDA befecskendezésével megvizsgáltam, hogy a mediális prefrontális kéreg felől retrográdan jelölődő LC neuronok és a CNTF receptorral rendelkező noradrenerg sejtek halmazai mennyiben fednek át egymással. A kísérlet során azt találtam, hogy a BDA-val jelölt sejtek közel háromszor akkora sűrűségben hordozzák felszínükön a CNTF receptorát, mint a BDA által jelöletlenek.

### **A CNTF fehérje és mRNS megtalálható a III. kamramenti endimális rétegben**

Egyszeres immunfestéssel és kvalitatív PCR technikával azonosítottam a CNTF-et, illetve mRNS-ét a III. agykamrát határoló felületes sejtrétegben. Egy további, CNTF/GFAP kettős immunofestés alapján a szóban forgó III. kamramenti sejtréteg a felületes endimális sejtrétegnek bizonyult.

### **Akut stressz során a liquor CNTF szintje emelkedik**

Bal hátsó végtagjaikba 4%-os formalinos injekciót kapott patkányok és kezeletlen társaik IV. agykamrájából kinyert liquormintáiban ELISA-val határoztam meg a CNTF koncentrációját. A fájdalomstressznek kitett állatok

mintában a kontrollokban levő CNTF-szinthez képest megközelítőleg háromszoros értéket mértem.

### **CNTF intracerebroventrikuláris adminisztrációjának hatásai**

Intraventriculáris kanülön aCSF-ben feloldott rekombináns CNTF-et infundáltam 10 egér agykamrarendszerébe, majd 60 perc elteltével open field teszttel vizsgáltuk a mozgásukat. A kontroll csoport 10 egyedének agyába csak az oldószert juttattuk be. A teszt során a kontroll állatok mozgása átlagosnak volt tekinthető, míg a CNTF-fel kezelték mozgásszegényebbek lettek, valamint elsősorban a mező perifériásabb részein tartózkodtak.

A viselkedéstesztet követően az állatok agyát eltávolítottam, és további 20 hasonló intracerebroventrikuláris infúziós kezelésen átesett egér (10 CNTF KO – 10 secretagodin KO) agyával együtt Western blot fehérje analízisre bocsátottam, hogy megmérjem a locus coeruleusbeli TH enzimek mennyiségét. A CNTF-et kapott vad típusú állatok agytörzsi mintái az akut stresszre jellemző, szignifikáns mértékű 31-es szerinen foszforilált TH-szint emelkedést mutattak. Míg a CNTF génkiütött állatok TH-szintjeiről ugyanez mondható el, a secretagodin génkiütött állatokban ez a hatás elmaradt.

### **In vivo CNTF géncsendesítés hatása a locus coeruleusbeli tirozin-hidroxiláz foszforilációjára akut stresszben**

8-8 patkány oldalkamrájába injektáltam CNTF vagy scramble siRNS-t, majd 96 óra elteltével az állatok közül csoportonként 4-et formalin stressznek tettem ki. A 60 perc után begyűjtött agyminták locus coeruleust tartalmazó részein Western blot analízist végeztem. Míg a scramble siRNS-t kapott állatokban a formalin stressz hatása az igazolt módon érvényesült, a CNTF siRNS beadása megakadályozta a TH 31-es szerinjének foszforilációját.

## **A prefrontális kérgi secretagoint és tirozin-hidroxilázt koexpresszáló rostok locus coeruleus eredetűek**

3 felnőtt hím patkány agyát fehérje analízis segítségével vizsgálva kimutattam a secretagoin és a 31-es szerinen foszforilált TH jelenlétét többek között az entorhinális kéregben, a primer szomatoszenzoros kéregben, a gyrus cinguliban, a hippocampusban, a kisagyban, továbbá a mediális prefrontális kéregben. A mediális prefrontális kéregben a secretagoin expresszió különösen magas volt.

Ugyanezen állatokból nyert minták szinaptoszóma preparálásával bizonyítottam, hogy a secretagoin fehérje főként a szinapszisokban dúsul a mPFC állományán belül.

További 3 felnőtt hím patkányon végzett immunohisztokémiai módszerrel, kettős jelöléssel jelenítettem meg a mPFC-n belül TH-t és 31-es szerinen foszforilált TH-t tartalmazó rostokat és boutonokat. Számos helyen bukkantam a két fehérje együttes előfordulására.

A locus coeruleusnak megfelelő agyterületre BDA-t injektálva, anterográd pályakövetés segítségével, majd lektinhisztokémiai eljárással tettem láthatóvá a felszálló köteg axonjait, annak végződéseit. A pályakövetéssel kombinált immunohisztokémiai festés eredményei igazolták, hogy a mPFC-ben az anterográd jelölt rostok 31-es szerinen foszforilált TH-t tartalmaznak.

## **A secretagoin fehérje eloszlása humán agytörzsben**

A formalin fixált agytörzsi metszeteken immunohisztokémiai eljárással tettem láthatóvá a secretagoin tartalmú sejteket. A patkányban és egérben megfigyelthez hasonlóan emberben is secretagoin pozitívnak bizonyultak a noradrenerg agytörzsi sejtcsoportoknak imponáló területek, így az A1, az A6, azaz a locus coeruleus, illetve az A7. Mindezek mellett a humán agytörzs további régióiban is tömörültek secretagoin tartalmú neuronok, rágcsálók



agytörzsében találtakkal hasonló eloszlásban, például a nucleus dorsalis nervi vagiban.

Ember locus coeruleusában secretagoin expressziót TH-immunoreaktív sejtekben találtam. A secretagoin jelenlétére utaló immunjelet jellemzően a sejtestek perifériás részein, valamint a nyúlványokban azonosítottam.

### **Mennyiség és foszforiláció vizsgálata akut stresszben, humán mintákon**

Kísérleteim egy részéhez akut szívelégtelenségben elhunyt személyek locus coeruleus punch mintáit használtam, mivel e kórkép a halál beállta előtt erős fájdalommal, egyúttal akut stresszállapottal jár. A vizsgálati anyagban a secretagoin mennyisége kétszeresére nőtt a TH és a 31-es szerinen foszforilált TH szintjeinek emelkedése mellett. Ehhez hasonló eredményeket kaptam kísérleteim másik részében, ahol öngyilkosságot elkövetett személyek agytörzseiből származó locus coeruleus punch mintákat dolgoztam fel. Megemelkedett secretagoin-, TH- és 31-es szerinen foszforilált TH-szinteket mértem, amely valószínűleg annak tudható be, hogy az öngyilkos cselekedet elkövetése előtt a személy erős stresszhelyzetben volt.

## 5. Következtetések

- A secretagodin egy jól használható neurokémiai markere agytörzsi relémagoknak, vegetatív és stressz központoknak.
- A secretagodin agytörzsi eloszlása nagyfokú hasonlóságot mutat egérben, patkányban és emberben.
- A secretagodin az Erk1/2 enzimen keresztül idézi elő a TH 31-es szerin reziduumának foszforilációját akut stresszben.
- A CNTF liquorban mérhető szintje szignifikáns emelkedést mutat akut stressz során.
- A CNTF akut stressz során a III. agykamramenti endimális réteg sejtjeiből szabadul fel.
- A CNTF akut stressz során liquor mediálta volumen transzmisszióval éri el a LC-beli TH tartalmú neuronokon található receptorait.
- A CNTF receptora megtalálható a mPFC-be projiciáló TH tartalmú LC neuronokon.
- A secretagodin jelen van a mPFC-ben, főként szinapszisokban.
- A mPFC-be projiciáló LC eredetű rostokon belül megtalálható a 31-es szerin reziduumon foszforilált TH.

## 6. Saját publikációk jegyzéke

### A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

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 G, 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.

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.

### **A disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények**

Patthy Á, Murai J, Hanics J, Pintér A, Zahola P, Hökfelt TG, Harkany T, Alpár A. Neuropathology of the Brainstem to Mechanistically Understand and to Treat Alzheimer's Disease Neuropathology of the Brainstem to Mechanistically Understand and to Treat Alzheimer's Disease. J Clin Med. 2021 Apr 7;10(8):1555. doi: 10.3390/jcm10081555. Epub 2021 Apr 7. PMID: 33917176

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

Nardai S, László M, Szabó A, Alpár A, Hanics J, Zahola P, Merkely B, Frecska E, Nagy Z. N,N-dimethyltryptamine reduces infarct size and improves functional recovery following transient focal brain ischemia in rats. Exp Neurol. 2020 May;327:113245. doi: 10.1016/j.expneurol.2020.113245. Epub 2020 Feb 14. PMID: 32067950.