SEMMELWEIS EGYETEM

DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

2574.

ZAHOLA PÉTER

Neuromorfológia és sejtbiológia
című program

Programvezető: Dr. Alpár Alán, egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Alpár Alán, egyetemi tanár

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

Doktori értekezés

Dr. Zahola Péter

Semmelweis Egyetem
Szentágothai 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

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke 6

2. Bevezetés, elméleti háttér 9

2.1. A secretagogin kalciumkötő fehérje 9

2.1.1. A kalciumion 9

2.1.2. A kalciumkötő fehérjék 9

2.1.3. A secretagogin 10

2.1.3.1. Szerkezet és lokalizáció 10

2.1.3.2. Funkcionális ismeretek 11

2.2. Agytörzsi funkcionális rendszerek 14

2.2.1. Az agytörzs szerkezete 14

2.2.2. A hálózatos állomány 14

2.2.3. Monoaminerg rendszerek 15

2.2.3.1. Szerotonin tartalmú neuronok rendszere 15

2.2.3.2. Noradrenalin és adrenalin tartalmú neuronok rendszere 16

2.2.3.3. Dopamin tartalmú neuronok rendszere 18

2.2.3.4. A monoaminerg rendszerek gyakorlati jelentősége 18

2.3. A tirozin-hidroxiláz 20

2.3.1. A katekolaminok élettani jelentősége és bioszintézise 20

2.3.2. A TH szerepe 21

2.3.3. A TH aktivitásának és mennyiségének szabályozása noradrenerg-adrenerg sejtekben 22

2.3.3.1. A TH aktivitásának szabályozása 22

2.3.3.2. A TH sejten belüli mennyiségének szabályozása 25

2.4. A központi idegrendszeri stresszválasz 28

2.4.1. A stresszről általánosságban 28

2.4.2. A stresszorok 28
2.4.3. A stresszválasz 29
2.4.3.1. A stressz fázisai, időbelisége 29
2.4.3.2. A stressz során aktiválódó legfontosabb idegrendszeri elemek 30
2.4.3.3. A stressz mediátorai 32
2.5. A liquor mediálta volumen transzmisszió 35
2.5.1. A liquorkeringés 35
2.5.2. Volumen transzmisszió a központi idegrendszerben 35
3. Célkitűzések 37
4. Anyag és módszer 38
4.1. Állatok 38
4.2. Humán minták 38
4.3. LC szeletkultúra 38
4.4. In vivo géncsendesítés 39
4.5. Kolhicin kezelés 39
4.6. Formalin stressz 40
4.7. Anterográd pályakövetés 40
4.8. Retrográd pályakövetés 40
4.9. CNTF beadás intracerebroventrikuláris kanülön keresztül 41
4.10. Liquor mintavételezés 42
4.11. Perfúzió, fixálás 42
4.12. Metszés 42
4.13. Immunohisztokémia, képalkotás 43
4.14. Immunoprecipitáció 44
4.15. Szinaptoszóma preparálás 44
4.16. Primer agytörzsi neuronkultúra és géncsendesítés 45

4.17. INS1-E inzulinóma sejtvonal 45
4.18. Western blot 46
4.19. ELISA 46
4.20. PCR 47
4.21. Nyílt aréna (open field) teszt 48
4.22. Statisztikai analízis 48
5. Eredmények 52
5.1. A secretagogin eloszlása patkány agytörzsében 52
5.2. A secretagogin eloszlása egér agytörzsében 54
5.3. Secretagogin expresszióbeli különbségek patkány és egér agytörzsében 55
5.4. A secretagogin viszonya más kalciumkötő fehérjékhez 58
5.5. A secretagogin jelen van noradrenerg TH tartalmú LC sejtekben 60
5.6. A secretagogin nincs jelen az agytörzs dopaminerg és szerotoninerg sejtjeiben . 63
5.7. A secretagogin interaktív partnere az Erk1/2 64
5.8. A secretagogin TH expresszióra gyakorolt hatása 65
5.9. A LC-beli TH foszforilációja akut stresszben 69
5.10. A TH foszforilációja secretagogin-függő folyamat a LC-ban 69
5.11. CNTF hatása agytörzsi szeletkultúrán Erk1/2 és TH foszforilációra 72
5.12. A CNTF receptora megtalálható a LC-beli noradrenerg neuronokon 73
5.13. A CNTF receptora elsősorban a mPFC-re vetülő LC neuronokon van jelen 74
5.14. A CNTF fehérje és mRNS megtalálható a III. kamramenti ependimális rétegben 75
5.15. Akut stressz során a liquor CNTF-szintje emelkedik 77
5.16. CNTF intracerebroventrikuláris adminisztrációjának hatásai 78
5.17. In vivo CNTF géncsendesítés hatása a TH foszforilációjára akut stresszben 80
5.18. A prefrontális kérgi secretagogint és TH-t koexpresszáló rostok LC eredetűek 81

5.19. A secretagogin fehérje eloszlása humán agytörzsben 84

5.20. Mennyiség és foszforiláció vizsgálata akut stresszben, humán mintákon 85

6. Megbeszélés 87

6.1. A secretagogin az emlős agytörzsében relémagokban, vegetatív és stressz központokban fordul elő 87

6.2. A secretagogin befolyásolja a TH expresszióját és foszforilációját noradrenerg LC sejtekben 87

6.3. Akut stressz során a III. kamramenti ependimális réteg sejtjeiből felszabaduló CNTF liquor mediálta volumen transzmisszióval jut el a LC-beli TH tartalmú neuronokon található receptoraihoz 89

6.4. A secretagogin befolyásolja a noradrenalin indukálta neuronális excitabilitást a prefrontális kéregben 90

7. Következtetések 91

8. Összefoglalás 92

9. Summary 93

10. Irodalomjegyzék 94

11. Saját publikációk jegyzéke 116

11.1. A disszertációhoz kapcsolódó közlemények 116

11.2. A disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények 117

12. Köszönetnyilvánítás 118

1. Rövidítések jegyzéke

ACTH - adrenokortikotrop hormon

aCSF - arteficiális cerebrospinális folyadék

AP-1 - aktivátor protein-1

A.sze. - akut szívelégtelenség

BDA - biotinilált dextránamin

BH4 - tetrahidrobiopterin

BNST - nucleus interstitialis striae terminalis

bp - bázispár

Ca^{2+} - kalcium-ion

CaMPKII - kalcium-kalmodulin-dependens protein kináz II

CaRE - kalcium-reszponzív elem

cAMP - ciklikus adenozin-monofoszfát

CB - calbindin D28k

cDNS - komplementer dezoxiribonukleinsav

cGMP - ciklikus guanozin-monofoszfát

CNTF - ciliáris neurotrofikus faktor

CNTFR - ciliáris neurotrofikus faktor receptor

CNTFRα - ciliáris neurotrofikus faktor receptor alfa alegység

CR - calretinin

CRE1/2 - ciklikus adenozin-monofoszfát-reszponzív elem 1/2

CRH - kortikotropinfelszabadító hormon

DMEM/F12 - Dulbecco's Modified Eagle Medium és Ham's F12 Medium

DNS - dezoxiribonukleinsav

Egr1/Sp1 - korai növekedési válasz fehérje-1/szteroidogenikus faktor-1

ELISA - enzimkapcsolt immunoszorbens vizsgálat

ENK - enkefalin

ERE - ösztrogén-reszponzív elem

Erk1/2 - extracelluláris szignál-regulált kináz 1/2

GABA - gamma-amino-vajsav

GAPDH - glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz

GFAP - gliális fibrilláris savas protein

GFP - zöld fluoreszcens protein

HEPES - 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetánszulfonsav

HPLC - nagy teljesítményű folyadékkromatográfia

HRE - hipoxia-reszponzív elem

IgG - immunoglobulin G

IH - immunohisztokémia

KO - génkitütött (knock out)

ktrl - kontroll

LC - locus coeruleus

L-DOPA - L-3,4-dihidroxifenilalanin

m - középvonal

M - mol/liter

MAPK - mitogén aktiválta protein kináz

MAPKAPK1/2/5 - mitogén aktiválta protein kináz aktiváló protein kináz 1/2/5

mk - monoklonális

mPFC - mediális prefrontális kéreg

mRNS - hírvivő ribonukleinsav

MSK1 - mitogén és stressz-aktiválta kináz 1

NPY - neuropeptid Y

NT - non-target

NTS - nucleus tractus solitarii

öngy. - öngyilkos

PB - foszfát-puffer

PCR - polimeráz láncreakció

pErk1/2 - foszforilált extracelluláris szignál-regulált kináz 1/2

PFA - formalin

pk - poliklonális

PKA - protein kináz A

PKC - protein kináz C

PKG - protein kináz G

PLC - foszfolipáz C

PMK - posztmortem késedelmi idő

PP2A - foszfoprotein foszfatáz 2A

PP2C - foszfoprotein foszfatáz 2C

$pSer^{31}$ - 31-es szerinen foszforilált tirozin-hidroxiláz

$pSer^{40}$ - 40-es szerinen foszforilált tirozin-hidroxiláz

PV - parvalbumin

RNS - ribonukleinsav

RPMI-1640 - Roswell Park Memorial Institute Medium

RT - reverz transzkriptáz

scgn - secretagogin

siRNS - rövid interferáló ribonukleinsav

SNAP - szolubilis N-etilmaleimid szenzitív faktor-asszociált protein

syn. fr. - szinaptoszóma-frakció

syn.phys. - szinaptofizin

sz.g. - szaglógumó

TBE - Tris-borát-EDTA

TH - tirozin-hidroxiláz

TMB - tetrametilbenzidin

vt - vad típus

WB - Western blot

Az eloszlási térképeknél használt anatómiai elnevezések a Paxinos agyatlaszok [1, 2] nómenklatúrájának felelnek meg, rövidítéseik a képaláírásokban kerültek feloldásra.

2. Bevezetés, elméleti háttér

2.1. A secretagogin kalciumkötő fehérje

2.1.1. A kalciumion

A kalciumion (Ca^{2+}) az élő szervezetek egyik legfontosabb kationja. Nélkülözhetetlen szerepet tölt be többek között a véralvadásban [3], a normál csontszerkezet fenntartásában [4], az izmok összehúzódásában [5], az axonális transzportban [6, 7], az idegsejtek ingerelhetőségében [8, 9], a neurotranszmisszióban [10, 11].

Az alapállapotban levő (azaz nem aktivált) sejtekben a sejtplazma szabad Ca^{2+}-koncentrációja 10^{-8}-10^{-7} M között változik. A sejten belüli Ca^{2+}-tartalom nagyobb része Ca^{2+}-puffer fehérjékhez kötött (szekvesztrált) formában, valamint intracelluláris organellumokban, például az endoplazmatikus retikulumban található. A sejten belüli Ca^{2+}-szint emelkedése különböző ingerekre következhet be, hatása is szerteágazó [12]. Jelátviteli folyamatokban a megemelkedett sejten belüli Ca^{2+}-koncentrációt úgynevezett Ca^{2+}-szenzor fehérjék érzékelik. Ezek a fentebb említett Ca^{2+}-pufferekkel együtt a kalciumkötő fehérjék családját képezik [13].

2.1.2. A kalciumkötő fehérjék

A kalciumkötő fehérjék néhányszor tízezer Dalton molekulatömegű intracelluláris fehérjék. A Ca^{2+} kötéséért felelős doménjeik alapján három osztályba sorolhatók, úgy mint EF-hand fehérjék, annexinek és C2-domain fehérjék [14]. Az EF hand fehérjék térszerkezetében jellegzetes a többször ismétlődő hélix-hurok-hélix motívum, amely a Ca^{2+} megkötésére alkalmas három dimenziós struktúra. Affinitásuk alapján a kalciumkötő fehérjék két fő csoportja a Ca^{2+}-pufferek és a Ca^{2+}-szenzorok. Előbbiekre jellemző, hogy sok Ca^{2+}-t képesek felvenni, a Ca^{2+}-t alacsony asszociációs állandóval jellemezhető reakcióban kötik meg, tehát alacsony Ca^{2+}-szintek mellett már kialakul a Ca^{2+}-fehérje komplex, így a sejten belüli Ca^{2+}-koncentrációt szűk intervallumban képesek tartani. Konformációjukat Ca^{2+}-kötés során nem változtatják. A Ca^{2+}-pufferek csoportjának jellegzetes központi idegrendszeri képviselője a parvalbumin. A másik típusú kalciumkötő fehérjék, a Ca^{2+}-szenzorok, magasabb Ca^{2+}-szint mellett kötnek meg

néhány iont, és ennek hatására megváltoztatják konformációjukat. A térszerkezet-változás lehetővé teszi, hogy interakcióba lépjenek specifikus célfehérjékkel, ekképp illeszkedve a jelátviteli kaszkádokba. Klasszikusan központi idegrendszeri Ca^{2+}-szenzor fehérjék például a szinaptotagmin [15] és a kalmodulin [16], illetve a secretagogin is e csoportba sorolható [13].

A központi idegrendszeri neuronok jellemzően egyféle kalciumkötő fehérjét expresszálnak. Természetesen vannak kivételek, de a kolokalizációk ellenére sok idegsejt-populáció azonosítható a rá jellemző fehérjetípus expressziós mintázata alapján [17-19]. Egy adott kalciumkötő fehérje jelölhet akár egész pályákat, teljes funkcionális rendszereket is, mint ahogy az a parvalbumin és az epikritikus szenzibilitásért felelős agyi régiók, vagy a calbindin és az ízérző rendszer esetén igaz patkányban [20].

2.1.3. A secretagogin

2.1.3.1. Szerkezet és lokalizáció

A secretagogin fehérjét először 2000-ben klónozták, hasnyálmirigy β-sejtekből. Génje, a SCGN gén, emberben a 6-os kromoszóma rövid karjának 22.1-22.3 régióján található. A humán secretagogin egy 276 aminosavból álló, 32 kilodalton (kDa) molekulatömegű, Ca^{2+}-szenzorokra jellemző tulajdonságokkal bíró kalciumkötő fehérje [21]. A sejten belül döntő többsége a sejtplazmában lokalizálódik, ám kis mennyiségben a magban is jelen van [22]. Hat EF-hand motívummal rendelkezik, melyből kettő funkcióját vesztette a törzsfejlődés során, a maradékból pedig egy magas, míg a többi három alacsonyabb affinitású Ca^{2+}-kötőhely. Rendszertanilag az embertől távol álló fajokban is nagymértékű homológia fedezhető fel szekvenciájában és szöveti eloszlásában. A secretagogin expresszióját a felfedezését követő néhány évben szinte az összes szervrendszerben igazolták rágcsálókban és főemlősökben egyaránt, beleértve az embert is. A vizsgálatok során kezdetben az endokrin rendszert térképezték fel. Kimutatták a fehérje jelenlétét hasnyálmirigyben, mellékvesevelőben, valamint -kéregben, pajzsmirigyben, agyalapi mirigyben, illetve a gyomor-bélrendszer lumenes szerveinek falában. Kettős jelölést alkalmazó immunoreakciókban minden vizsgált szervben nagymértékű kolokalizációs arány volt megfigyelhető a secretagogin és különböző neuroendokrin markerek között.

További kutatómunka eredményeként készült el az első agyvelőbeli eloszlási mintázatot demonstráló térkép, mely erősen immunoreaktív struktúrákat azonosított többek között a szaglógumóban, a retinában, a hipotalamuszban, a temporális kéregben, a törzsdúcokban, az amigdalában, a hippokampuszban, a locus coeruleusban (LC) és a kisagyban. A secretagogin tartalmú sejtek neuronoknak bizonyultak. Az indusium griseum secretagogin tartalmú sejtjei axonjaikkal egészen az agykamrai felszínig elértek. Mindezek mellett a vizsgálatok egy kisebb, agyvízben (liquor cerebrospinalis) keringő frakciót is leírtak, amely származhatott az imént említett sejtnyúlványokból aktív szekréció eredményeként, de akár a normál körülmények között elpusztuló kamraközeli neuronokból is [22-24].

2.1.3.2. Funkcionális ismeretek

A secretagogin szerepét elsőként endokrin sejtek és neuronok transzportvezikuláinak dokkolásában, fúziójában igazolták. Az interakciós partnerek között úgynevezett SNAP fehérjéket (szolubilis N-etilmaleimid szenzitív faktor-asszociált protein), kinezineket, tubulineket azonosítottak. A feltételezések szerint a secretagogin az exocitotikus effektor komplexek Ca^{2+}-függő finomhangolásáért felelős, ezáltal nélkülözhetetlen a vizsgált sejtek hormon- és neurotranszmitter szekréciójában [25].

Fejlődéstani vizsgálatok kimutatták, hogy a secretagogin fehérje az egér embrió fejlődésének 11. napján detektálható először az előagyban, azon belül is az agyhólyag elülső falán, a leendő szaglógumónak megfelelő területen. A szóban forgó sejtek a következő napokban átvándorolnak a differenciálódási zónán, osztódnak, és végül eljutnak a szaglógumóba vagy a szubpalliumon át a tágabb értelemben vett amigdalába, ahol elnyerik a kolinerg vagy GABAerg neuronokra jellemző neurokémiai vonásokat. Mindeközben secretagogin expressziójukat mindvégig megtartják. Ezen adatok azt sugallják, hogy a secretagogin szerepet játszhat az újonnan képződött vándorló neuronok Ca^{2+}-függő citoszkeletális átrendeződéseiben, sejtszintű motilitásában, morfológiai differenciálódásukban [22, 23].

Részletesen vizsgálták rágcsálók és nyúl retináját, ahol csap bipoláris sejt altípusok bizonyultak secretagogin tartalmúnak [26]. Ezzel szemben humán retinában a pálcika

fotoreceptorok kültagjai, illetve amakrin sejtek tartalmazzák nagyobb mennyiségben a fehérjét [27]. A 4-6 napos újszülött egerekben megfigyelt gyors secretagogin expresszió emelkedés, amely megelőzi az állat szemnyitását, és a kérgi plaszticitás szempontjából kritikus időszakot, melynek során a szenzoros neuronkörök nagymértékű aktivitásfüggő változásai jönnek létre, arra utal, hogy a secretagogin hozzájárulhat egyes sejt közötti kapcsolatok, szinapszisok képződéséhez, azok funkcionális éréséhez [26, 28].

Az utóbbi évek egyik talán legfigyelemreméltóbb felfedezése volt a secretagogin stressz során megfigyelhető kortikotropinfelszabadító hormon (CRH) felszabadulásban betöltött szerepének bizonyítása. A kalciumkötő fehérjét a hipotalamikus nucleus paraventricularis, azon belül is egy dorzolaterálisan tömörülő, vazopresszint, illetve oxytocint termelő sejtek között található kissejtes neuroszekretoros sejtpopuláció expresszálja [29, 30]. A szómán kívül a secretagogin ezen sejtek axonterminálisaiban is jelen van, a plazmamembrán és a CRH-tartalmú dense core vezikulák külső membránjához asszociáltan. Ezen megfigyelések a géncsendesítéses kísérletek során tapasztalt szomális CRH-retencióval, valamint szignifikáns plazma kortikoszteronszint-csökkenéssel kiegészítve egyértelműsítik a secretagogin CRH-felszabadulásban és en bloc a stresszválaszban játszott kulcsfontosságú szerepét [30].

A secretagogin eloszlási mintázatának változásait Alzheimer-kóros mintákon vizsgáló kísérletekben bizonyítást nyert, hogy az ammon-szarv valamennyi területén csökkent a secretagogin expresszió az egészséges idősekből nyert mintákhoz képest [31], illetve, hogy a secretagogin tartalmú neuronokban hiperfoszforilált tau fehérjét csak kivételes esetekben lehet azonosítani [32]. Lehetséges, hogy a hiperfoszforilált tau felhalmozódása a sejten belül oly mértékben rontja a neuron integritását, hogy az képtelenné válik bizonyos fehérjéi, köztük a secretagogin expressziójára. Valószínűbb ugyanakkor, hogy a secretagogin neuroprotektív tényező lehet Alzheimer-kórban, és aktívan gátolja a mikrotubulusokat stabilizáló tau fehérjék hiperfoszforilációját - mely nézetet alátámasztják patológiás tau proteint expresszáló transzgenikus egerekből származó adatok, valamint az a teória is, mely szerint a secretagoginnak szerepe lehet a mikrotubuláris komplexek szabályozásában [33, 34]. Mindezen túl nem lenne egyedülálló, hogy egy kalciumkötő fehérje védő faktor legyen az Alzheimer-kórral

szemben, hisz a parvalbuminról és a calretininről is hasonló adatok láttak napvilágot, annak ellenére, hogy pontos hatásmechanizmusuk mindmáig nem ismert [35, 36].

A secretagogin szerepét több tudományterületen kezdték feltérképezni, a hátralevő elvégzendő munka mindazonáltal hatalmas. Annak ellenére, hogy ígéretes eredmények születnek előfordulásával kapcsolatban, és különösen a funkcionális ismeretek terén, a mechanizmusban betöltött szerepe ismeretlen. Amennyiben valóban a „neuronális kalciumkötő fehérjék negyedik muskétásáról" (Marco R. Celio [37]) van szó, úgy valószínűleg hatalmas mennyiségű és kiemelt jelentőségű tudásanyag vár még felfedezésre vele kapcsolatban.

2.2. Agytörzsi funkcionális rendszerek

2.2.1. Az agytörzs szerkezete

Az agytörzs három részre osztható, melyek kaudokraniális irányban haladva a következők: nyúltvelő (medulla oblongata), híd (pons) és középagy (mesencephalon). A nyúltvelő kaudális részében még a gerincvelőre emlékeztető felépítést láthatunk, azonban kraniál felé haladva egyre inkább átalakul a szerkezet. Az agytörzs pályarendszerei (az itt áthaladó fel- és leszálló pályák, valamint az innen kiinduló fel-, le- és a kisagyba sugárzó pályák) a gerincvelőben és a nyúltvelő kaudális részében még egységes központi szürkeállományt feldarabolják, magokra, magoszlopokra tagolják. Ezen magoszlopokba rendezetten foglal helyet a 12 pár agyideg valamennyi szomatomotoros, viszceromotoros, szomatoszenzoros, illetve viszceroszenzoros magja. A gerincvelő szintjében még csupán a canalis centralis közvetlen környékére korlátozódó szürkeállomány az agytörzs magasságában kiterebélyesedik, és kialakít egy, az agytörzs szinte teljes egészét átszövő hálózatos állományt [38, 39].

2.2.2. A hálózatos állomány

A hálózatos állományt, vagy más néven a formatio reticularist régebben egyszerűen interneuronok szövevényes hálózatának tekintették, azonban jelen tudásunk szerint rendkívül összetett, magasan szervezett rendszer. Az idegsejtek korántsem diffúzan helyezkednek el, hanem pontosan meghatározott lokalizációjú és felépítésű sejtfészkekben, sejtcsoportokban [40, 41].

A formatio reticularis sejtcsoportjait elhelyezkedésük és működési sajátosságaik alapján három hosszanti zónára oszthatjuk fel. A középvonalban és annak közvetlen szomszédságában levő magok a median-paramedian zónát alkotják. Raphemagokként is szokás hivatkozni rájuk. Tőlük laterálisan található a mediális zóna, melynek sejtcsoportjai gyakran nagyméretű sejteket tartalmaznak. Innen a másik nevük: gigantocelluláris magok. A laterális zóna az előbbi zóna külső oldalán van, és vele ellentétben szinte kizárólag kisméretű idegsejtek fordulnak elő benne. A laterális zóna sejtcsoportjait parvocelluláris magoknak is szokás nevezni. Az egyes zónák magcsoportjai, magjai leszálló, felszálló pályákon és lokális agytörzsi axonrendszereken

keresztül megannyi gerincvelői és agyi területtel alakítanak ki kapcsolatot. A formatio reticularis magjai afferens és efferens kapcsolataikon keresztül számos életfunkció (pl. szenzoros ingerületek feldolgozása, mozgáskoordináció, alvás-ébrenlét, központi idegrendszeri stresszválasz kialakítása, légzés, keringés) szabályozásában alapvető jelentőséggel bírnak. Nem véletlen, hogy az agytörzs e részét ért károsító folyamatok az élettel összeegyeztethetetlen vagy hosszas, esetleg végleges öntudatlan állapotok kialakulásához vezethetnek [38, 42].

2.2.3. Monoaminerg rendszerek

A formatio reticularis különböző magjaiban levő neuronok rendkívül változatosak mind morfológiai, mind élettani tulajdonságaik tekintetében. Többek között eltérő neurotranszmittereket is használnak. Egyes neurotranszmitterek azonban a többinél nagyobb gyakoriséggal fordulnak elő, méghozzá jól definiált lókuszokban. Ilyenek például a biogén aminok családjába tartozó monoaminok [38, 43].

A monoamin természetű neurotranszmittereket három kategóriába sorolhatjuk a molekulák kémiai jellege alapján: katekolaminok, indolaminok, valamint imidazolaminok [38, 43].

A katekolaminok a tirozinból származtathatók - a dopamin, a noradrenalin és az adrenalin tartoznak csoportjukba. A katekolaminokkal bővebben a következő fejezetben foglalkozom. Az indolaminok csoportjának egyetlen képviselője a triptofánból származó szerotonin, míg az imidazolaminok közé a hisztidin egyik metabolikus termékét, a hisztamint sorolhatjuk [38, 43]. Az előbbivel kapcsolatos releváns adatokat alább ismertetem, míg az utóbbi a köztiagyhoz tartozó nucleus tuberomamillaris egész agykérget behálózó projekciós rendszerének jellemző neurotranszmittere, és nem kapcsolódik szervesen disszertációmhoz, ezért a továbbiakban részletes tárgyalásától eltekintek [44].

2.2.3.1. Szerotonin tartalmú neuronok rendszere

Szerotoninerg neuronok az agytörzs szinte teljes rosztrokaudális kiterjedésében megtalálhatók. A híd egy vékony szeletét leszámítva az agytörzs mindhárom szintjének

medián-paramedián zónájában, az úgynevezett raphemagokba tömörülve helyezkednek el [45]. E magok nem kizárólag szerotoninerg neuronok csoportosulásai, sőt idegsejtjeik zöme más transzmitterekkel dolgozik [46], de szerotoninerg neuronokat szinte kizárólag itt, a raphemagokban találhatunk a központi idegrendszeren belül [47]. Kilenc ilyen mag különböztethető meg, ezek B1-B9 jelzéssel azonosíthatók. A hídbeli szerotoninerg sejtektől mentes sávtól rosztrálisan levő csoport elemei a szerotoninerg sejtek mintegy 85%-át tartalmazzák, a nucleus raphe dorsalis, illetve a nucleus raphe medianus tartozik ide. A kaudálisan levő magok, melyekben a maradék 15%-nyi szerotoninerg neuront találjuk: a nucleus centralis inferior, a nucleus raphe pontis, a nucleus pallidus, a nucleus raphe magnus és a nucleus raphe obscurus [38, 43, 45].

A raphemagok szerotoninerg efferensei három különböző irányba haladnak. A leszálló rostok a gerincvelőhöz tartanak, annak oldalsó kötegében haladnak, és a substantia grisea hátsó, elülső, oldalsó szarvában, valamint az intermedier szürkeállományban végződnek. A rostok, melyek a kisagyhoz haladnak elsősorban a híd szerotonin tartalmú magvaiból erednek - a pedunculus cerebellaris mediuson keresztül lépnek be a kisagyba, és meglehetősen diffúz módon végződnek a kisagykéregben. A felszálló rostok a köztiagy és a nagyagy felé irányulnak, és főként a nucleus raphe dorsalisból erednek. A mediális előagyi köteghez csatlakozva futnak rosztrális irányba, és diffúzan végződnek a nagyagykéregben, a törzsdúcokban, illetve a limbikus rendszer és a köztiagy különböző területein [38, 43].

2.2.3.2. Noradrenalin és adrenalin tartalmú neuronok rendszere

Neurotranszmitterként noradrenalint vagy adrenalint használó neuronok az agytörzs kaudális szintjeiben, a nyúltvelő és a híd formatio reticularisának laterális zónájában találhatók, magokba, vagy lazább sejtcsoportokba tömörülnek. A noradrenalin esetében A1–A7, az adrenalin esetében C1–C3 betűvel szokás jelölni őket. Az A1–A3, illetve a C1–C3 a nyúltvelőben, az A4–A7 a hídban találhatók. Az A1 és A2 rosztrális területén keverednek a noradrenerg és az adrenerg idegsejtek, tuladjonképp ezen sejtcsoportok rosztrális részeit tekintjük C1-nek, valamint C2-nek. Az A6 jelű mag nem más, mint a LC. [38, 43].

Rágcsálókban és főemlősökben a LC egy kompakt sejtállomány, mely rosztrokaudálisan elnyúlva helyezkedik el a rosztrális híd tegmentumának dorzális felszínén. Kaudál felé a nervus facialis belső térdéig, rosztrál felé a periaqueductalis szürkállományig ér [48]. Legszélesebb kiterjedése magasságában mediálisan a hídi centrális szürkeállomány és a IV. kamra, laterálisan ventráltól dorzál felé a nucleus vestibularis medialis, a nucleus mesencephalicus nervi trigemini, illetve a pedunculus cerebellaris superior határolják. Két fő részre osztható fel: egy dorzális, több kisebb, orsó alakú idegsejtet és egy ventrális, kevesebb nagy multipoláris neuront tartalmazó részre [49]. A morfológiai különbségek ellenére szinte az összes neuron tartalmaz noradrenalint [50]. A sejtek hosszú, egyszer vagy kétszer elágazó dendritjeikkel rendszerint elhagyják a mag területét, és annak közvetlen közelében végződnek [51]. A kaudális LC leginkább dorzolaterális részében egyes szubependimális neuronok dendritjei benyomulnak az ependima sejtek közé, és közvetlen kapcsolatba kerülnek a kamrai liquortérrel [52].

A noradrenalin és adrenalin tartalmú neuronok axonjai, a szerotoninerg rendszer kapcsán leírtakhoz hasonlóan, a magokat elhagyva három projekciós köteget alkotva idegzik be a gerincvelő és az agy jelentős részét. A leszálló köteg rostjai a szerotoninerg rendszerhez hasonlóan ez esetben is a gerincvelőhöz tartanak, szintén a funiculus lateralisban haladnak, a lumbalis szegmentumokig jutnak le, és a hátsó, elülső, illetve oldalsó szarvak mellett az intermedier szürkeállományban végződnek [53]. A kisagyhoz menő axonok legtöbbje a LC dorzális részéből ered, a középső kisagykarban halad, és főként a kisagykéreg stratum granulosum és stratum moleculare rétegeinek sejtjeivel szinaptizálva ér véget [54]. A felszálló rostok a LC magasságában egyesülnek egy köteggé, mely a középagyi centrális szürkeállománytól ventrolaterálisan húzódik felfelé a köztiagyi zona incertán át. A középagyban többek között a nucleus raphe dorsalis vagy a tectum mesencephali számára [55], a köztiagyban a laterális és ventrális talamuszmagok [56], továbbá a corpora geniculata [55], illetve a hipotalamuszon belül legfőképp a nucleus periventricularis és nucleus paraventricularis számára [55, 57, 58] a köteg ventrális részéből leváló rostok biztosítanak noradrenerg afferentációt. A köteg dorzális része a septumon keresztül tovább halad a frontális kéreg beidegzésére, majd hátrahajolva a parietális, az occipitális és a temporális lebenyeket is eléri. Átfutva a retroszpleniális kérgen, a rostok belépnek a szubikulumba, és ellátják a hippokampuszt, gyrus dentatust

is. Igaz, az agytörzsi noradrenerg rostok valamennyi kéregrészt elérik, az afferentáció korántsem homogén: a limbikus területek messzemenőkig a legtöbb rostot kapják [59, 60]. A neokortikális végződések legnagyobb hányada a stratum molecularében van, bár a rostok kétségkívül behálózzák az agykéreg összes rétegét [58, 61], elsősorban piramis-, csillag- és szemcsesejtekkel szinaptizálnak [62, 63]. Érdekes módon ezek a terminálisok sokkal inkább emlékeztetnek a perifériás szimpatikus végződésekre, mint a klasszikus centrális szinapszisokra, melyet jól tükröz, hogy a noradrenalin tartalmú boutonok nagyjából 95%-a nem rendelkezik a hagyományos szinapszisokra jellemző membránspecializációkkal [64], helyette varikózus axonjaikból a tér minden irányába szabadítják fel transzmittereiket, úgynevezett en passant szinapszisokat képezve [43]. Szintén ebből a jellegből fakad, hogy az agykérgi noradrenerg rostok esetében az átlagos forrás-célsejt arány a többezres nagyságrendben keresendő [61].

2.2.3.3. Dopamin tartalmú neuronok rendszere

Dopaminerg idegsejtek az agytörzs három szintje közül csupán egyben fordulnak elő, a mesencephalonban. Ezen sejtek alkotta idegmagok a formatio reticularis laterális zónájában találhatók. Mivel a dopamin is a katekolaminok családjába tartozik, a dopamin tartalmú magokat is, hasonlóan a noradrenalin tartalmú magokhoz, A betűvel jelölik, és az egyes sejtcsoportokat A8–A16 jelöléssel látták el. Ezek közül csupán az A8-A10 jelűek helyezkednek el a mesencephalonban, a többi az agytörzstől rosztrálisan található [38, 43].

Az agytörzsi dopaminerg projekciós neuronok axonjai két kötegbe tömörülve, rosztrális irányban futva hagyják el a középagyat. A nigrostriatális rostok a substantia nigrából indulnak, és a striatumban, a nucleus caudatusban és a nucleus lentiformisban végződnek. A mezolimbikus-mezokortikális rostköteg az A8-A10 mindegyikéből tartalmaz axonokat, melyek a mediális előagyi köteghez csatlakozva érik el a limbikus rendszer és a nagyagykéreg különböző részeit [38, 43].

2.2.3.4. A monoaminerg rendszerek gyakorlati jelentősége

A szerotoninerg, noradrenerg, dopaminerg rendszerek axonjai behálózzák szinte az egész központi idegrendszert, és a legkülönbözőbb területeken szabadítják fel

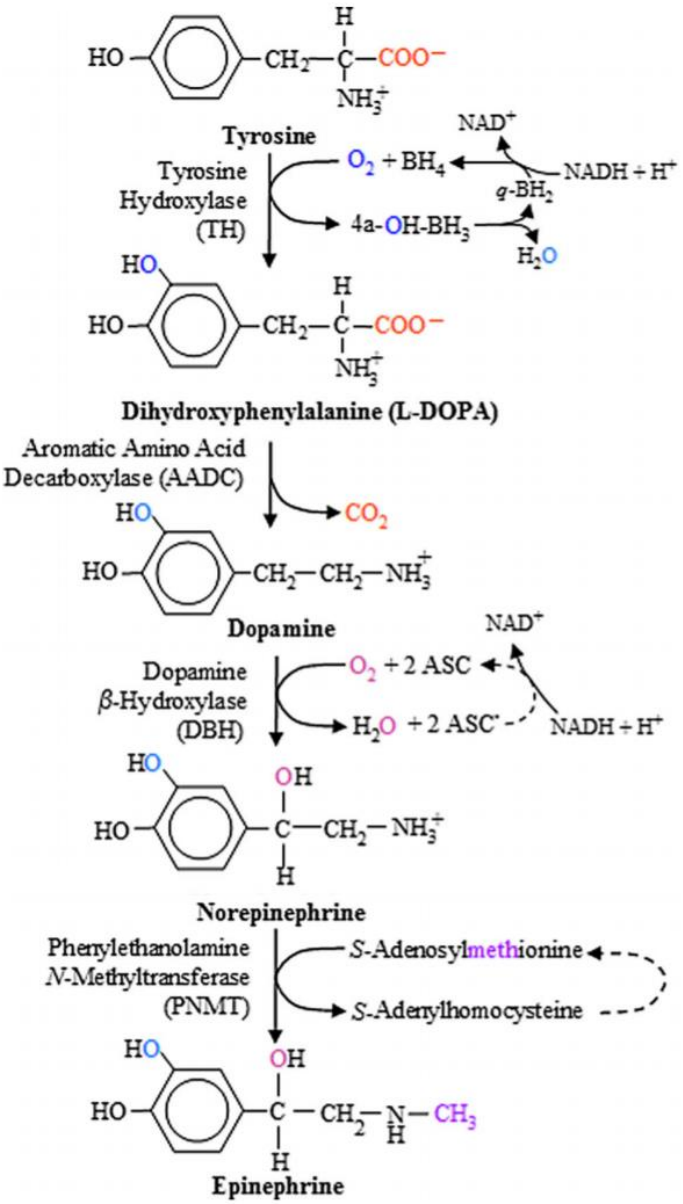
neurotranszmittereiket. Elmondható tehát, hogy a monoaminrendszerek hatással vannak a legtöbb központi idegrendszeri működésre. Szerepet játszanak a szenzoros folyamatokban, többek között a nocicepcióban, illetve az endogén fájdalomcsillapodásban [65, 66], a motoros pályarendszerek és körök szabályozásában [67-70], a gerincvelői, agytörzsi reflexaktivitás kialakításában [71, 72]. A hipotalamuszon keresztül a szervezet hormonháztartását és a zsigeri működéseket befolyásolják [73-76]. A limbikus rendszer aktivitásának modulációja révén erőteljesen hatnak az érzelmekre, a szexuális magatartásra [77-81]. Az agykéreg általános ingerületi állapotának befolyásolása révén szabályozzák az alvást és az ébrenlétet, továbbá a figyelemmel összefüggő folyamatokat [82]. Számos pszichiátriai entitás, pl. depresszió, pánikbetegség, skizofrénia hátterében a monoaminrendszer működési zavarai állnak, így a monoaminok anyagcseréjébe történő célzott beavatkozás a pszichofarmakológia és az elmegyógyászat egyik leghatékonyabb terápiás eszköze [38, 83-90].

2.3. A tirozin-hidroxiláz

2.3.1. A katekolaminok élettani jelentősége és bioszintézise

Katekolaminoknak nevezzük azokat a fenil-alkilamin-származékokat, amelyekben a benzolgyűrű 3. és 4. helyén hidroxilcsoport van. Ide sorolható biogén vegyületek a dopamin, a noradrenalin és az adrenalin, melyek neurotranszmitterként, illetve hormonként is funkcionálnak. Testszerte számos helyen – a központi, a perifériás és az autonóm idegrendszerben egyaránt – megtalálhatók mind az előállításukra és szekréciójukra képes, mind a megkötésükre alkalmas receptorokkal rendelkező és adott biokémiai válaszreakciót kialakító sejtek. Ennek megfelelően szerepköreik is meglehetősen szerteágazók. Számos vegetatív reflexet modulálnak, részt vesznek somatomotoros, vasomotoros és kardiális folyamatok szabályozásában, befolyásolják a magatartást, a tudatos észlelést, a fájdalomérzékelést, különböző stresszorokra adott válaszok kialakítását, az éberséget, az alvást és az ébrenlétet, illetve endokrin funkciókkal is rendelkeznek [91].

A katekolaminok bioszintézise az erre képes neuronokban, illetve a mellékvese velőállományának chromaffin sejtjeiben a következőképp zajlik (1. ábra). A tirozin-hidroxiláz (TH) nevű enzim katalizálja az első és egyben sebesség-meghatározó lépést, melynek során tirozin, tetrahidrobiopterin (BH4) és molekuláris oxigén reakciójában keletkezik L-3,4-dihidroxifenilalanin (L-DOPA) és pterin-4α-karbinolamin. A második lépésben az aromás aminosav-dekarboxiláz enzim közreműködésével L-DOPA-ból szén-dioxid kilépésével dopamin keletkezik. A dopaminerg idegsejtekben a további reakciókat katalizáló enzimek nincsenek jelen, bennük a katekolamin szintézis folyamata ezen a ponton megáll. Noradrenerg és adrenerg sejtekben, a sejtplazmán belüli vezikulákban, egy dopamin-β-hidroxiláz nevű enzim teszi lehetővé noradrenalin és víz képződését dopaminból, molekuláris oxigén felhasználásával, redukált aszkorbinsav jelenlétében. Adrenerg sejtekben még egy további enzim is jelen van, melyet feniletanolamin-N-metiltranszferáznak hívnak, és a végső lépés katalizálásáért felelős. Ennek során S-adenozilmetionin metildonor S-adenozilhomociszteinné alakulása mellett metilálódik a noradrenalin molekukájának nitrogénje, ezzel adrenalint képezve [92, 93].



1. ábra. A katekolaminok bioszintézise (forrás: [94])

2.3.2. A TH szerepe

Ahogy arra fentebb kitértem, a TH a katekolamin-bioszintézis sebesség-meghatározó lépését katalizáló enzim. Magától értetődő tehát, hogy e molekula kiemelt fontossággal rendelkezik, hiszen mennyiségének és aktivitásának finom szabályozása lehetővé teszi a reakcióút végtermékeinek fokozott vagy csökkent képzését, közvetve több vagy kevesebb katekolamin felszabadítását, és végül nagyobb vagy kisebb mértékű posztszinaptikus, pontosabban posztreceptoriális válasz kialakítását. Nem véletlen, hogy az élő

szervezetben oly sok alább részletezett mechanizmus alakult ki épp ennek az enzimnek – és nem a katekolamin-bioszintézis egyéb enzimjeinek – a reguláláára.

A TH kulcsfontosságú szerepét az is alátámasztja, hogy a diszfunkcionális TH-génnel rendelkező transzgenikus egerek többsége még az anyaméhen belül elpusztul, azon kisebbség pedig, amely világra jön, szintén nem él tovább 5 hétnél [95, 96]. Kiemelendő továbbá az is, hogy a mindössze 53 ismert egypontos nukleotid-polimorfizmus közül, melyeket a humán TH génjének exonjaiban írtak le, sok igen szoros kapcsolatban áll különféle súlyos rendellenességekkel, például mozgászavarokkal, pszichiátriai kórképekkel [97-99].

2.3.3. A TH aktivitásának és mennyiségének szabályozása noradrenerg-adrenerg sejtekben

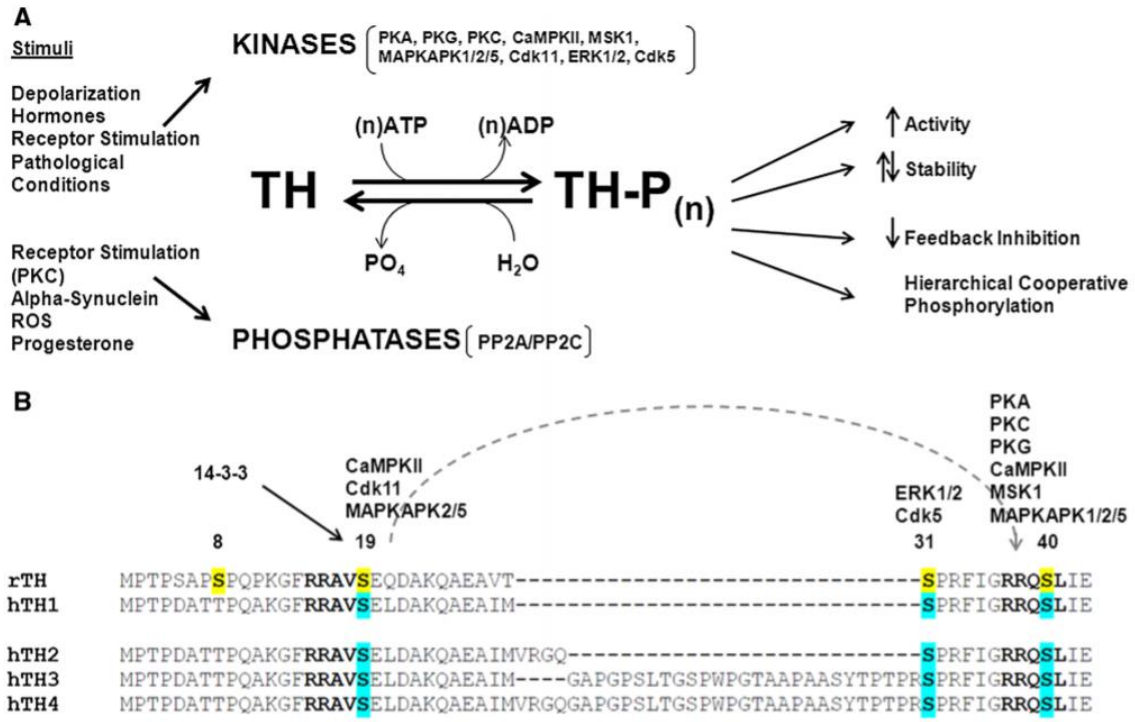
2.3.3.1. A TH aktivitásának szabályozása

A TH enzim aktivitásának fokozódását vagy csökkenését a molekula szerkezetének módosulásai teszik lehetővé. Az alábbiakban a foszforiláció-defoszforiláció mechanizmusai kerülnek bemutatásra, melyek jellemzően rövid távú, gyors változások gyorsabban érvényesülő hatással.

A protein kinázok által végzett foszforiláció, és a protein foszfatázok katalizálta defoszforiláció lehetőséget teremt arra, hogy számos különböző sejtélettani változást előidéző faktor a maga igényeinek megfelelően gyorsan finomhangolja a TH tartalmú sejt katekolamin szintézisét. Ezt akár úgy is megfogalmazhatjuk, hogy a katekolamin szintézis a TH szabályozásának e formája által képes rövid időn belül alkalmazkodni számos sejtszintű vagy szubcelluláris mikro-, és akár egész szervezet szintű makroállapothoz, megteremtve ezzel a lehetőségét annak, hogy saját hatásfokát mindig a maximumhoz közel tartsa.

Az enzimaktivitás foszforiláció-defoszforiláció általi szabályozása, mind a TH esetében, mind általánosságban véve, kétségkívül az egyik legmélyrehatóbban tanulmányozott területe a sejtfolyamatok metabolikus kontrolljának [100-103]. A rendelkezésre álló

irodalom ennek megfelelően igencsak bőséges. A TH enzim négy foszforilációs változások kapcsán kitüntetett szerin aminosavval bír [104], melyeket a következőkben kívánok bemutatni a szabályozásukat végző kinázokkal és foszfatázokkal, illetve a rajtuk bekövetkező foszforiláció enzimaktivitásra gyakorolt hatásának ismertetésével együtt (2. ábra).



2. ábra. A TH foszforilációja (forrás: [94])

In vitro nyolc protein kinázról bizonyították, hogy a 40-es helyen levő szerint képesek foszforilálni. Protein kináz A (PKA) ciklikus adenozin-monofoszfát (cAMP) hatására [104], protein kináz G (PKG) a ciklikus guanozin-monofoszfát (cGMP)-nitrogén-oxid-útvonal aktiválódása következtében [105], protein kináz C (PKC) foszfolipáz C-t (PLC) aktiváló ágensek működésének, illetve forbol-észterek jelenlétének eredményeként [106], mitogén aktiválta protein kináz aktiváló protein kináz 1/2/5 (MAPKAPK1/2/5) valamint mitogén és stressz-aktiválta kináz 1 (MSK1) pedig a sejtszintű stresszválasz kialakításának keretein belül kapcsolnak foszfocsoportot a szóban forgó aminosav oldalláncához [107, 108]. A defoszforilációt az esetek döntő többségében a foszfoprotein foszfatáz 2A (PP2A), ritkábban a foszfoprotein foszfatáz 2C (PP2C) végzi [102, 109]. A 40-es szerin foszforilálása a katalitikus domén konformációváltozásán át fokozza a BH4

kötéséért felelős lókusz affinitását szubsztrátjához, és a maximális enzimsebességet is növeli, tehát egyértelműen és nagymértékben fokozza az enzim aktivitását [107, 108, 110].

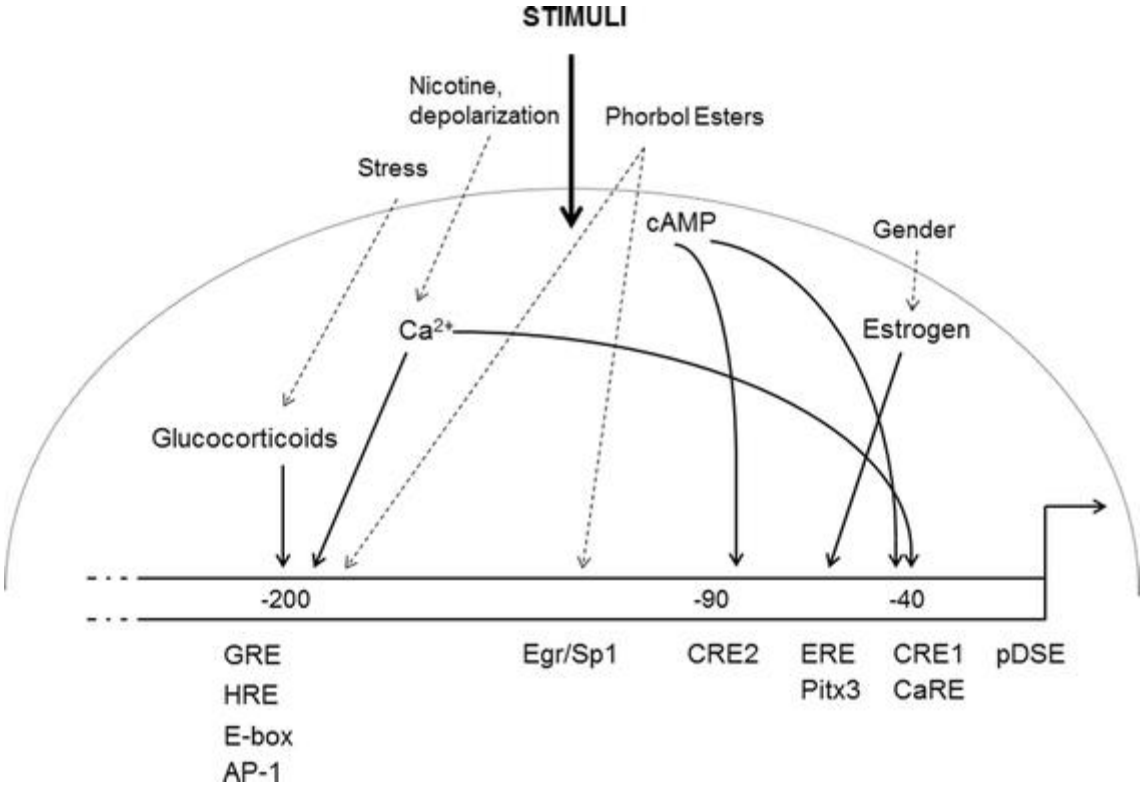
A kalcium-kalmodulin-dependens protein kináz II (CaMPKII) az az enzim, amely legnagyobb valószínűséggel felelős a depolarizáció, és az ezt követő intracelluláris Ca^{2+}-koncentráció emelkedésének hatására bekövetkező, 19-es pozíciójú szerint érintő foszforilációért [102, 111, 112]. A defoszforilációért itt is a PP2A és a PP2C enzimek felelősek [102]. A vad típusú TH 19-es szerinjének foszforilálása önmagában semmilyen körülmények között nem eredményez aktivitásbeli változást, ám sok esetben megelőzi és elősegíti a 40-es szerinen keresztüli szabályozást, ami viszont egyértelműen fokozza az enzim aktivitását [110, 113]. Ezen kívül, ha a 19-es helyen foszforilált enzimhez egy 14-3-3 protein nevű dajkafehérje is kapcsolódik, az aktivitás szintén fokozódik [114-116]. Ennek jelentősége nem teljesen tisztázott, de az, hogy az agyban számos helyen bőséggel expresszálják a TH tartalmú sejtek az említett chaperont, arra utal, hogy a 19-es szerin foszforilálódásának mégis sok esetben fontos szerepe lehet az aktivitás modulálásában [116, 117].

Egy mitogén aktiválta protein kináz (MAPK), név szerint az extracelluláris szignál-regulált kináz 1/2 (Erk1/2) a TH 31. helyén levő szerint foszforilálja, mégpedig sokféle, szerteágazó, egymástól gyakran független stimulus indította jelátviteli (foszforilációs – hiszen az enzim maga is foszforilálva aktív) kaszkád és reakcióút egyik közös végpontjaként. Kimutatták PKC-függő és PKC-független folyamatokban egyaránt, melyek közül utóbbira egy példa a ciliáris neurotrofikus faktor (CNTF) nevű citokin szimpatikus neuronkultúrában megfigyelt enzimstimuláló hatása [118]. A 31-es szerin foszforilálódása sokkal lassabban következik be, mint a fentebb részletezett két szerin helyen történő szabályozás. A defoszforilációt végző foszfatáz jelenleg nem ismert. A foszforiláció hatására, időben ugyan sokkal jobban eltolva, de fokozódik az enzim aktivitása, a 40-es szerinnel kapcsolatban tárgyalt változásokhoz hasonlóan, az enzim BH4-hez való affinitásának módosulása következtében [119-123].

A 8-as pozíciójú szerin foszforilációjának kérdésköre több szempontból is szürke zóna. Először is a TH humán izoformáiban, egyéb alacsonyabb rendű állatfajokéitól eltérően, a 8. helyen szerin helyett treonin található, ám ez önmagában még nem zárná ki, hogy szerepe legyen az aktivitás szabályozásában, mivel a legtöbb szerinen foszforiláló enzim valójában szerin/treonin-kináz [124]. Ezen kívül magam sem zárom ki a bemutatandó szerin helyek listájáról, mivel jelen disszertációm megírását lehetővé tevő kutatómunkámban zömmel én sem emberből származó mintákkal dolgoztam. Másodsorban, a két in vitro körülmények között e helyen foszforilációt előidézni képes enzimről, egy saját névvel el nem látott szerin/treonin kinázról és az Erk1/2-ről, ami ezen a lókuszon 9-szer kisebb mértékű foszforilációt okozott, mint a 31-es szerinen [125], in situ nem sikerült ugyanezen képességüket bizonyítani [126, 127]. Végül a döntő érv, amiért az enzimaktivitás szabályozásának szempontjából szürke zónába tartozónak tartják a 8-as szerint, nem más, mint az, hogy a tudomány jelen állása szerint nincs bizonyosság arra vonatkozóan, hogy bárminemű jelentős regulatorikus funkcióhoz köthető lenne az itt bekövetkező foszforiláció. Valószínű, hogy a 8. helyen levő aminosav foszforilációs állapota az enzim stabilitásának szinte elhanyagolhatóan kismértékű növelésén kívül semmiféle szereppel nem bír a TH aktivitása, és a katekolaminok szintézise tekintetében [127, 128].

2.3.3.2. A TH sejten belüli mennyiségének szabályozása

A hírvivő ribonukleinsav (mRNS) és a fehérje sejten belüli mennyiségének szabályozásáról általánosságban elmondható, hogy hosszabb idő alatt kifejlődő és tartósabb hatású változások, mint a már jelen levő enzimmolekula aktivitásának modulálása. Három mechanizmus sorolható ide. A génről folyó átíródás transzkripciós kontrollja (3. ábra), a mRNS életidejét befolyásoló folyamatok, illetve az enzimmolekulát destabilizáló, proteaszómális degradációját előidéző ubiquitináció.



3. ábra. A TH gén promóter régiójának szabályozása (forrás: [94])

Számos enzimaktivitást növelő tényezőről, állapotról elmondható, hogy tartós jelenlétük, valamint fennállásuk esetén sejtmagbeli változásokat is indukálnak. Ilyen például a sejten belüli Ca^{2+}-szint emelkedés közvetítette CaMPKII általi, vagy a cAMP-szint növekedés mediálta PKA általi promoter-szabályozás. Előbbi a kalcium-reszponzív elem/ ciklikus adenozin-monofoszfát-reszponzív elem 1 (CaRE/CRE1), utóbbi pedig a ciklikus adenozin-monofoszfát-reszponzív elem 1/2 (CRE1/2) lókuszokon foszforilálva indít be transzkripciót fokozó változásokat [122, 129]. Az aktivátor protein-1-kötőhellyel (AP-1) együtt e promoterszakaszok játszák egyébként a fő szerepet a bazális mRNS-átíródás biztosításában, míg az indukált expresszió főként a CRE, kisebb mértékben az AP-1-kötőhely és a hipoxia-reszponzív elem (HRE) közreműködésével történik [130]. A hipoxia hatására bekövetkező változásokról kimutatták, hogy a c-Fos nevű protoonkogén expressziójához kötöttek [131], hasonlóképpen, mint az immobilizációs stresszben emelkedő szintű forbol-észterek indukálta korai növekedési válasz fehérje-1/szteroidogenikus faktor-1 (Egr1/Sp1) promoter-szakasz aktivációja [132, 133]. A felsoroltakon kívül rendkívül sok további faktorról bizonyították már, hogy a TH promoteréhez kötődve elősegítik a génről történő átírást. Nikotinos kezelés CRE-hez

kapcsoltan, a biológiai nem ösztrogén hormonokon keresztül ösztogén reszponzív elemen (ERE) szabályoz [94]. A gén intronjai közül az elsővel kapcsolatban írt le Romano és társai szabályozó funkciókat egérben, ahol megfigyeléseik alapján cisz-regulatorikus elemként működik a génszakasz. Szintén ők vetették fel az epigenetikus szabályozás lehetőségét, mely a H3-as és a H4-es hisztonok acetilációjához kapcsolódó folyamat [134-140].

A promoter aktivitását fokozó folyamatok egy része a mRNS életidejét is növeli. Ezt a molekula 3' végén előidézett változásokkal érik el [141, 142]. A 27 bázispárból álló nem transzlálódó régióhoz hipoxia hatására hipoxia-indukálta fehérje kötődik, ami meggátolja az átirat lebomlását [142, 143]. Nikotin-kezelés hatására név szerint azonosítatlan, de a stresszben megfigyelhető cAMP-szint emelkedés következtében aktiválódó, szintén a 3' véghez kötődni képes és ott ható poli(C)-kötő fehérjétől különböző faktorok stabilizálják a mRNS-t [144, 145].

Az enzimaktivitás rövidtávú fokozásában fontos szerepet játszó négy szerin reziduum közül a 8. és a 19. helyen levők foszforilálódása magasabb, míg a 31-es és a 40-es pozíciójú szerinek foszforilálódása alacsonyabb fokú enzimstabilitást eredményezett, mint amit a foszforilálatlan, vad típusú izoforma esetén megfigyeltek. Ez összhangban áll azzal a kísérletes tapasztalattal, mely szerint a proteaszómális lebomlás felé vezető úton az első állomás, még az ubiquitinációt megelőzendő, az enzim destabilizálódása, amit a 31-es, vagy a 40-es szerinen bekövetkező foszforiláció előz meg [146-148].

Ahogy valamennyi mechanizmus esetén, úgy az ubiquitináció és a lebomlás kapcsán is a jelátviteli kaszkád komponensei és a reakciós partnerek közül nagyon soknak a felfedezése és szerepének pontos leírása még várat magára. Néhány részlet azonban jelenleg is ismert. Shi és Habecker például kimutatta, hogy a TH ubiquitinációja 31-es szerinen foszforiláló Erk1/2-től függő módon fokozódik egyes glikoprotein 130 receptorhoz kötő gyulladásos citokinek – pl. a CNTF és a leukémia inhibitor faktor – hatására. Ez alapján feltételezhető, hogy az Erk1/2-nek fontos szerepe lehet a TH ubiquitinációjában is [149].

2.4. A központi idegrendszeri stresszválasz

2.4.1. A stresszről általánosságban

Az élettani, kórélettani szakkifejezések közül talán a stressz fogalma honosodott meg leginkább a köznyelvben. E szóhasználatban jelentése idegesség, feszültség. Az élettudományokban azonban a fogalomnak sokkal szélesebb értelmezése van. A stressz pontos definícióját először Selye János adta meg 1950-ben [150]. Ő ekkor úgy fogalmazott, a stressz a szervezet nem specifikus reakciója minden olyan ingerre, amely kibillenti eredeti egyensúlyi állapotából, és alkalmazkodásra kényszeríti. Ezeket az ingereket Selye stresszoroknak nevezte. Bár koncepciójának eredetisége épp abban állt, hogy rámutatott a teljesen eltérő természetű ártalmakra bekövetkező válaszok közös vonásaira, ma már tudjuk, hogy a szervezet némiképp különböző stresszreakciókat produkál szinte minden egyes noxára, stresszorra. Ezt a jelenséget a reakciók stresszorfüggésének nevezzük [151-156].

2.4.2. A stresszorok

A stressz kiváltó ingerei többféleképp klasszifikálhatók. A legalapvetőbb felosztás fizikai és pszichés stresszorokat különít el. Míg előbbiekre példa bármilyen metabolikus, kardiovaszkuláris eltérés, traumatikus behatás, extrém hőterhelés, sugárzás, illetve valamennyi fájdalmas inger, utóbbiak csoportjába a hétköznapi értelemben vett stresszforrásokon kívül, mint pl. munkahelyi elvárások, létbizonytalanság, szeparáció, gyász, a kísérletes biológiában is ismeretes fogalmak sorolhatók, csakúgy, mint a nagy nyitott tereket jelentő „open field”, vagy a mozgáskorlátozásnak megfeleltethető „restraint” [155-158].

Más szempontok alapján is kategorizálhatók a stresszorok. Beszélhetünk így, részben átfedve az előbbi felosztással, belső és külső ártalmakról, vagy szétbonthatjuk őket akár befolyásolható és befolyásolhatatlan tényezőkre. Önkényesen megvont határvonal fölé eső stresszorokat nevezhetünk intenzíveknek, míg az az alattiak lehetnek mérsékeltek. Fontos a behatások időbelisége is, e logika mentén akut, (intermedier és) krónikus dimenziókat említhetünk [155, 157]. Amint az érzékelhető, már a stresszorok csoportosításákor is sok esetben megmutatkozik, hogy a stresszelt egyed coping

mechanizmusainak, megküzdési stratégiáinak hatékonysága függvényében egy-egy noxatív tényező besorolása változhat [159].

2.4.3. A stresszválasz

Mivel a stressz nem más, mint egy stresszorra adott reakció, a stresszválasz kifejezés redundáns, azonban elterjedtsége és érzékletessége miatt alkalmazható. Mint azt a bevezetőben említettem, a szervezet válaszreakciói szinte minden különböző stresszorra némiképp eltérőek lehetnek. Bár az alap séma, a Selye által leírt klasszikus hármas, a mellékvesék megnagyobbodása, a csecsemőmirigy sorvadása, valamint a gyomornyálkahártya sérülése ugyan továbbra is helytálló megfigyelésnek bizonyul, legalábbis hosszabb távon [160], ma már tisztában vagyunk vele, hogy a szervezet reakciói ennél sokkal komplexebbek, illetve, hogy más-más jellegű behatásokra adott stresszválaszok között szignifikáns eltérések mutatkozhatnak hormon- és transzmitterszintekben [151], aktiválódó agyi régiókban [154], az egyed viselkedésében, a reakciók időbeliségében [161]. Az is nyilvánvaló továbbá, hogy a stressz egyedi eltéréseket is mutat, hiszen nemhogy függ a vizsgált fajtól, nemtől és életkortól, de az úgynevezett élettani edzettségtől, valamint a stresszhelyzet értékelésétől, egyéni megítélésétől is [162-164].

2.4.3.1. A stressz fázisai, időbelisége

Selye eredeti modellje szerint a stressz, vagy más néven az általános adaptációs szindróma három fázissal rendelkezik. Az iniciáló esemény a stresszor jelentkezése, melynek hatása a homeosztatikus egyensúly rövid ideig tartó kibillenése. Az ezt követő második szakaszban, az aktív ellenállás fázisában különböző kompenzatorikus mechanizmusok dolgoznak a kezdeti állapot visszaállítása érdekében. Végül, ha a kompenzáció elégtelen, vagy a stresszort nem sikerül eliminálni, és a stressz tartósan fennáll, a kapacitások kimerülnek, és a homeosztázis menthetetlenül felborul [160]. Más módon is megközelíthető azonban az időbeliség kérdése. A modern stresszkutatásban leggyakrabban akut vagy krónikus stresszről beszélünk, az alapján, hogy a stresszor egyszer, rövid ideig, esetleg többször, de egymástól időben kellően szeparáltan vagy tartósan, folyamatosan, hosszú időn át hatott-e a vizsgált egyedre.

2.4.3.2. A stressz során aktiválódó legfontosabb idegrendszeri elemek

A stressz során bizonyos biológiai működések azonnali megváltoztatására, és jövőbeli mintázatok módosítására van szükség, mely a központi idegrendszer számos, szerteágazó, például hormonális vagy autonóm szabályozási, döntéshozatali, tanulási és memória-, illetve emocionális funkciókért felelős szintjének modulációján keresztül érhető el.

A stresszválasz kialakulásának elemi feltétele a stresszor detektálása. Ez a megfelelő inger érzékelését, a jel ingerületté alakítását, és szenzoros pályarendszerek révén történő továbbítását jelenti. Az információ feldolgozása, kiértékelése már mindenképp a központi idegrendszeren belül történik. Amennyiben egy szituáció fenyegetésként interpretálódik, számos agyi régió bevonódásával számolhatunk [165].

Fizikai stressz során a centrális jelfeldolgozást főként az agytörzs és a hipotalamusz végzi [153, 154, 165-167]. Jól ismert tény, hogy a nucleus tractus solitarii (NTS) egy igen fontos szereplője a vegetatív reflexeknek (baroreflex, kemoreceptor reguláció) [168, 169], nem meglepő tehát, hogy a fizikai stresszorjelek feldolgozásában, a válaszreakciók kidolgozásában is kiemelt szereppel bír. Ha stresszről van szó, hasonlóképp megkerülhetetlen a LC. Noradrenerg rostjaival behálózza az egész neuraxist, az előagy egyedüli noradrenalinforrásaként szolgál, ezáltal befolyásolva olyan agyi funckiókat és viselkedéseket, mint az alvás-ébrenlét, vigilitás, figyelem, rövid- és hosszútávú memória, stresszválasz [170, 171]. Stressz során sejtjei jól megfigyelhető módon váltanak fázikus tüzelési mintázatról tónikusra, mely a nyugalmi állapotra optimalizált, koncentrált figyelmet lehetővé tevő működés helyett egy környezetet monitorozó, éberséget, arousalt fokozó munkamód [82]. Efferens rostjaival közvetlenül vetül a thoracolumbalis gerincvelő intermediolaterális magoszlopára is [172], csakúgy, mint a rosztrális ventrolaterális medulla neuronjai [173]. Ez az előbbi target már egyértelműen a kimenetet reprezentálja, annak legalábbis egy részét, a vegetatív idegrendszer szimpatikus tagozatát. Az emellett, ezzel összhangban működő paraszimpatikus idegrendszer egy másik kimenete lehet bizonyos stresszválaszoknak, legfontosabb agytörzsbeli központja a nucleus dorsalis nervi vagi [174].

A hipotalamuszon belül a nucleus paraventricularis érdemel mindenképp külön említést, tekintve, hogy ez a mag a stresszválasz perifériára történő kivitelében nélkülözhetetlen hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg tengely szabályozói közül a stressz szignálok legfőbb integrátora. Számos szomatikus és viszcerális, neurális és humorális afferens mellett limbikus és jutalmazási központok felől kap információt, melynek függvényében kortikotropinfelszabadító hormon (CRH) és vazopresszin hipofizeális portális keringésbe történő kiválasztásán keresztül a hipofízis elülső lebenyében termelt adrenokortikotrop hormon (ACTH) rapid felszabadulását idézi elő, mely végül a mellékvesekéreg glükokortikoid szekrécióját fokozza [175]. Emellett a nucleus paraventricularis egyéb, CRH-t neurotranszmitterként használó amigdala, nucleus interstitialis striae terminalis (BNST), nucleus paragigantocellularis, nucleus prepositus hypoglossi eredetű rostokkal együtt noradrenerg LC idegsejtekkel szinaptizálva aktiválja e magot, mely a fentebb említett fázikus-tónikus váltást, és a kiterjedt noradrenerg rosthálózat révén a szimpatoadrenomedulláris rendszer aktivációjától kezdve végső soron a kérgi adaptációs válasz előfeltételeinek megteremtését is jelenti [171, 176].

Pszichés, emocionális, kognitív stressz esetén magasabb rendű, jellemzően előagyi régiók aktiválódása is megfigyelhető. Bár működése igen komplex, különböző részeinek akár merőben eltérő szerepei lehetnek a stresszválasz bizonyos részfolyamatainak koordinálásában [177, 178], más kulcsfontosságú stresszközpontokkal olykor nincs direkt összeköttetése [179, 180], mégis a prefrontális kéreg messzemenőkig az egyik legjelentősebb ilyen terület. A ventrális tegmentális area felől érkező gazdag dopaminerg afferentációja egyedülálló a neocortexen belül. Egyes averzív stimulusok e rostozatot gyors tüzelésre késztetve érik el a kérgi neuroadaptációs választ, mely a későbbiekben hasonló stresszorokra már intenzívebb reakciót tud eredményezni [181]. A LC felől érkező noradrenerg rostok szerepe a stressz kapcsán a figyelmi folyamatok átkalibrálásában, a fókuszált figyelem kiterjesztésében, valamint az új emléknyomok konszolidációjában, a tanulásban rejlik [176].

A negatív tapasztalatok kapcsán szerzett emléknyomok konszolidációjában, és így a tanulási folyamatban, valamint a későbbiekre vonatkozóan az adekvát elkerülő magatartás vagy megküzdési stratégia kialakításában két prefrontális kéreggel szorosan

együttműködő központról tennék még említést: az amigdaláról, illetve a hippokampuszról. Előbbi mag bazolaterális része érzelmileg megterhelő eseményeket követően fokozott spontán tüzelési hajlamot mutat, mely arra enged következtetni, hogy az ilyen helyzetekben akvirált tapasztalatok hosszú távú memóriában történő rögzítését facilitálja [182, 183]. A bazolaterális amigdala egyik fő kimenete a centrális és a mediális amigdala, melyek ugyan közvetve maguk is vetülnek a nucleus paraventricularisra [179, 184], ám újabb, optogenetikus vizsgálatok alapján sokkal fontosabbnak tűnik az ezzel ellentétes irányú direkt projekció, mely a hosszú távú, félelmi emlékek előhívásában visz fontos szerepet [185]. A centrális és a mediális magok periaqueductalis szürkeállományba futó rostjai szintén meghatározónak bizonyultak egyes félelem kondicionálásos kísérletekben [186].

A hippokampusz CA1 mezőbeli, illetve az ezzel határos subiculum piramissejtjeiből érkező rostok excitatorikus szinapszisokkal végződnek a prefrontális kéregben és az amigdalában. Ezutóbbi egyébként bidirekcionális kapcsolatot tart fenn a hippokampusszal, mely együttműködésbe a prefrontális kéreg is beleszól [187-189]. Ezen összeköttetéseknek meghatározó szerepe lehet a rövidtávú memóriában, sőt en bloc a kognícióban, valamint az emocionális regulációban [190]. A hippokampusz a stresszválasz kialakításába egyéb módokon is beleszól, közvetlen befolyással van például a legfőbb jutalmazási központra, a nucleus accumbensre, a BNST-re és hipotalamikus magokra [191-193]. Érdekes módon a nucleus paraventricularist, melyre gátló hatást fejt ki, a hiptoalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg tengelynek mintegy negatív feedback szabályozását megvalósítva, multiszinaptikus úton éri el [194-196].

2.4.3.3. A stressz mediátorai

A stresszor típusa, kontextusa, időtartama, az alanytól függő tényezők, mint például genetikai háttere, kora, neme, élettani edzettsége, illetve pusztán az a tény, hogy a stresszválasz a szervezeten belül rengeteg, egymással szoros kapcsolatot fenntartó központ együttműködése révén jön létre egy meglehetősen komplex, több változós függvényrendszerként teszi leírhatóvá a stresszfolyamatokat [156, 157, 197, 198]. Érzékletes metaforával élve ez a stresszmátrix egy nagyon sok serpenyőjű piaci mérlegként képzelhető el, melynek középállásból kibillenő nyelve a homeosztatikus

egyensúly megbomlását, a kompenzációk hatására a nyelv középállásba való visszatérése pedig az allosztázist szimbolizálja. E rendszerben minden egyedi stressz szituációra hatékony válasz kell, hogy szülessen, így szinte magától értetődő, hogy a gépezet finomhangolásához hírvivő molekulák egész repertoárjára van szükség. Az alábbiakban e molekulák, más néven a stressz mediátorok három legfontosabb csoportjának, monoamin neurotranszmitterek, peptidek és szteroid hormonok csoportjainak képviselőiről, stresszben játszott szerepéről írok bővebben.

A monoaminok stressz indukálta felszabadulása rendkívül gyors, általában már másodpercekkel a stresszor detektálását követően megtörténik. Hatásukat G protein kapcsolt receptoraikon hasonlóan gyorsan fejtik ki, természetesen csak azon sejtekben, amelyek felszínükön kifejezik a megfelelő receptorokat. Stresszt követően rengeteg agyi régióban mérhetők emelkedett monoaminszintek, mint például a hippokampuszban, az amigdalában, a prefrontális kéregben és a nucleus accumbensben [153]. Egy-egy transzmitter hatásának erőssége és pontos jellege azonban a felszabadulás helyén kívül más tényezőktől is függ, ahogy az imént is utaltam rá, posztszinaptikus szinten is kódolt: a receptorok jelenléte, eloszlása és affinitása is mérvadó. Megfigyelhető, hogy az egyes monoaminok rájuk jellemző viselkedési mintázatokat, működéseket kölcsönöznek a korai stresszválasz során az egyednek. Míg a noradrenerg tónus emelkedése a fókuszált figyelem egész környezetre való kiterjesztésével jár [82], a dopamin a kockázatbecslésben, valamint a döntési stratégiák hatékonyabb kidolgozásában segít [199], a szerotonin pedig a döntéshelyzettel járó szorongás oldásában bír meghatározó szereppel [200].

A klasszikus stressz neuropeptidek a hipotalamusz nucleus paraventricularisának kissejtes részén termelődő CRH, valamint a nucleus paraventricularis nagysejtes részén és a nucleus supraopticusban termelődő vazopresszin. Előbbi amellett, hogy hormonként a hipofízis mellékvesekéregre ható ACTH termelő sejtjeit szabályozza, neurotranszmitterként is jelen van olyan agyi stresszközpontokban, mint a centrális amigdala vagy a LC [171, 201, 202]. Helyi neuromodulációs hatása másodpercek, percek alatt jelentkezik, köszönhetően a G protein kapcsolt receptorainak és a posztreceptoriális jelátvitelnek. Más CRH receptorokon hatni képes neuropeptidek is ismeretesek, például

az urokortinok, melyek az agytörzsi Edinger-Westphal magból felszabadulva az akut stresszválasz során CRH-hoz hasonló funkciókkal bírnak [203]. A vazopresszin legismertebb, antidiuretikus hatását a vese gyűjtőcsatornáiban fejti ki V2 receptorokon, azonban stresszhormonként sem elhanyagolható szerepe, ugyanis a hipotalamo-hipofizeális rendszeren belül V1b receptorokon hatva a CRH szinergistájaként dolgozik az ACTH felszabadításában [204].

Az agyi stressz szempontjából releváns szteroidok a mellékvesekéregben pulzatilis módon szintetizált, nyugalomban cirkadián ingadozást, stressz során meredeken emelkedő plazmakoncentrációt mutató kortikoszteroidok [205]. Rágcsálókban legpotensebb képviselőjük a kortikoszteron, emberben a kortizol. Átjutásukat a vér-agy gáton többek között bizonyos p-glikoproteinek szabályozzák [206]. Bár a kiterjedt agyi kapillárishálózat azt sugallja, hogy e vegyületek az összes idegsejtet és gliaelemet elérik, valójában az ő esetükben is receptoraik eloszlása a döntő. A klasszikus kortikoszteroid receptorok intracelluláris molekulák, melyek ligandkötés hatására a sejtmagba transzlokálodnak, és különböző gének transzkipciójára fejtik ki lassabb, de tartósabb, órák, napok alatt érvényesülő hatásaikat. Ugyan léteznek sejtfelszíni membrán receptorok is, ám róluk még keveset tudunk, így tárgyalásuktól jelen disszertációban eltekintek. A hagyományos intracelluláris receptorok két fő típusa a mineralokortikoid receptorok, melyek ligand iránti affinitása magas, így még alacsony kortikoszteroidszintek mellett is többé-kevésbé telítettek, illetve a glükokortikoid receptorok, melyek affinitása közel egy nagyságrenddel alacsonyabb, mint az előbbieké, így alaphelyzetben csak részben telítettek, ezért a stressz kapcsán a megemelkedő szteroidszintekre ők azok, akik további hormonkötéssel reagálni tudnak [166].

2.5. A liquor mediálta volumen transzmisszió

2.5.1. A liquorkeringés

Az agykamrákat és a subarachnoidealis teret kitöltő liquor cerebrospinalis főként az oldalkamrák plexus choroideusai révén képződik. A foramina interventricularén keresztül bejut a harmadik, majd onnan az aqueductus cerebrin át a IV. agykamrába. Innen a Magendi-, illetve a Luschka-féle nyílásokon a külső liquorterekbe kerül, szétterül az agy külső felszínein, körbeveszi a gerincvelőt. Legnagyobb mennyiségben a dura mater sinusaiba szívódik vissza a granulationes arachnoidealesen keresztül, egy részét azonban az agyi parenchymán belüli glimfatikus keringés veszi fel, a Virchow-Robin-rések mentén. Legkisebb hányada az agyidegeket és a gerincvelői idegeket körülvevő perineuralis agyhártyahüvelyek segítségével a nyirokerekbe kerül [207].

Emberben 24 óra alatt átlagosan 600 ml liquor képződik, amely 150 ml-es összliquortérrel számolva napi 4-szeri kicserélődést feltételez [207]. Rágcsálókban ezek a térfogatok jóval kisebbek, egy felnőtt patkányban például mindössze 275 µl, egérben pedig még ennél is kevesebb, 40 µl cerebrospinális folyadékkal számolhatunk [208, 209].

2.5.2. Volumen transzmisszió a központi idegrendszerben

A szinaptikus transzmisszió a leggyakrabban és legrészletesebben tárgyalt intercelluláris jelátvitel a központi idegrendszerben. Jelentősége nem is vitatható, mivel a magasabb rendű állatokban, így az emberben is a legáltalánosabb interneuronális kapcsolatnak mondható, mely egy pontos, gyors, megbízható sejtközti kommunikációt képes biztosítani a bonyolult hálózatok elemei között. Fontos azonban látni, hogy az interneuronális kapcsolatoknak léteznek egyéb fajtái is, melyeket szemügyre véve az is kitűnik, hogy bár a szinaptikus transzmisszió a legnépszerűbb megoldás, kialakítása és fenntartása rendkívül energiaigényes folyamat a többi, jellemzően ősibb jelátviteli típushoz képest [210, 211]. Az alábbiakban ez utóbbiakról kívánok egy rövid áttekintést nyújtani.

A volumen transzmisszió a molekuláris szignáloknak, ionoknak az agyi extracelluláris tér minden irányába történő diffundálásaként foglalható össze. Ez nagyon gyakran

tényleges egyszerű diffúziót jelent, melynek során persze figyelembe kell venni, hogy a celluláris komponensek milyen alakú teret hagynak szabadon maguk között, olykor viszont a neuronok transzmittereiket célzottan idegrostkötegek vagy erek közelébe ürítik, hogy kommunikációs csatornákként használják az ezek mentén jelen levő preformált réseket a target sejtek eléréséhez [212]. Egy harmadik leleményes megoldás, ami még mindig extracelluláris tér mediálta transzportnak számít, a liquorba történő transzmitter-felszabadítás. A cerebrospinalis folyadék rendelkezik egy fix áramlási iránnyal, így ezt a közeget, mint vektort, bizonyos kamrafalhoz közeli sejtek, például ependima sejtek, fel tudják használni, és kis energiaráfordítással távolabbi helyekre el tudják juttatni üzeneteiket. Ezt a jelenséget, amikor a transzmittert felszabadító sejt és a célsejten levő receptor között ilyen nagy, milliméterekben vagy akár centiméterekben mérhető a távolság, transzmitter-receptor mismatch néven tartja számon az irodalom. Karakterisztikus elemei a volumen transzmissziónak többek között a lipidoldékony vagy gáznemű hírvivő molekulák, a szinaptikus specializációkat nélkülöző axonvarikozitások, illetve a vezikuláris fúzió helyett a kevéssé szabályozott reuptake transzportereken keresztüli, fordított irányba történő transzmitterleadás [213]. A fentiek alapján máris körvonalazódik, hogy a volumen transzmisszió egy meglehetősen esetleges és a szinaptikusnál sokkal lassabb jelátvitel, melyet alacsony célsejt-aktivációs valószínűség is jellemez. Térben ugyan kiterjedtebb, globálisabb az információáramlás, a forrás-célsejt arány jóval magasabb, mint 1:1, azonban mindez pontatlansággal, bizonytalansággal jár. Ezt igyekszik kompenzálni az, hogy a távoli, elszórt receptorok magas affinitással bírnak, illetve az, hogy mivel nincs egy gondosan felépített kapcsolóstruktúra, a jelátvitel nagyon alacsony energiaráfordítással végezhető [210, 211, 214-216].

3. Célkitűzések

1. A secretagogin fehérje agytörzsi előfordulásának vizsgálata rágcsálókból, majd emberből származó sorozatmetszeteken immunohisztokémiai módszerek segítségével. Az eloszlási mintázat egyéb kalciumkötő fehérjékkel, ismert funkcionális rendszerekkel való átfedésének megállapítása.

2. A secretagogin és a TH 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.

3. A CNTF szerepének tisztázása: felszabadulási helyének, transzmissziójának, tirozin-hidroxilázra gyakorolt hatásának, a központi idegrendszeri stresszválaszban betöltött funkciójának felderítése.

4. A secretagogin jelenlétének és a TH foszforilációjának vizsgálata a LC eredetű noradrenerg rostok nagyagykérgi célterületeiben, különös tekintettel az akut stresszben kulcsfontosságú mediális prefrontális kéregre (mPFC).

4. Anyag és módszer

4.1. Állatok

A kísérleteim során összesen ötvenkét 12 hetes, tizenegy 6 hetes, hat 5 napos hím patkányt (Wistar), négy 12 hetes nőstény patkány (Wistar) 18 napos embrióit, valamint hatvanöt 12 hetes egeret (C57BL/6) használtam fel. Standard állatházi körülményekkel dolgoztunk, 12 óra megvilágítást minden nap 12 óra sötétség követett, táplálékot és vizet ad libitum biztosítottunk az állatok számára. A kísérleteket a kísérleti és egyéb tudományos célokra felhasznált gerinces állatok védelméről szóló Európai Egyezménnyel (Protocols: ETS No. 170, ETS No.123) összhangban, a XIV-I-001/2269-4/2012 ügyiratszámú állatkísérleti engedély birtokában végeztem. Az állatokat a műtétekhez és a perfúzióhoz testtömeg kg-onként 50 mg ketamin, és testtömeg kg-onként 4 mg xilazin elegyével altattam. Az anesztetikumokat intramuszkulárisan vagy intraperitoneálisan juttattam be. Az állatok agyait perfúziós formalin fixálást követően vagy fixálás nélkül, azonnal szárazjégen fagyasztva távolítottam el. Egyes kísérleteimhez Palkovits-féle punch technikát [217] alkalmazva izoláltam 300 µm vastag agyszeletekből a vizsgálandó részeket.

4.2. Humán minták

A humán mintákon végzett immunohisztokémiai vizsgálataimat két olyan agyvelőből származó metszeten végeztem, melyek perfúziója a két arteria vertebralis és a két arteria carotis interna kanülálásával, 4%-os formalinnal történt (TUKEB 84/2014). Fehérje analíziseimhez LC punch mintákat használtam, melyeket Palkovits Miklós professzor úr Humán Agybankja nyújtott laborunk rendelkezésére (1. táblázat).

4.3. LC szeletkultúra

Az ex vivo kísérletemhez hat 5 napos patkány agyából készítettem 300 µm vastag koronális metszeteket 4 °C-os, 100 egység/ml penicillint (Invitrogen) és 100 µg/ml streptomycint (Invitrogen) tartalmazó Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) tápfolyadékban. A LC szintjében készült agyszeleteket 6 lyukú tápfolyadéktartókba, 0,4 µm pórusméretű, CM filterrel ellátott metszettartóra (Millipore) helyeztem. Az első 2 órában 2 mM L-glutaminnal, valamint 10%-os magzati borjúszérummal dúsított

Neurobasal Mediummal, további 24 órán át pedig 2 mM L-glutaminnal és 2% B27-tel kiegészített Neurobasal Mediummal biztosítottam az explantok túlélését. Egy nap után 2,5 µl utóbbival azonos médiumban feloldott 100 nanogramm rekombináns CNTF-et (Sigma) fecskendeztem közvetlenül az agyszeletekre. 20 perc elteltével a szöveteket begyűjtöttem, mostam, TNE lízis pufferben homogenizáltam, és Western blotra továbbítottam.

4.4. In vivo géncsendesítés

Az in vivo végzett secretagogin géncsendesítés hatásainak vizsgálatához 6 patkányon végeztem beavatkozást. A mély altatásba helyezett állatokat sztereotaktikus készülékbe fogtam, a fejbőrt és a bőr alatti lágy szöveteket egy metszéssel megnyitottam. A Bregmától 9,6 mm-rel kaudálisan, 1 mm-rel laterálisan 1 mm átmérőjű lyukat fúrtam, majd a nyíláson át az agyfelszíntől számított 5 mm-es mélységben a IV. agykamrába egy Hamilton fecskendőből 10 percig tartó folyamatos injektálással 4 µl térfogatban összesen 1 nmol secretagogin vagy random szekvenciájú (scramble) rövid interferáló RNS-t (GE Dharmacon) juttattam be. 72 órás túlélést követően az állatokat ismét altattam, majd transzkardiálisan perfundáltam őket, és agyaikat feldolgoztam.

Az in vivo CNTF géncsendesítéshez további 16 patkányt használtam fel. A mély altatott állatokat sztereotaktikus készülékbe fogtam, a fejbőrt és a bőr alatti lágy szöveteket egy metszéssel megnyitottam. A Bregmától 0,84 mm-rel kaudálisan, 1,2 mm-rel laterálisan 1 mm átmérőjű lyukat fúrtam, majd a nyíláson át az agyfelszíntől számított 4,5 mm-es mélységben a foramen interventriculare területére egy Hamilton fecskendőből 10 percig tartó folyamatos injektálással 4 µl térfogatban összesen 1 nmol CNTF vagy random szekvenciájú (scramble) rövid interferáló RNS (GE Dharmacon) oldatát juttattam be. 96 órás túlélést követően a kontroll és a kezelt csoportok felének 4%-os formalint adagoltam hátsó végtagjába, majd 60 perc elteltével az állatokat ismét altattam, transzkardiálisan perfundáltam őket, és agyaikat feldolgoztam.

4.5. Kolhicin kezelés

Bizonyos kettős jelölést alkalmazó immunohisztokémiai kísérleteim előtt 3 patkányon intraventrikuláris kolhicin kezelést végeztem. A mély altatásba helyezett állat fejének

rögzítését, fejbőrének és lágy szöveteinek megnyitását követően 1 mm átmérőjű lyukat fúrtam a koponya megfelelő pontján, a Bregmától 0,5 mm-rel kaudálisan, 1,6 mm-rel laterálisan. A nyíláson át az agyfelszíntől számított 3,5 mm-es mélységben, az oldalkamrába 10 percig tartó folyamatos injektálással, egy Hamilton fecskendőből 100 µg kolhicint juttattam be, 6 µl fiziológiás sóoldatban feloldva. 48 órás túlélés után az állatokat ismét altattam, majd transzkardiálisan perfundáltam őket, és agyaikat feldolgoztam.

4.6. Formalin stressz

Stressz kísérleteim során patkányok vagy egerek jobb oldali hátsó végtagjának izomzatába 50 µl 4%-os formalint adagoltam. Az injekciót követően az állatokat visszahelyeztem ketreceikbe, majd a patkányokat 20 vagy 120 perc elteltével, az egereket 20 perc elteltével dekapitáltam, hogy agyaikat eltávolítsam, majd -70 fokon fagyasszam. A kontrollcsoportként szolgáló állatok egészen a dekapitációig ketreceikben tartózkodtak.

4.7. Anterográd pályakövetés

A LC-ból kiinduló idegpályák mPFC-beli és limbikus kérgi végződéseinek vizsgálatához 4 patkányon anterográd jelölést alkalmaztam. A mély altatásba juttatott állat fejét rögzítettem, a fejbőrön és a lágy szöveteken metszést ejtettem, végül a koponya megfelelő pontján, a Bregmától 9,7 mm-rel kaudálisan, 1,3 mm-rel laterálisan 1 mm átmérőjű lyukat fúrtam. A nyíláson át az agyfelszíntől számított 5,5 mm-es mélységben, a LC területére Hamilton fecskendőből 10 percig tartó folyamatos injektálással 0,2 µl biotinilált dextrán amint (BDA, 10%, 10 kDa, Molecular Probes) juttattam be. 7 nap túlélést követően az állatokat ismét altattam, majd transzkardiálisan perfundáltam őket, és agyaikat feldolgoztam.

4.8. Retrográd pályakövetés

A mPFC-re vetülő, valamint a felszínükön CNTF receptorral rendelkező LC-beli neuronhalmazok átfedésének vizsgálatához 4 patkányon retrográd pályajelölést végeztem. A mély altatásba juttatott állat fejét rögzítettem, a fejbőrön és a lágy szöveteken metszést ejtettem, végül a koponya megfelelő pontján, a Bregmától 3,5 mm-rel

rosztrálisan, 0,6 mm-rel laterálisan 1 mm átmérőjű lyukat fúrtam. A nyíláson át az agyfelszíntől számított 3,5 mm-es mélységben, a mPFC területére Hamilton fecskendőből 10 percig tartó folyamatos injektálással 0,2 µl biotinilált dextrán amint (BDA, 10%, 3 kDa, Molecular Probes) juttattam be. 7 nap túlélést követően az állatokat ismét altattam, majd transzkardiálisan perfundáltam őket, és agyaikat feldolgoztam.

4.9. CNTF beadás intracerebroventrikuláris kanülön keresztül

Tizennégy 12 hetes hím patkánynak, valamint negyven 12 hetes, CNTF, illetve secretagogin génkiütött vagy vad típusú egérnek helyeztem mély altatásos műtét során tartós kanült (PlasticsOne) az oldalkamrájába, melyet cink-foszfát alapú fogászati cement (PD C&B) és pillanatragasztó (Loctite) elegyével fixáltam a koponyatetőhöz. A fúrási koordináták a koponyatetőn a következők voltak: patkányok esetében Bregma +0,9 mm rosztrálisan, középvonal +1,4 mm laterálisan, egerek esetében Bregma +0,2 mm rosztrálisan, középvonal +1 mm laterálisan. A kemény agyhártyát egy 18G-s tű hegyével nyitottam meg. A tartós kanül egy kamra folyadékterébe érő, külső végén műanyag menettel ellátott fémhüvelyből és egy ebbe pontosan illeszkedő, a menetre külső műanyag kupakjával rácsavarva rögzíthető fém csapból állt. A fémhüvely külső és belső átmérői, továbbá a fémhüvely és a csap hossza patkányok esetében 0,71 mm, 0,39 mm és 4 mm, míg egerek esetében 0,71 mm, 0,39 mm és 3 mm voltak. A kanül beépítése után 7 napos túlélést követően az állatok egy fél perces dietil-éteres (Merck Millipore) bódításban részesültek, mely lehetővé tette a kupakkal ellátott csapelem eltávolítását, és egy fémhüvelybe pontosan illeszkedő, annál fél mm-rel hosszabban a kamra folyadékterébe nyúló, Hamilton fecskendő végére erősített műanyag mikrodialíziscső toldalékául szolgáló belső kanül bevezetését. Ezen a belső kanülön keresztül került beadásra az állatok felének általam készített arteficiális cerebrospinalis folyadékból (aCSF), a másik felüknek aCSF-ben feloldott rekombináns CNTF-ből (Sigma) patkányok esetében 4-4, egerek esetében 3-3 µl. 60 perccel a beadás után az állatokon nyílt aréna (open field) tesztet végeztünk, melyet dekapitáció követett. A frissen kioperált agyakat rosztrokaudálisan feleztem, -70 fokon fagyasztottam, majd a kaudális agyrészek megfelelő régióin Western blot fehérje analízist végeztem, a rosztrális agyrészeket pedig katekolamin analízis céljából gyűjtöttem össze (utóbbiakban nagy teljesítményű folyadékkromatográfiás (HPLC) méréseket kollaborációs partnerünk végzett).

4.10. Liquor mintavételezés

Enzimkapcsolt immunoszorbens vizsgálataimhoz (ELISA) négy 12 hetes formalin stresszelt hím patkány és négy kontroll társuk IV. agykamrájából vettem liquormintát. A mély altatott állatok fejét sztereotaxiás állványban rögzítettem, a nyak maximális anteflexiója mellett, mely az állat orrának harapórúd alá buktatása révén volt precízen kivitelezhető. A bőrmetszést, illetve a tarkórégió izmainak szeparálását követően a membrana atlantooccipitalison és vele együtt a külső agyburkokon egy hajlított hegyű 26G-s tű segítségével bemetszést ejtettem. A kisagy kaudális felszíne alatt egy 20 µl-es pipettahegyet vezettem a IV. kamrába és 2 perc alatt folyamatos lassú szívás mellett 15 µl liquort nyertem ki.

4.11. Perfúzió, fixálás

Az állatokat háton fekvő pozícióban rögzítettem, a test középvonalában hosszanti bőrmetszést ejtettem, majd a hasfal átvágásával megnyitottam a hasüreget. A szegycsontot kardnyúlványánál fogva felemeltem, ezután kraniál felé divergáló vonalakban átvágtam a rekeszizmot illetve a bordákat. A mellkas mellső falán ablakot nyitottam, a szívburkot a szívről leválasztottam, s a bal kamra csúcsán ollóval nyílást készítettem, melyen keresztül a felszálló aortáig vezettem be a perfúziós szerelék végét. A transzkardiális perfúziót 50 ml fiziológiás sóoldattal, majd patkányonként 300, egerenként 150 ml 4%-os formalinnal végeztem, melyet a műtőasztal szintje feletti 1 m-es magasságból bocsátottam a véredényrendszerbe. A vér és a formalin szabad távozását a jobb pitvar fülcséjének megnyitásával biztosítottam.

4.12. Metszés

A metszésre kerülő agymintákból 50 vagy 300 µm vastagságú metszeteket készítettem, előbbieket immunohisztokémiai kísérleteimhez, utóbbiakat fehérje, valamint RNS analízis céljából. Az immunohisztokémiai kísérletekre szánt metszeteket 1 éjszakán át, az agyvelő lemerüléséig 30%-os cukoroldatba téve, hűtőszekrényben tartottam krioprotekció végett. A proteázok és ribonukleázok hatását gátolandó, a fehérje és nukleinsav analízisre eltávolított agyvelőket a feldolgozásig, majd a metszés után a

tárgylemezeket szárazjégen tartottam, munkámat RNáz mentesített környezetben végeztem.

4.13. Immunohisztokémia, képalkotás

A fénymikroszkópiára szánt metszeteimen, beleértve a primer kultúrából származó fedőlemezen fixált sejteket, immunjelölést alkalmazó festést végeztem. A szabadon úszó metszeteket 0,1 M koncentrációjú foszfát-pufferrel (0,1 M PB) többször mostam, a célstruktúrákat standard immunohisztokémiai eljárással jelenítettem meg. A blokkolást 5%-os szamárszérum-oldattal végeztem, ahol az oldószer 0,3% Triton-X100-at tartalmazó 0,1 M PB volt. A 2. táblázatban listázott elsődleges antitestekkel, valamint az ezek ellen szamárban termelt biotin-konjugált másodlagos antitestekkel dolgoztam. A csapadékot avidin-biotin komplex képzésével tettem teljessé, amit végül diaminobenzidin-reagenssel, nikkel-intenzifikálással és 0,001%-os hidrogén-peroxiddal tettem láthatóvá. A metszeteket Olympus BX51-TF típusú fénymikroszkóppal vizsgáltam, a fotókat Olympus DP50-CU típusú kamerával készítettem.

Egyes fehérjék kolokalizációjának vizsgálatához kettős jelöléses immunohisztokémiai eljárást alkalmaztam. A blokkolást, ugyanúgy, mint az egyszeres jelölés esetében, ezúttal is 5%-os szamárszérum-oldattal végeztem, ahol az oldószer 0,3% Triton-X100-at tartalmazó 0,1 M PB volt. A 2. táblázatban listázott primer antitesteket koktélban alkalmaztam 0,1% szamárszérum 0,3% Triton-X100 0,1 M PB oldatában 2 éjszakán át 4 Celsius-fokon (°C), rázógépen. Szekunder antitestekként Cy2, Cy3 és Cy5 cianin fluorokrómokkal konjugált immunoglobulinokat (Jackson Immunochemicals, USA) használtam, a pályakövetés után készült metszeteken a BDA-t Cy2-vel vagy Cy3-mal jelölt streptavidinnel tettem láthatóvá. A metszeteket többször 0,1 M PB-vel, majd közvetlenül felhúzás előtt egyszer desztillált vízbe mártva mostam, a felhúzott metszeteket szabad levegőn, szobahőmérsékleten megszárítottam (dehidráltam), a tárgylemezt xilolba (Molar Chemicals) mártottam, lecsepegtettem, majd DEPEX-szel (ACM, Fluka) lefedtem. A festett metszeteket Zeiss 780 típusú konfokális lézer szkenning mikroszkóppal vizsgáltam és fotóztam.

Az immunofluoreszcencia erősségének meghatározásához a ZEN szoftver 2012-es 1.1.2.0 verzióját használtam. A .czi kiterjesztésű fájlokon manuálisan végeztem sejtszámolást, az összes jelölődött sejtet megszámoltam a vizsgált mag vagy agyi régió határain belül, és az összes vizsgált magot vagy agyi régiót tartalmazó metszeten elvégeztem ugyanezt. Az intenzitásokat egy önkényesen megvont értékhatár alatt háttérnek vettem.

4.14. Immunoprecipitáció

A secretagogin molekulájához kapcsolódó interaktív partnerek azonosításához immunoprecipitációt, és ezt követően Western blot fehérje analízist végeztem. A mintául szolgáló szövet lízisét, a centrifugálást, és a felülúszó eltávolítását követően 1 µg/µl-es értékre korrigáltam az oldatok fehérjetartalmát. A felülúszót kecskében termelt anti-secretagogin ellenanyaggal inkubáltam 12 órán át 4°C-on, majd mágnes-konjugált immunoglobulin G-t (IgG) adtam az elegyhez. A mágnes-antitest-secretagogin-interaktív fehérjék komplexumot egy mágnesállványon az Eppendorf-cső oldlafalára kihúztam, melyet 40 µl 2x-es töménységű Laemmli-pufferrel eluáltam. Az elegyet 5 percig 95°C-on forraltam, végül a mágnest eltávolítottam.

4.15. Szinaptoszóma preparálás

Egyes fehérjék szinapszisbeli jelenlétének igazolása érdekében szinaptoszómát preparáltam három 12 hetes hím patkány vizsgálandó agyi célterületeinek anyagából. A lemért mintákhoz először tízszeres mennyiségű szacharózzal dúsított 0,32 M koncentrációjú 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetánszulfonsavat (HEPES) adtam. Mechanikai homogenizálást (boroszilikát üveg homogenizátor – Thermal Scientific) követően a mintákat centrifugáltam (15000 RPM, 4°C), majd a felülúszóval dolgoztam tovább, mivel a nukleáris frakciót tartalmazó pelletre nem volt szükségem. 1:1 arányban adtam hozzá szacharózzal dúsított 1,3 M koncentrációjú HEPES-t immár a felülúszókból álló mintákhoz, ezután pedig újabb centrifugálást iktattam be. A kapott pellet ezúttal már a szinaptoszómákat tartalmazta, ezért a felülúszókat leszívtam, a csapadékra radioimmunoprecipitációs assay puffert pipettáztam, mely proteáz inhibitort is tartalmazott. A minták fehérjekoncentrációját 2 µg/µl-re korrigáltam, végül Laemmli-

puffert adtam hozzájuk. A fehérjék azonosítását lentebb részletezett Western blot technikával végeztem.

4.16. Primer agytörzsi neuronkultúra és géncsendesítés

Az in vitro géncsendesítés hatásait primer agytörzsi neuronkultúrán, és inzulinóma sejteken vizsgáltam. Előbbihez 4 vemhes patkány 18 napos embrióiból izoláltam agytörzseket, melyeket mechanikusan és 0,1%-os tripszin segítségével enzimatikusan is disszociáltam, majd a sejteket lyukanként 50000-es, valamint 500000-es számban ültettem ki 24, illetve 6 lyukú tápfolyadéktartókba, melyek fedőlemezeit előzőleg poli-D-lizinnel vontam be. A sejtkultúrát Dulbecco's Modified Eagle Medium és Ham's F12 Medium (DMEM/F12) 1:1 arányú elegyével tartottam életben, s ezt a tápfolyadékot különböző komponensekkel egészítettem ki, így végül 2% B27-et, 2 mM L-glutamint, 100 egység/ml penicillint és 100 µg/ml streptomycint tartalmazott. (A médium és valamennyi komponense az Invitrogen cég termékei.)

A primer agytörzsi neuronkultúrán a sejtek túlélésének 4. napján végeztem géncsendesítést. A kísérlethez penicillin- és streptomycinmentes médiumban készítettem elő a neuronokat membránjaik átjárhatóságának biztosítására, melyet 2%-os lipofektamint (Invitrogen) alkalmazó standard eljárással végeztem. Az immunocitokémiai vizsgálatokra szánt tenyészetekben zöld fluoreszcens protein (GFP) plazmiddal kotranszfektáltam, hogy a transzfektált sejteket megjelölhessem. (A secretagogin siRNS-t a SantaCruz cég állította elő, a kontroll kísérlethez random szekvenciájú (scramble) siRNS-t használtam megegyező mennyiségben.) 3 nap után a 24 lyukú tápfolyadéktartókban tenyésztett sejtjeken 4%-os formalinnal immerziós fixálást végeztem. Ezen neuronok morfológiáját, illetve secretagogin- és TH-tartalmuk változásait immunocitokémia segítségével vizsgáltam. A 6 lyukú tápfolyadéktartók sejtjeit nukleinsav analízisre használtam fel, a bennük bekövetkező RNS-szintű változásokat valós idejű, kvantitatív polimeráz láncreakcióval (PCR) mutattam ki.

4.17. INS1-E inzulinóma sejtvonal

Az inzulinóma sejteket, melyek Pierre Maechler jóvoltából álltak rendelkezésemre, egy bikarbonát-puffer alapú, Roswell Park Memorial Institute nevű médiumban (RPMI-1640)

tenyésztettem. A tápfolyadék 10 mM HEPES-t, 5% magzati borjúszérumot, 1 mM nátrium-piruvátot, 2 mM L-glutamint, 50 µM β-merkaptoetanolt, 100 egység/ml penicillint, valamint 100 µg/ml streptomycint tartalmazott. (A médium és valamennyi komponense az Invitrogen cég termékei.) A sejteket enzimatikusan disszociáltam, majd lyukanként 500000-es számban ültettem ki 6 lyukú tápfolyadéktartókba, melyek fedőlemezeit előzőleg poli-D-lizinnel vontam be. Az inzulinóma sejtek secretagogin-géncsendesítését a primer agytörzsi neuronkultúra kapcsán leírtakkal megegyező módon végeztem. A 31-es szerin helyeken végbemenő foszforiláció indukálására CNTF-et adtam a médiumhoz 100 ng/ml koncentrációban [149]. A sejteken fehérje és nukleinsav analízist végeztem.

4.18. Western blot

Fehérjék analíziséhez főként standard Western blot technikát alkalmaztam. A lizált, centrifugált, 2 µg/µl-es protein koncentrációra korrigált, Laemmli-pufferrel denaturált mintákból 12-12 µl-t pipettáztam a 8 vagy 10%-os nátrium-dodecil-szulfát 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 Immobilon-Fl polivinilidén-difluorid membránokba (Millipore) transzferáltam. A célfehérjéket immunohisztokémiai eljárással tettem láthatóvá. A membránokat 3%-os marha szérum albuminnal blokkoltam, majd a keresett fehérjék ellen termelt antitestek (2. táblázat) megfelelő hígítású oldataival inkubáltam. Másodlagos antitestekként tormaperoxidáz-konjugált IgG-t (Jackson Immunochemicals, USA) alkalmaztam 1:10000-es hígításban. A kemolumineszcens reagenssel (Bio-Rad) történő előhívás után ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad) képfeldolgozó platform segítségével szkenneltem a membránokat. A jelsávok intenzitásait az Image Lab szoftver 3.01 verziójával (Bio-Rad) kvantifikáltam, a protein koncentrációk kapott értékeit a β-aktin szintjeire nézve normalizáltam.

4.19. ELISA

A CNTF liquorbeli koncentrációjának meghatározásához standard „szendvics” ELISA kísérletet végeztem Rat CNTF ELISA Kit (Thermo Scientific) segítségével. A gyárilag anti-patkány CNTF antitestekkel borított cellákat tartalmazó 96 lyukú mikrotiter lemez

egyes mikrozsebeibe 100-100 µl liofilizált, rekombináns patkány CNTF alapú standard sor megfelelő elemét, vagy mintáim kétszeres hígítású oldatát pipettáztam. Duplikátumokkal dolgoztam. Biotinilált szekunder antitest, streptavidin-tormaperoxidáz reagens, majd a színreakció kifejlődéséhez tetrametilbenzidin (TMB) szubsztrát, és végül a 0,2 M kénsav tartalmú Stop Solution hozzáadása után iMark Microplate Absorbance Reader (Bio Rad) készülék segítségével abszorbanciát mértem.

4.20. PCR

Az RNS analíziseimhez mintáimból lízist követően izoláltam a ribonukleinsavat RNeasy mini kit (Qiagen) segítségével. Az eljárás folyamán a protokollt követve sejt- vagy szövetmintáimat lízispufferrel (Qiagen) homogenizáltam, a genomiális DNS-t elemésztettem, izolációs oszlopon több lépésben mosópufferrel tisztítottam, majd az RNS-t izoláltam. A RNS mennyiségét Nanodrop technikával határoztam meg, majd ezt követően iScript RT kit (Bio-Rad) reagenseivel reverz transzkripciót végeztem az 1000 nanogramm RNS-tartalomra normalizált 20 µl térfogatú mintákban. 5 percig 25°C-on, 30 percig 42°C-on, végül újabb 5 percig 85°C-on folytattam inkubációt. 100 nanogramm komplementer DNS-t (cDNS) tartalmazó 20 µl térfogatú oldathoz a 3. táblázatban felsorolt primer párok valamelyikét, illetve iTaq polimerázt, valamint valós idejű, kvantitatív vizsgálataim során SYBR Green nukleinsavfestéket is tartalmazó reagens (Bio-Rad) hozzáadása után 39 ciklusban amplifikáló protokollt alkalmazva végeztem el a polimeráz láncreakciót. Egy ciklus 63 másodpercig tartott, az első 3 másodpercben 95°C-ra, a további 1 percben 60°C-ra állítottam be a gép munkaterének hőmérsékletét. A mintákat triplikátumként futtattam. Az RNS amplifikáció és a valós idejű, kvantitatív PCR esetén a detektálás is Bio-Rad CFX 96 készülék segítségével történt. A detektált értékeket a glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) szintjeire nézve normalizáltam. A kvalitatív analízis során az amplifikációt követően mintáimból 15-15 µl-t 1,5%-os agaróz gélen Tris-borát-EDTA (TBE) pufferben konstans 150 V feszültségen futtattam, végül a gélt ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad) képfeldolgozó platform segítségével szkenneltem.

4.21. Nyílt aréna (open field) teszt

Az intraventrikuláris CNTF infúzió viselkedésre gyakorolt hatásának megítélése érdekében a patkányokat 60 perccel a beadást követően 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 [218] segítségével elemeztük ki. A boxon belül a centrum-periféria határt a falaktól 18 cm-es távolságra határoztuk meg. A falak közelében, illetve a centrálisan töltött időtartamot, valamint az összességében bejárt útvonal hosszát mértük. Az objektivitás érdekében a kísérletet végző személy számára nem volt ismeretes az, hogy az állatok kezelt vagy kontroll csoportból származtak-e.

4.22. 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. Az adatokat átlag ± standard hiba formátumban jelenítettem meg, 0,05-nél kisebb *p* értéket tekintettem statisztikailag szignifikánsnak.

1. táblázat – Felhasznált humán minták

Esetazonosító	**Típus**	**Kor** (év)	**Nem**	**PMK**[1] (óra)	**Analízis**
#125	Kontroll	80	férfi	4	WB[2]
#170	Kontroll	37	férfi	8	WB[2]
#220	Kontroll	63	férfi	3,5	WB[2]
#228	Kontroll	27	férfi	8	WB[2]
#236	Kontroll	21	férfi	11	WB[2]
#241	Kontroll	81	nő	5	WB[2]
#281	Kontroll	74	férfi	2,5	WB[2]
#1	A.sze.[3]	63	férfi	2	WB[2]
#10	A.sze.[3]	42	nő	2	WB[2]
#11	A.sze.[3]	47	férfi	2	WB[2]
#69	A.sze.[3]	55	férfi	2	WB[2]
#85	A.sze.[3]	68	férfi	2,5	WB[2]
#233	A.sze.[3]	54	férfi	2	WB[2]
#245	A.sze.[3]	55	férfi	2	WB[2]
#192	A.sze.[3]	81	férfi	5	WB[2]
#211	A.sze.[3]	56	nő	6	WB[2]
#215	A.sze.[3]	44	nő	5	WB[2]
#226	A.sze.[3]	51	férfi	10	WB[2]
#227	A.sze.[3]	55	férfi	6	WB[2]
#66	Öngyilkos	58	férfi	4	WB[2]
#134	Öngyilkos	31	férfi	6	WB[2]
#138	Öngyilkos	52	férfi	3	WB[2]
#143	Öngyilkos	43	férfi	3	WB[2]
#210	Öngyilkos	39	nő	12	WB[2]
#235	Öngyilkos	41	férfi	10	WB[2]

[1]Posztmortem késedelmi idő (PMK)

[2]Western blot

[3]Akut szívelégtelenség

2. táblázat – Felhasznált primer antitestek

Marker	Forrás	Faj	IH[1] hígítás	WB[2] hígítás
β-aktin	Sigma	egér, mk[3]	-	1:10000
CB	Synaptic Systems	tengerimalac, pk[4]	1:1000	-
CR	Synaptic Systems	tengerimalac, pk[4]	1:1000	-
CNTF	R&D Systems	kecske, pk[4]	1:400	1:20000
CNTFR	R&D Systems	kecske, pk[4]	1:100	1:5000
CRH	Santa Cruz	nyúl, pk[4]	1:1000	-
ENK	Immunostar	nyúl, pk[4]	1:6000	-
Erk1/2	Cell signaling	egér, mk[3]	1:250	1:1000
GFAP	Synaptic Systems	tengerimalac, pk[4]	1:500	-
NPY	Immunostar	nyúl, pk[4]	1:5000	-
PV	Millipore	egér, mk[3]	1:1000	-
pErk1/2	Cell signaling	nyúl, pk[4]	1:250	1:1000
scgn	L. Wagner	nyúl, pk[4]	1:12000	1:12000
scgn	Cell signaling	nyúl, pk[4]	1:1000	-
scgn	R&D Systems	kecske, pk[4]	1:100	1:1000

syn.phys.	Synaptic Systems	nyúl, pk[4]	-	1:5000
TH	MERCK/ Millipore	nyúl, pk[4]	1:1000	1:1000
pSer31	Sigma	nyúl, pk[4]	1:1000	1:1000
pSer40	Sigma	nyúl, pk[4]	1:1000	1:1000

[1]Immunohisztokémia

[2]Western blot

[3]monoklonális antitest

[4]poliklonális antitest

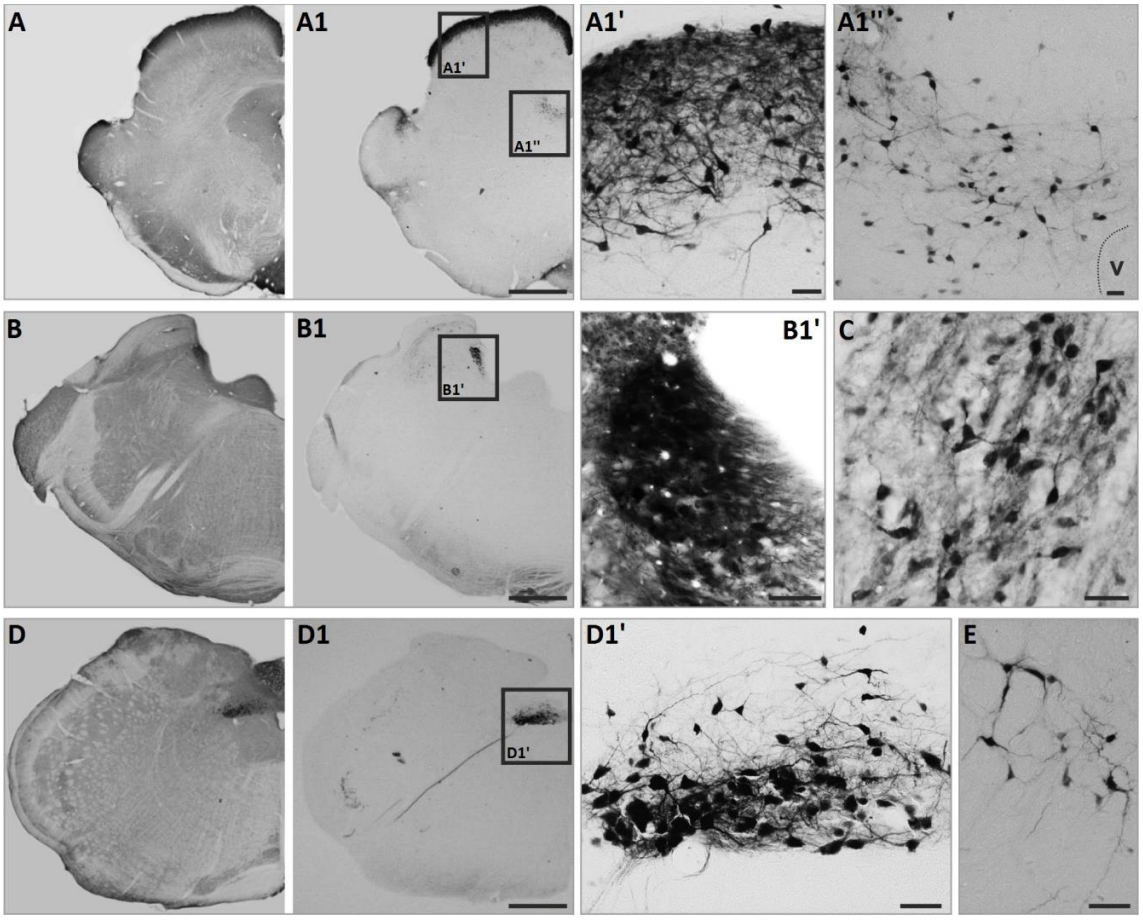
3. táblázat – Felhasznált patkány RNS-re tervezett primerek és szekvenciáik

Gén	Primer	Szekvencia
CNTF	antisense: sense:	5’ – ATG GCT TTC GCA GAG CAA AC – 3’ 5’ – CAA CGA TCA GTG CTT GCC AC – 3’
scgn	antisense: sense:	5’ – CCC AGA AGT GGA TGG ATT TG – 3’ 5’ – GTT GGG GAT CAG GGG TTT AT – 3’
TH	antisense: sense:	5’ – TCA GTT CTG TGC GTC GGG TGT – 3’ 5’ – CCA GGT CCA GGT CAG GGT CA – 3’
GAPDH	antisense: sense:	5’ – AAC TTT GGC ATT GTG GAA GG – 3’ 5’ – ACA CAT TGG GGG TAG GAA CA – 3’

5. Eredmények

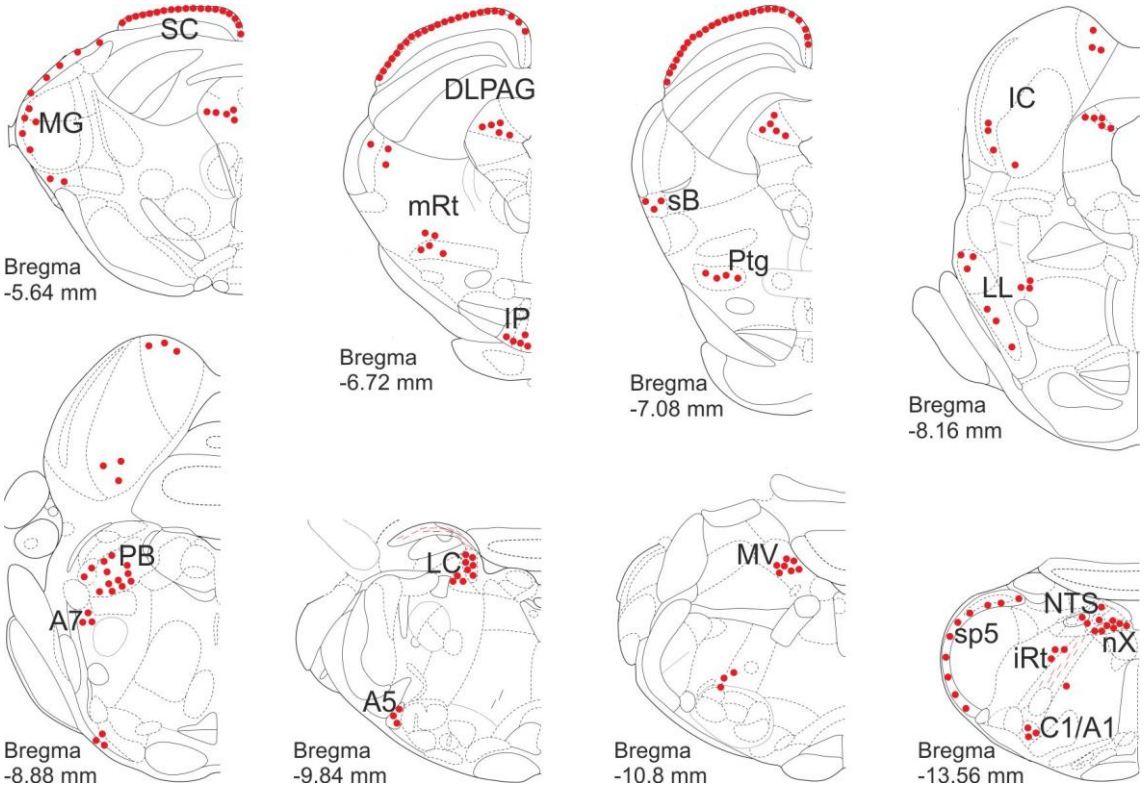
5.1. A secretagogin eloszlása patkány agytörzsében

Korábbi tanulmányok már leírták a secretagogin eloszlási mintázatát a rágcsálók előagyában [219, 220], azonban kutatásaimat megelőzőleg az agytörzsbeli secretagogin tartalmú sejtek identitása nagyrészt ismeretlen volt. Immunohisztokémiai módszerrel kísérleteimben számos nyúltvelői, híd- és középagybeli régióban mutattam ki nagy sűrűségben secretagogin pozitív neuronokat (4-5. ábrák). Kiemelkedő immunoreaktivitásúnak bizonyult ezen lókuszok közül többek között a colliculus superior felületes rétege és a periaqueductalis szürkeállomány dorzolaterális része (DLPAG) a középagyban, a nucleus parabrachialis, illetve a LC a hídban, valamint a nucleus dorsalis nervi vagi a nyúltvelőben. Ezeken túlmenően további kisebb secretagogin tartalmú sejtcsoportok rajzolódtak ki, melyek a C1/A1, A5 és A7 sejtcsoportoknak megfelelő területeken helyezkedtek el.



4. ábra. A secretagogin fehérje eloszlása patkány agytörzsében. Immunohisztokémia

A középagy magasságában készült metszeten (A, A1) látható, hogy a colliculus superior nagy denzitásban tartalmaz secretagogin pozitív sejteket (A1'), immunoreaktív sejtek láthatók még a periaqueductalis szürkeállomány dorzolaterális részében (A1''). A hídban (B, B1) erőteljesen festődött a LC (B1'), illetve a nucleus parabrachialis sejtjei is tartalmazzák a fehérjét (C). A nyúltvelő szintjében (D, D1) a nucleus dorsalis nervi vagi (D1'), valamint a C1/A1 (E) ábrázolódnak. Rövidítések: v aqueductus cerebri. Lépték: 1 milliméter (mm) (A1, B1, D1), 100 µm (A1'), 40 µm (B1'), 30 µm (C, D1', E), 10 µm (A1'').



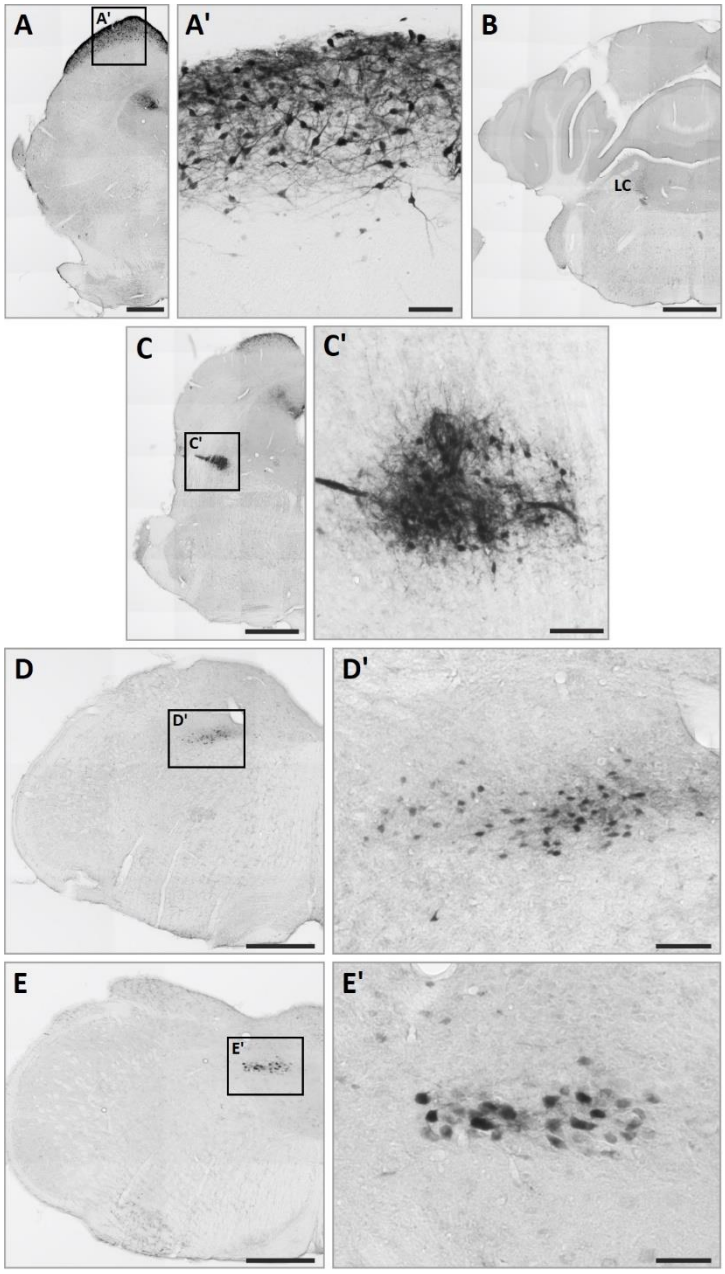
5. ábra. A secretagogin fehérje eloszlása patkány agytörzsében. Összefoglaló grafika

Valamennyi immunoreaktív agytörzsbeli sejtcsoportosulást összegző ábra, rosztrokaudális sorrendbe rendezve, két sorban megjelenítve a metszetek rajzait [1]. A piros pontok a secretagogin pozitív sejtek eloszlását jelölik. Rövidítések: A1, A5, A7 noradrenerg sejtcsoportok, C1 adrenerg sejtcsoport, DLPAG dorzolaterális periaqueductalis szürkeállomány, IC colliculus inferior, IP nucleus interpeduncularis, iRT nucleus reticularis intermedius, LC locus coeruleus, LL lemniscus lateralis, MG corpus geniculatum mediale, mm milliméter, mRT középagyi hálózatos állomány, MV nucleus vestibularis medialis, NTS nucleus tractus solitarii, nX nucleus dorsalis nervi

vagi, PB nucleus parabrachialis, Ptg nucleus tegmentalis pedunculopontinus, sB nucleus subbrachialis, SC colliculus superior, sp5 nucleus tractus spinalis nervi trigemini.

5.2. A secretagogin eloszlása egér agytörzsében

A secretagogin agytörzsi eloszlását egereken is vizsgáltam. Patkánnyal való szoros evolúciós kapcsolata miatt közel azonos expressziós mintázatra számítottam, mely nagyrészt igazolódott is. Secretagogin pozitív neuronokat azonosítottam a nucleus tegmentalis microcellularisban, a nucleus tractus solitariiben, a nucleus dorsalis nervi vagiban, a noradrenerg sejtcsoportoknak megfelelő területeken – különös tekintettel a LC-ra – továbbá a colliculus superiorban (6. ábra).



6. ábra. A secretagogin fehérje eloszlása egér agytörzsében. Immunohisztokémia

Secretagogin pozitív neuronok a colliculus superiorban (A, A'), a LC-ban (B), a nucleus tegmentalis microcellularisban (C, C'), a nucleus tractus solitariiben (D, D') illetve a nucleus dorsalis nervi vagiban (E, E'). Rövidítések: LC locus coeruleus. Lépték: 1 mm (A-E), 100 µm (A', C') 70 µm (D'), 40 µm (E').

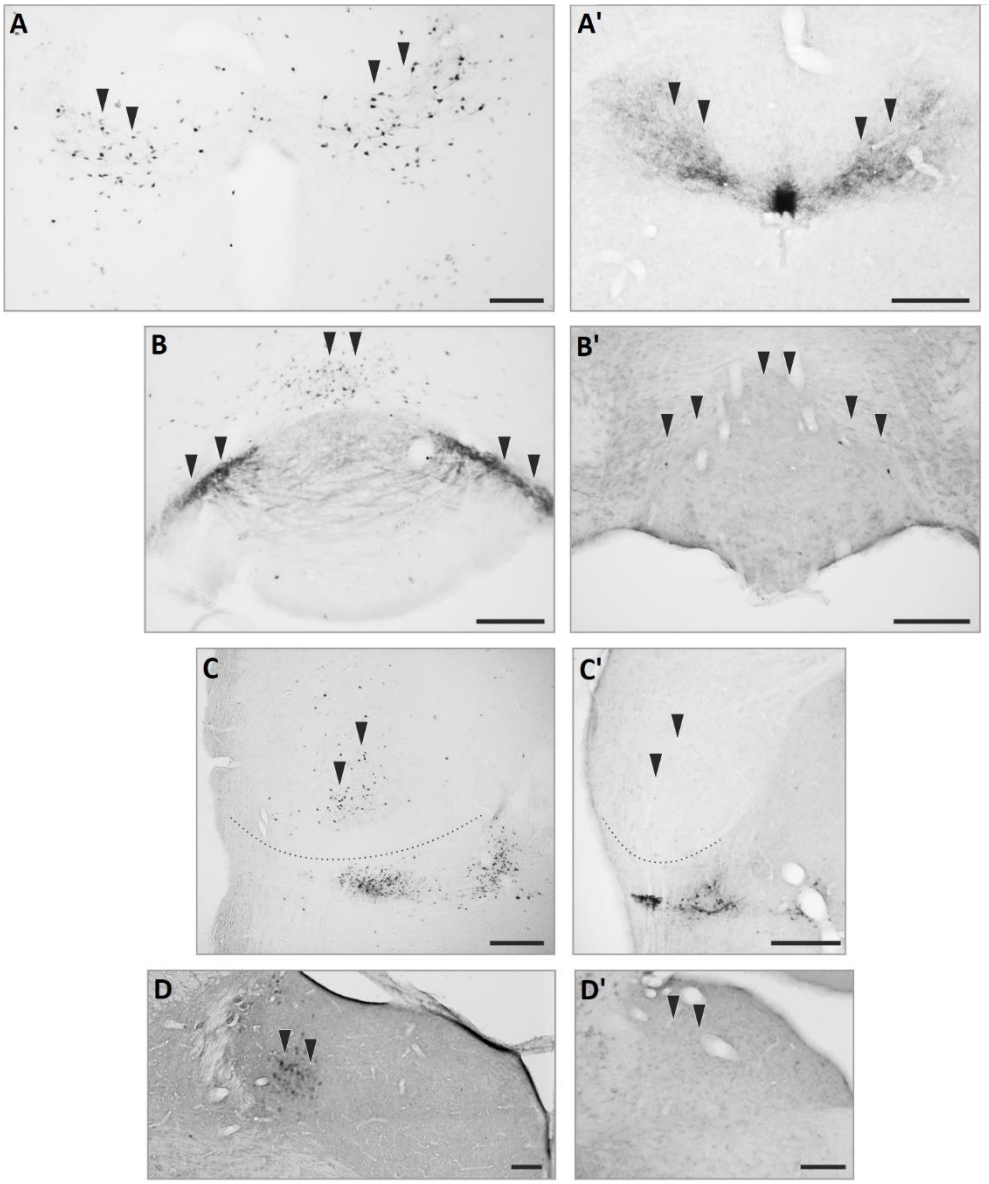
5.3. Secretagogin expresszióbeli különbségek patkány és egér agytörzsében

A patkányban megfigyelthez legtöbb szempontból hasonló disztribúció ellenére néhány, helyenként markáns eltérést azonosítottam egérben. A periaqueductalis szürkeállomány

dorzolaterális részében például csak idegrostok és axon terminálisok tartalmaznak secretagogint, a neuronok szómái nem. Míg patkányban a nucleus interpeduncularis dorzális része secretagogin pozitív sejttesteket, ventrolaterális része secretagogin pozitív sejteket és rostokat halmoz, egérben nincs jele e régiókban hasonló immunoreaktivitásnak. Hasonlóképp sem a colliculus inferior, sem a nucleus vestibularis medialis nem jelölődött egér agytörzsi szeleteken végzett kísérleteim során (4. táblázat, 7. ábra).

4. táblázat – Secretagogin expresszióbeli különbségek patkány és egér agytörzsében (szemikvantitatív összefoglaló)

	agyterület, mag, sejtcsoport	patkány	egér
középagy	colliculus superior	+++	+++
	dorzolat. periaq. szürkeállomány	+	++ (Ø szóma)
	nucleus interpeduncularis	++	-
	nucleus tegmentalis microcellularis	-	+++
	colliculus inferior	+	-
híd	nucleus parabrachialis	++	-
	A7	+	+
	LC	+++	++
	A5	+	+
	nucleus vestibularis medialis	+	-
nyúltvelő	nucleus dorsalis nervi vagi	++	++
	nucleus tractus solitarii	++	++
	C1/A1	+	+

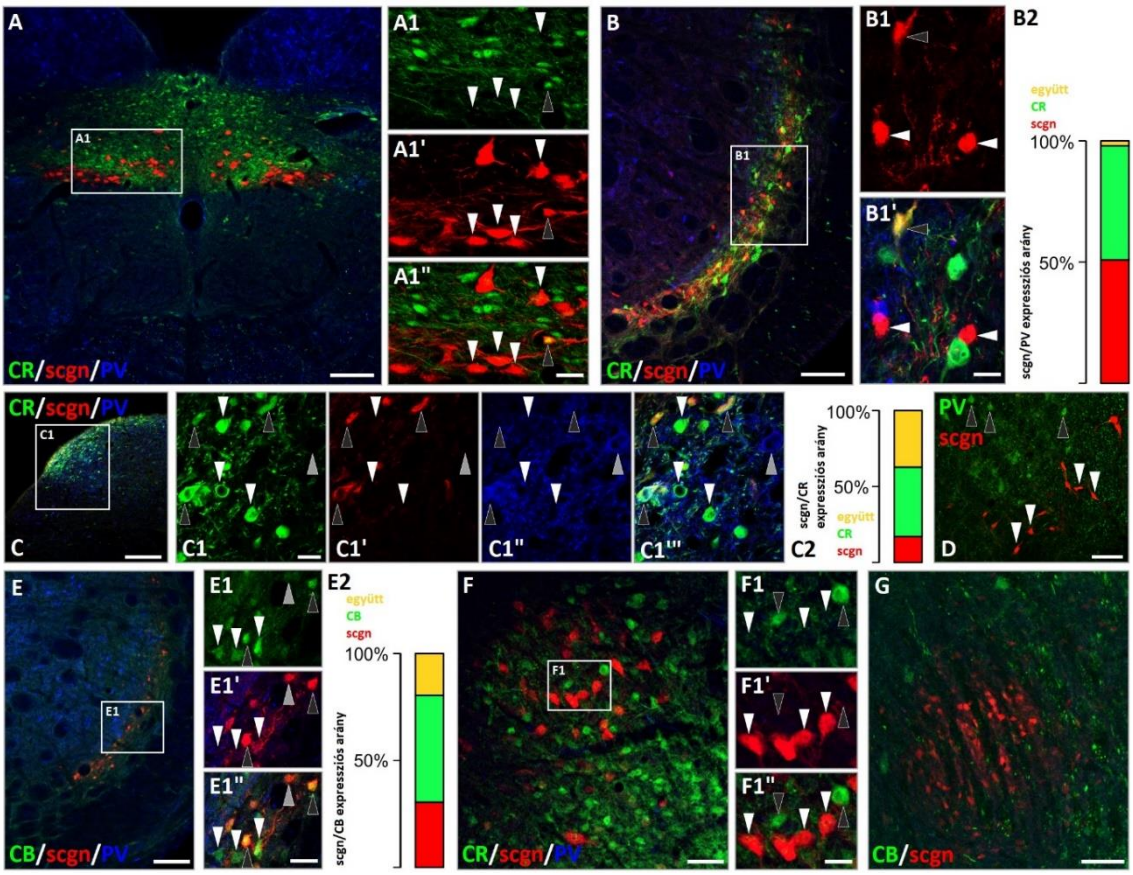


7. ábra. Secretagogin expresszióbeli különbségek patkány és egér agytörzsében. Immunohisztokémia

A dorsolateralis periaqueductalis szürkeállományban patkányban sejttestek (A), egérben rostok és axon terminálisok (A') ábrázolódtak. Patkány nucleus interpeduncularisában dorzálisan szómákat, ventrolaterálisan szómákat és rostokat azonosítottam (B), egérben hasonló immunoreaktivitásnak nincs jele (B'). Patkány colliculus inferiorjában szórványosan secretagogin pozitív sejtek láthatók (C), egérben ugyanez a régió immunonegatív (C'). Patkány nucleus vestibularis medialisával (D) szemben szintén nem tartalmaz secretagogin pozitív sejteket egér azonos agytörzsi magja (D'). A nyílhegyek az adott magra, sejtcsoportra, területre jellemző secretagogin pozitív sejtekre, rostokra mutatnak. Lépték: 300 µm (A-D').

5.4. A secretagogin viszonya más kalciumkötő fehérjékhez

A központi idegrendszeri neuronok jellemzően egyféle kalciumkötő fehérjét expresszálnak. Természetesen vannak kivételek, de a kolokalizációk ellenére sok idegsejt-populáció azonosítható a rá jellemző fehérjetípus eloszlási mintázata alapján [13, 17-19]. E megállapítással összhangban, az agytörzsben a secretagogin pozitív neuronok néhány jól definiálható kivétellel az általam vizsgált egyéb, klasszikus kalciumkötő fehérjék közül egyet sem tartalmaztak. A nucleus dorsalis nervi vagiban és a nucleus tractus solitarii commissuralis részében a calretinin és a secretagogin komplementer eloszlást mutatott, számos kettősen jelölt sejt fordult elő azonban a nucleus tractus solitarii dorzolaterális részében. Secretagogin/calretinin/parvalbumin hármas immunfestéssel a secretagogin pozitív sejtek 68,5 ± 5,4%-a bizonyult calretinin pozitívnak is, míg secretagogin/parvalbumin kettős jelet egy neuron kivételével sehol nem találtam. Változatos koexpressziós mintázat jellemző a nucleus tractus spinalis nervi trigeminire, miként secretagogin/calbindin D28k/parvalbumin vagy secretagogin/calretinin/parvalbumin hármas immunohisztokémiák során az láthatóvá vált. Calbindin D28k itt a secretagogin pozitív sejtek jelentős részében, 40,3 ± 15,9%-ában, calretinin elenyésző részükben, 2,8 ± 3,2%-ukban van jelen, secretagogint és parvalbumint együtt tartalmazó sejt pedig nem azonosítható. Hasonlóképp immunonegatívak a secretagogin pozitív neuronok parvalbuminra a ventrolaterális medullában, továbbá a nucleus parabrachialisban. Ez utóbbi magban a secretagogin pozitív neuronok egyébként sem calretinint, sem calbindint nem tartalmaznak (8. ábra).



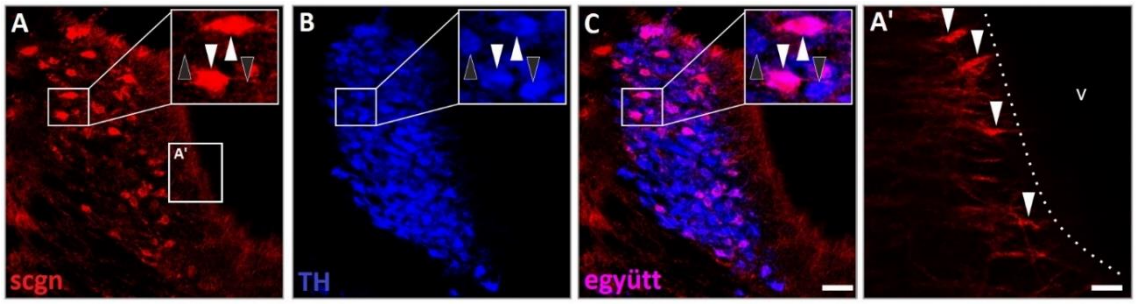
8. ábra. Secretagogin és klasszikus kalciumkötő fehérjék koexpressziója egyes patkány agytörzsi magokban. Immunohisztokémia

Az A-A1" paneleken a calretinin és a secretagogin komplementer eloszlása látható a nucleus dorsalis nervi vagi területén és a nucleus tractus solitarii commissuralis részében (a fehér nyílhegyek secretagogin pozitív/calretinin negatív sejtekre, a fekete nyílhegy secretagogin pozitív/calretinin pozitív sejtre mutat). A B-B1' ábrarészek a nucleus tractus spinalis nervi trigeminit mutatják be, ahol a secretagogin tartalmú neuronok (fehér nyílhegyek) ismét immunonegatívnak bizonyultak calretininre, egy kivételtől eltekintve (fekete nyílhegy). A B2 diagram a nucleus tractus spinalis nervi trigemini festődött sejtjeinek egyszeres, valamint kettős jelölődését reprezentálja. A C-C1'" paneleken látható, hogy a nucleus tractus solitarii dorzolaterális részében a calretinin pozitív neuronok durván azonos mennyiségben expresszálnak (fekete nyílhegyek) vagy nem expresszálnak (fehér nyílhegyek) secretagogint. A szürke nyílhegy egy parvalbuminra pozitív, de calretininre és secretagoginra egyaránt negatív sejtet jelöl. Ugyanezen régió sejtjeinek festődéséről ad információt grafikus megjelenítésben a C2 diagram. A D ábrarészen látható, hogy a ventrolaterális medulla neuronjai nem koexpresszálják a

secretagogint (fehér nyílhegyek) és a parvalbumint (fekete nyílhegyek). Secretagogin, calbindin D28k és parvalbumin nucleus tractus spinalis nervi trigeminibeli eloszlását mutatják be az E-E1" panelek. A fehér nyílhegyek calbindin D28k pozitív/secretagogin negatív sejtekre mutatnak, a szürke nyílhegy pedig egy secretagogin pozitív, de calbindin D28k-ra immunonegatív sejtet jelöl. Oszlopdiagram formában e mag sejtfestődéseiről az E2 panel nyújt tájékoztatást. A nucleus parabrachialis laterális részében a secretagogin és a calretinin komplementer eloszlást mutat (F-F1" panelek). A fehér nyílhegyek secretagogin pozitív/calretinin negatív sejtekre, a fekete nyílhegyek secretagogin negatív/calretinin pozitív sejtekre mutatnak. A G ábrarészen látható, hogy ugyanezen magban a secretagogint tartalmazó sejtek immunonegatívak calbindin D28k-ra is. Rövidítések: CB calbindin D28k, CR calretinin, PV parvalbumin, scgn secretagogin. Lépték: 150 µm (A, B, C, E) 70 µm (G), 40 µm (D, F) 10 µm (A1", B1', C1, E1", F1").

5.5. A secretagogin jelen van noradrenerg TH tartalmú LC sejtekben

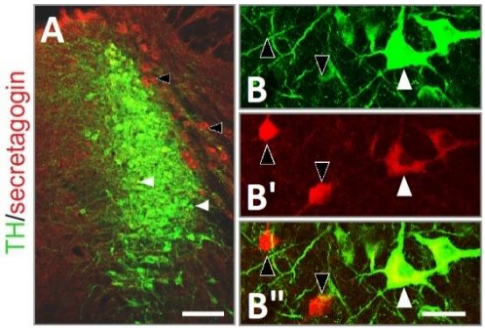
Secretagogin/TH kettős festés segítségével megállapítottam, hogy patkány LC magjában a jelölődött sejtek 75,5 ± 6,9%-a koexpresszálja e két markert, míg a maradék 23,3 ± 2,2% és 1,1 ± 0,9% csak TH-ra vagy csak secretagoginra pozitív. A kettősen jelölődött sejtek nyúlványai, melyek dendriteknek imponálnak, gyakran a kamrai felszín közvetlen közelében végződnek (9. ábra).



9. ábra. Secretagogin és TH expresszió patkány LC-ban. Immunohisztokémia

Secretagogin jellemzően a LC TH pozitív neuronjaiban fordul elő. Az A, B és C paneleken a fehér nyílhegyek a kettősen jelölt sejtekre, a fekete nyílhegyek a TH pozitív/secretagogin negatív sejtekre mutatnak. Az A' panelen látható, hogy a secretagogin tartalmú sejtnyúlványok a kamrafelszín felé húzódnak (fehér nyílhegyek). Rövidítések: scgn secretagogin, TH tirozin-hidroxiláz, v agykamra. Lépték: 30 µm (A, B, C), 3 µm (A').

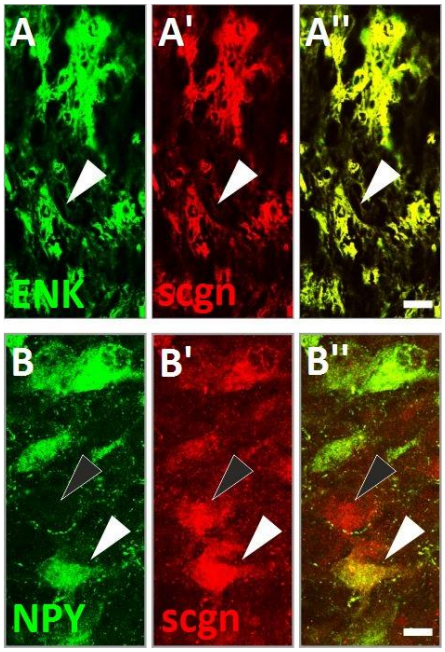
Egereken végzett immunfestéseim hasonlóan magas koexpressziós arányt igazoltak e faj LC-ában is. A secretagogin és a TH tartalmú sejtek itt is nagy többségükben átfednek egymással (10. ábra).



10. ábra. Secretagogin és TH expresszió egér LC-ban. Immunohisztokémia

Secretagogin jellemzően a LC TH pozitív neuronjaiban fordul elő. Az A, B-B" paneleken a fehér nyílhegyek a kettősen jelölt sejtekre, a fekete nyílhegyek a TH negatív/secretagogin pozitív sejtekre mutatnak. Rövidítések: scgn secretagogin, TH tirozin-hidroxiláz. Lépték: 200 µm (A), 10 µm (B-B").

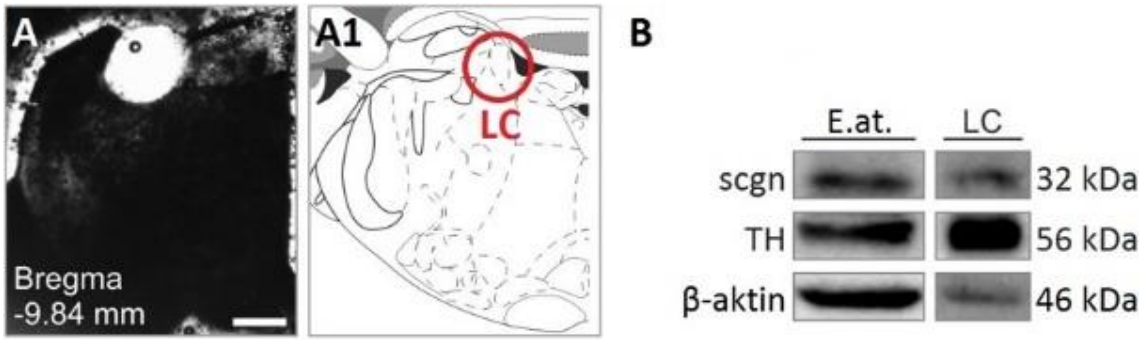
Neurokémiai jellegük alapján a LC-beli noradrenerg neuronok több alcsoportra oszthatók [50]. Kettős immunjelöléseket alkalmazó immunhisztokémiai kísérleteimben úgy találtam, hogy az enkefalin, valamint a neuropeptid Y tartalmú sejtek, melyek a LC-beli TH pozitív sejtek két nagy csoportját képezik, egymástól függetlenül, hasonlóan magas arányban expresszálnak secretagogint is (11. ábra). Ez arra enged következtetni, hogy a secretagogin jelenléte nem korlátozódik bizonyos neuromodulatorikus peptideket expresszáló sejtekre, hanem a LC-beli TH-tartalmú noradrenerg neuronokban általában jelen van.



11. ábra. Secretagogin és neuropeptidek együttes expressziója patkány LC-ában. Immunohisztokémia

Enkefalint (A-A”) vagy neuropeptid Y-t (B-B”) expresszáló neuronokban gyakran secretagogin is jelen van. A fehér nyílhegyek ilyen sejtekre, míg a feketék secretagogin pozitív, de enkefalinra vagy neuropeptid Y-ra nézve negatív sejtekre mutatnak. Rövidítések: ENK enkefalin, NPY neuropeptid Y, scgn secretagogin. Lépték: 3 µm (A-A”, B-B”).

Immunohisztokémiai vizsgálatokon kívül Western blot fehérje analízis segítségével is igazoltam a secretagogin jelenlétét mind egész agytörzsi homogenizátumokból, mind LC micropunch-okból nyert mintákban (12. ábra).

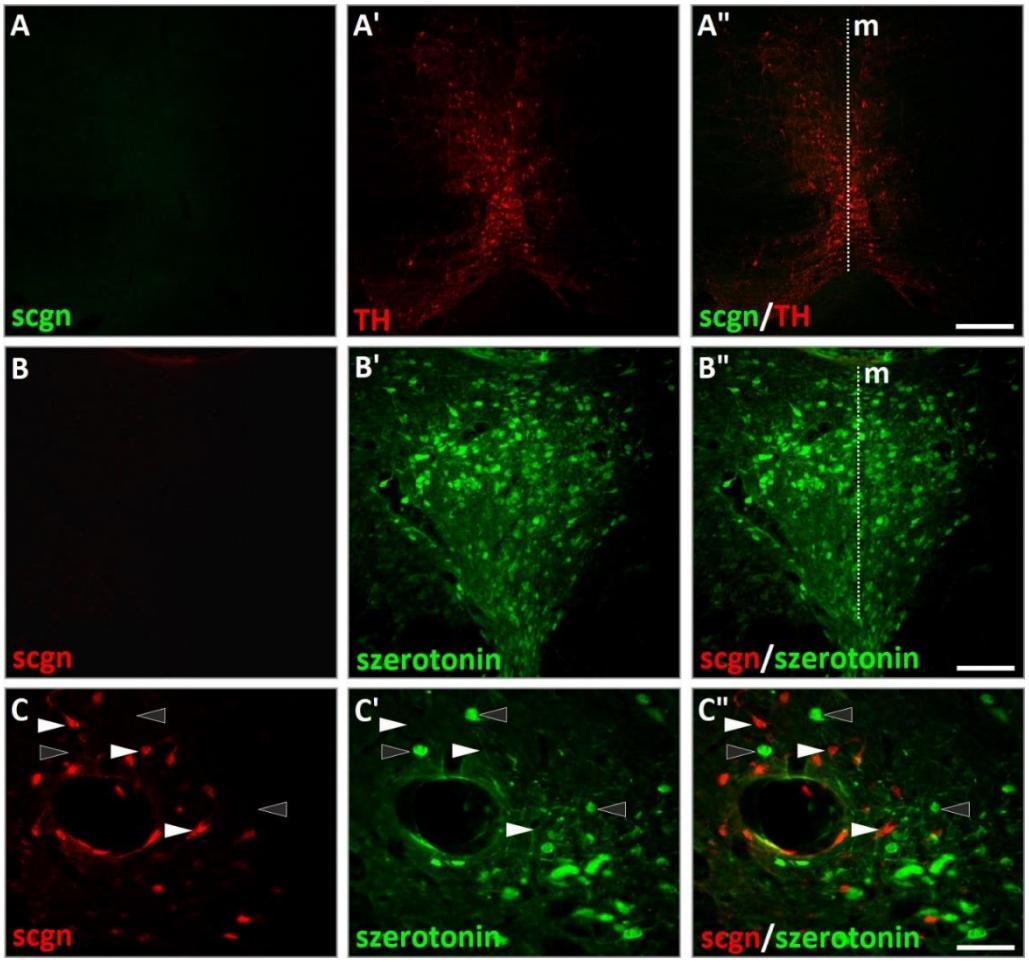


12. ábra. Egész patkány agytörzs és LC micropunch-minták fehérje analízise. Western blot

LC szintjében levő agytörzsi metszet micropunch technika alkalmazását követően fénymikroszkópos felvételen (A), illetve rajzon (A1) [1]. A mintavételezés helyét szövethiány (A) vagy piros gyűrű (A1) jelzi. Western blot protein analízis eredményén (B) láthatók az egész agytörzsi homogenizátum és a micropunch eljárással kinyert LC minták secretagogin és TH fehérjéinek megfelelő immunoreaktív sávok. Rövidítések: E.at. egész agytörzs, kDa kilodalton, LC locus coeruleus, mm milliméter, scgn secretagogin, TH tirozin-hidroxiláz. Lépték: 1 mm (A).

5.6. A secretagogin nincs jelen az agytörzs dopaminerg és szerotoninerg sejtjeiben

A középagyi ventrális tegmentum (A10) TH pozitív, feltehetőleg dopaminerg sejtjei, valamint a raphe magok szerotoninerg neuronjai a noradrenerg központok sejtjeivel ellentétben egyáltalán nem festődtek patkányból származó agytörzsi szeleteken végzett secretagogin immunohisztokémiáim során. Még a periaqueductális szürkeállomány ventrális részében, ahol szerotonin és secretagogin tartalmú neuronok egyaránt jelen vannak, sem beszélhetünk a két fehérje koexpressziójáról (13. ábra).

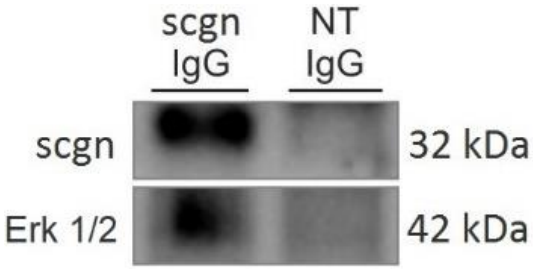


13. ábra. Secretagogin és TH, illetve secretagogin és szerotonin expresszió a középagy ventrális tegmentumában, illetve a nucleus raphe medianusban patkányban. Immunohisztokémia

A középagy ventrális tegmentumának TH-immunoreaktív neuronjai secretagogin-immunonegatívak (A-A”). Szerotonin-immunoreaktív neuronok a nucleus raphe medianusban nem expresszálnak secretagogint (B-B”). A secretagogin és a szerotonin tartalmú neuronok komplementer sejtcsoportokat alkotnak a periaqueductalis szürkeállomány ventrális részében (a fehér nyílhegyek a secretagogin immunreaktív/szerotonin immunonegatív sejtekre, a fekete nyílhegyek a secretagogin immunonegatív/szerotonin immunoreaktív sejtekre mutatnak) (C-C”). Rövidítések: m középvonal, scgn secretagogin, TH tirozin-hidroxiláz. Lépték: 150 µm (A”, B”), 40 µm (C”).

5.7. A secretagogin interaktív partnere az Erk1/2

A TH transzkripcióját, foszforilációját és ubiquitinációját különböző protein kinázok szabályozzák (pl. Erk1/2, PKA, CaMPKII) [94]. Feltételeztem, hogy a secretagogin szerepet játszhat a TH szabályozásában ezen enzimekre gyakorolt hatása révén. Immunoprecipitációt végeztem egész agytörzsi homogenizátumokon, a secretagogin interaktív partnereit Western blot segítségével elemeztem (14. ábra). A kemolumineszcens jeldetektálás során igazolódott a secretagogin Erk1/2-vel való közvetlen kapcsolata, a PKA és a CaMPKII fehérjéket ugyanakkor nem tudtam detektálni az immunoprecipitátumban.



14. ábra. A secretagogin interaktív partnereinek vizsgálata. Immunoprecipitáció

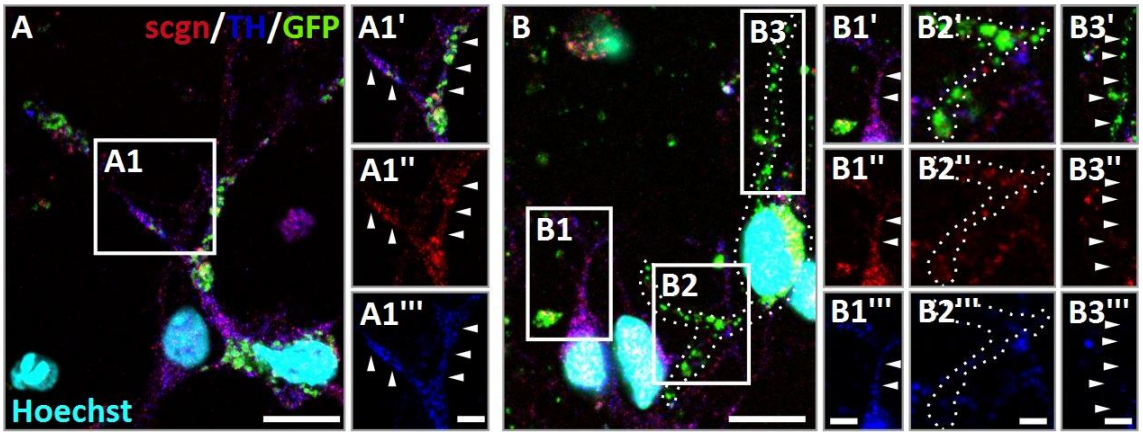
Egész agytörzsi homogenizátumon végzett immunoprecipitációt követő Western blot fehérje analízis eredménye; az Erk1/2 megtalálható a secretagogin interaktív partnerei között. A kontrollként alkalmazott nem specifikus antitesthez nem kötődött sem a secretagogin, sem az Erk1/2. Rövidítések: Erk1/2 extracelluláris szignál-regulált kináz

1/2, IgG immunoglobulin G, kDa kilodalton, NT nem specifikus (non-target), scgn secretagogin.

5.8. A secretagogin TH expresszióra gyakorolt hatása

A TH gén promoterének szabályozása részben Ca^{2+}-függő mechanizmus [129]. Hipotézisem ellenőrzése céljából, mely szerint a Ca^{2+}-szenzor secretagogin befolyásolhatja a TH expresszióját, géncsendesítéses kísérleteket végeztem. In vivo és in vitro kezeltem a secretagogin tartalmú sejteket rövid interferáló RNS-sel (siRNS), majd valós idejű PCR, Western blot, illetve immunohiszto- és immunocitokémiai eljárásokkal elemeztem a génexpressziós szintű változásokat.

Primer agytörzsi neuronkultúrában kotranszfekciót végeztem: az alkalmazott secretagogin siRNS mellett GFP-t kódoló plazmidot is juttattam a médiumba. A kotranszfektált sejtek ezáltal GFP-t termeltek, így azokat zöld fluoreszcenciájuk alapján azonosítottam. Számos ilyen neuronban a secretagogin immunofluoreszcencia gyengébb volt, mint a nem transzfektált neuronokban, ami együtt járt a TH immunoreaktivitás látható csökkenésével is (15. ábra).

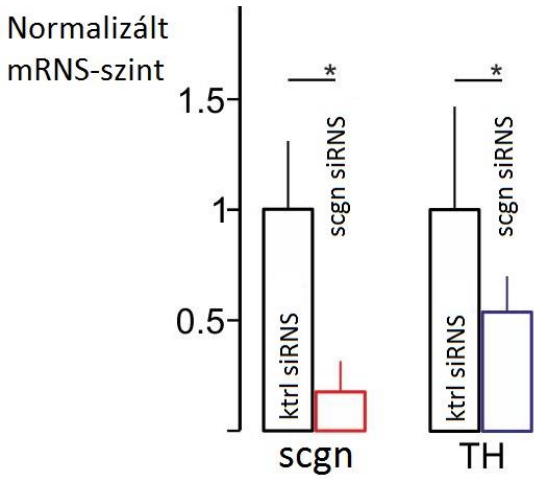


15. ábra. Secretagogin géncsendesítés primer agytörzsi neuronkultúrán. Immunocitokémia

A 18 napos patkány embriók agytörzseiből készített primer neuronkultúra sejtjeinek kezelése secretagogin siRNS-sel a TH immunoreaktivitás csökkenéséhez vezet. A kontrollként alkalmazott nem specifikus siRNS nem idéz elő hasonló változást (A), ezen ágenssel transzfektált sejtek erős TH-jelet adnak nyúlványaikban (fehér nyílhegyek az A1'-A1''' ábrákon). Hasonlóképp, secretagogin-immunoreaktív nem transzfektált

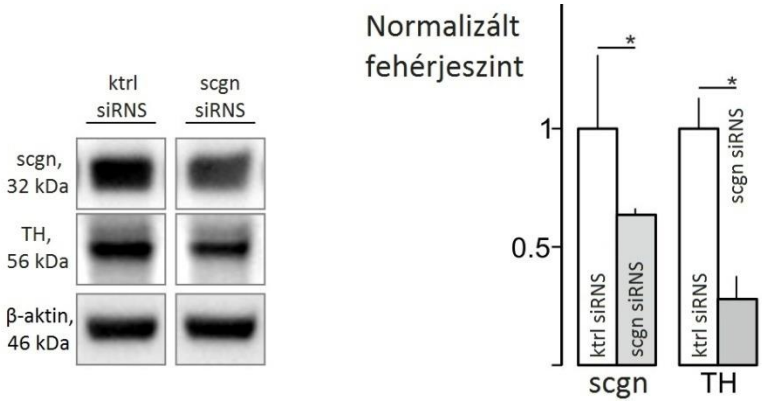
sejtekben (B1) erős secretagogin- és TH-immunoreaktivitás látható (fehér nyílhegyek a B1'-B1''' ábrákon). A GFP-t és ezzel együtt secretagogin siRNS-t is felvevő sejtek (B2, B3) dendritjeiben ábrázolódó secretagogin- és TH-jel viszont gyenge (szaggatott körvonal a B2'-B2''', illetve fehér nyílhegyek a B3'-B3''' ábrákon). Rövidítések: GFP zöld fluoreszcens protein, scgn secretagogin, TH tirozin-hidroxiláz. Lépték: 100 µm (A, B), 30 µm (A1'-A1''', B1'-B3''').

Párhuzamosan tenyésztett agytörzsi sejtkultúrából származó mintákon vizsgáltam az RNS-szintű, inzulinóma eredetű sejtkultúrán pedig a fehérje szintű változásokat. Mindkét esetben az immunocitokémiai vizsgálatokkal összecsengő eredményre jutottam: a secretagogin siRNS-sel transzfektált kultúrákban nemcsak a secretagogin fehérje és a mRNS szintje, hanem ezzel párhuzamosan a TH fehérje és a mRNS mennyisége is csökkenést mutatott (16-17. ábrák).



16. ábra. Secretagogin géncsendesítés primer agytörzsi neuronkultúrán. Valós idejű, kvantitatív PCR

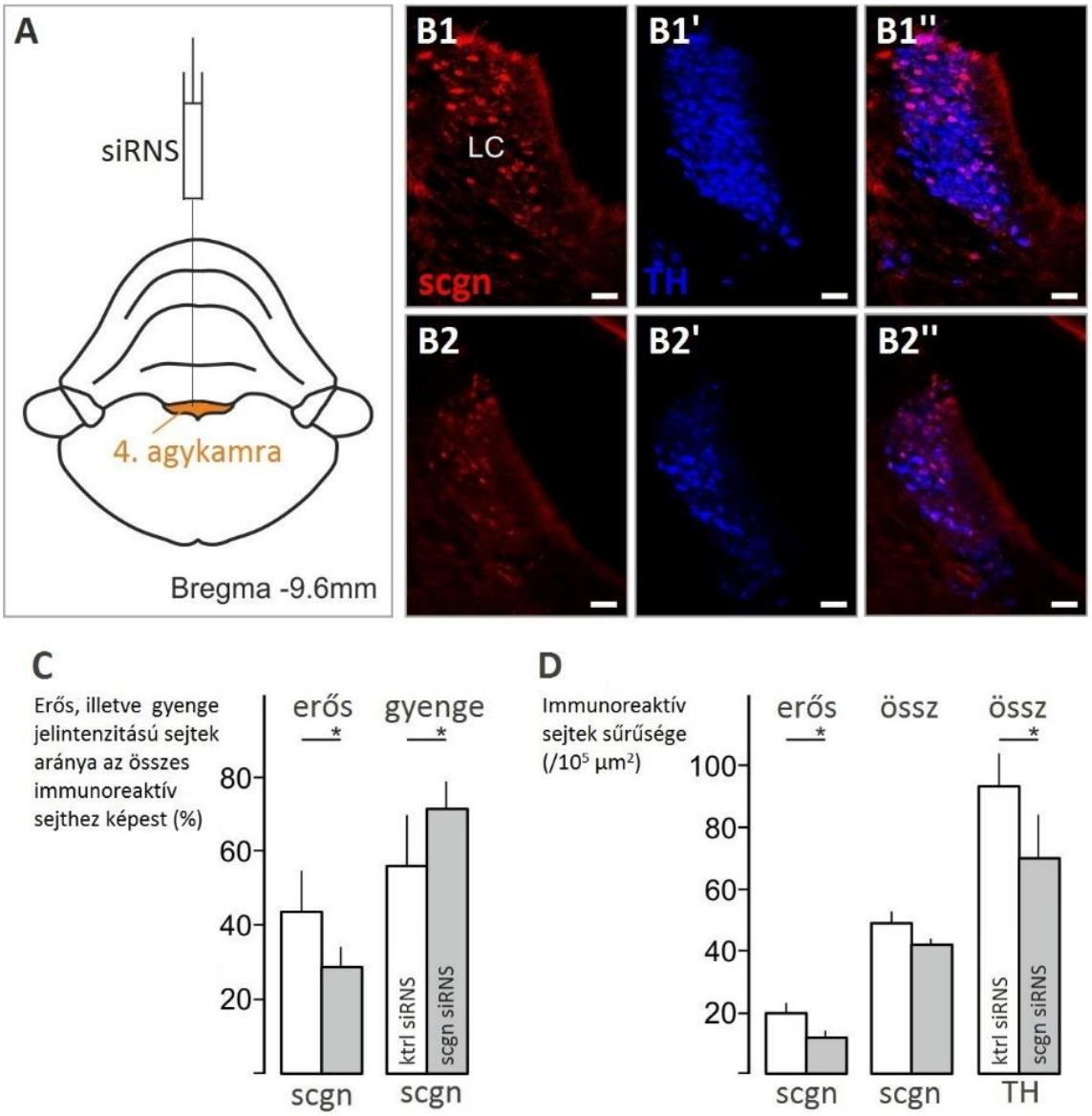
Secretagogin géncsendesítés hatására a kontrollhoz képest jelentősen csökkent a TH mRNS-szintje. p<0,05, a Student-féle t-próba során. Rövidítések: ktrl kontroll, mRNS hírvivő ribonukleinsav, scgn secretagogin, siRNS rövid interferáló ribonukleinsav, TH tirozin-hidroxiláz.



17. ábra. Secretagogin géncsendesítés inzulinóma sejtvonalon. Western blot

Inzulinóma sejtvonalon végzett secretagogin géncsendesítés csökkent TH expressziót eredményez. Western blottal kimutatva. p<0,05, a Student-féle t-próba során. Rövidítések: kDa kilodalton, ktrl kontroll, scgn secretagogin, siRNS rövid interferáló ribonukleinsav, TH tirozin-hidroxiláz.

Az in vivo végzett géncsendesítéssel szintén hasonló eredményeket értem el. A IV. agykamrába juttatott siRNS hatására a harmadik napra csökkent a LC-beli TH-t expresszáló sejtek denzitása (18. ábra).

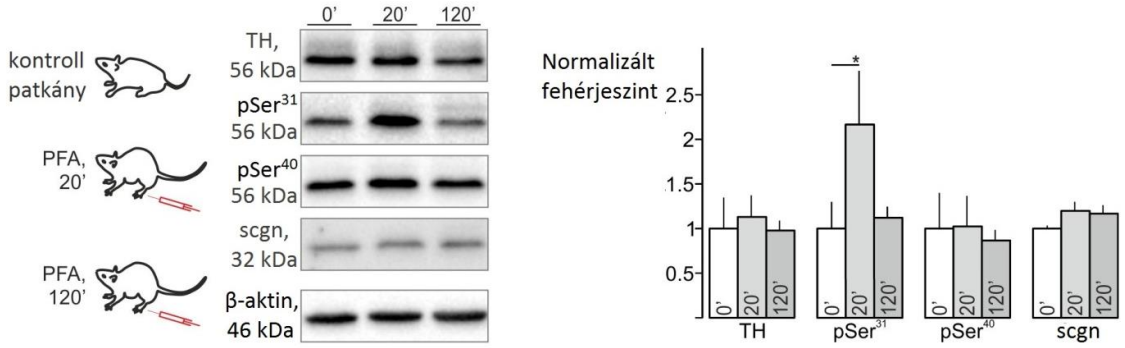


18. ábra. In vivo secretagogin géncsendesítés, fehérje szintű változások. Immunohisztokémia

In vivo secretagogin géncsendesítés (A). A kontroll kísérlet során beadott nem specifikus siRNS hatásához (B1-B1") képest a scgn siRNS beadás (B2-B2") következtében csökkent a LC-beli secretagogin immunoreaktív sejtek aránya (C) és denzitása (D), amely változás párhuzamba állítható a TH tartalmú neuronok alacsonyabb számával. $p<0,05$, a Student-féle t-próba. Rövidítések: ktrl kontroll, mm milliméter, µm^2 négyzetmikrométer, scgn secretagogin, siRNS rövid interferáló ribonukleinsav, TH tirozin-hidroxiláz. Lépték: 100 µm (B1-B1", B2-B2").

5.9. A LC-beli TH foszforilációja akut stresszben

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 [221], a folyamatot az Erk1/2 katalizálja [119]. Ezt a kísérletes szituációt kívántam reprezentálni a patkányok hátsó végtagjába injektált formalinnal, eredményül pedig valóban nagyobb mértékű 31-es szerin-foszforilációt figyeltem meg a formalin beadását követő 20. percben eltávolított agyminták feldolgozása során. A TH-aktivitás rövid távú szabályozásában kiemelkedő fontosságú szerepet játszó 40-es szerin hely foszforiláltságában nem tapasztaltam szignifikáns változást. A formalin kiváltotta stressz továbbá nem befolyásolta a LC-beli secretagogin-szinteket sem, 20 és 120 perccel a beadást követő időpontokban sem találtam eltérést a kontrollhoz képest (19. ábra).



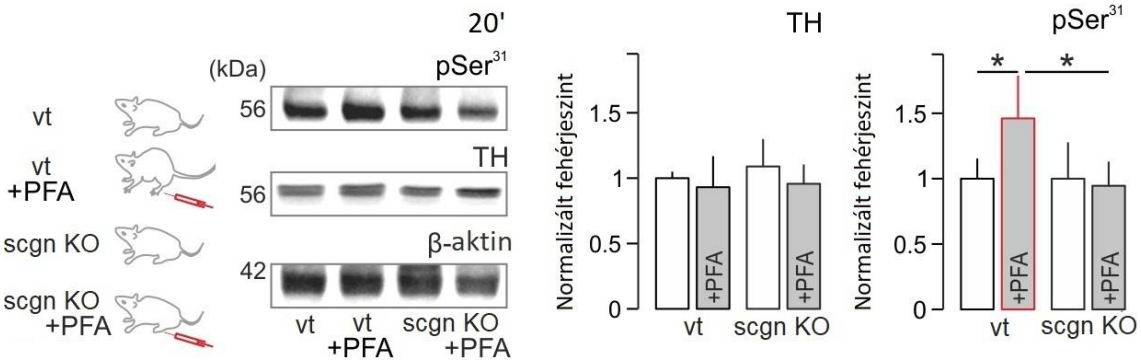
19. ábra. Formalin stressz TH foszforilációra gyakorolt hatása patkány LC-ában. Western blot

Felnőtt patkányok hátsó végtagjába injektált formalin hatására a beadást követő 20. percben a 31-es szerinen foszforilált TH szintje megemelkedik a LC-t tartalmazó micropunch technikával kinyert mintákban. Nincs szignifikáns változás a TH fehérje, a 40-es szerinreziduumon foszforilált TH, továbbá a secretagogin mennyiségeiben sem 20, sem 120 perccel a formalin beadása után. $p<0,05$, Student-féle t-próba. Rövidítések: kDa kilodalton, PFA formalin, pSer^{31} 31-es szerinen foszforilált tirozin-hidroxiláz, pSer^{40} 40-es szerinen foszforilált tirozin-hidroxiláz, scgn secretagogin, TH tirozin-hidroxiláz.

5.10. A TH foszforilációja secretagogin-függő folyamat a LC-ban

Ahhoz, hogy bizonyítsam, a TH foszforilációja a secretagogin jelenlététől függő folyamat a LC-ban, egy in vivo és egy in vitro kísérletet végeztem. Előbbi során vad típusú és secretagogin génkiütött egerek hátsó végtagjába fecskendeztem 4%-os formalint, és azt

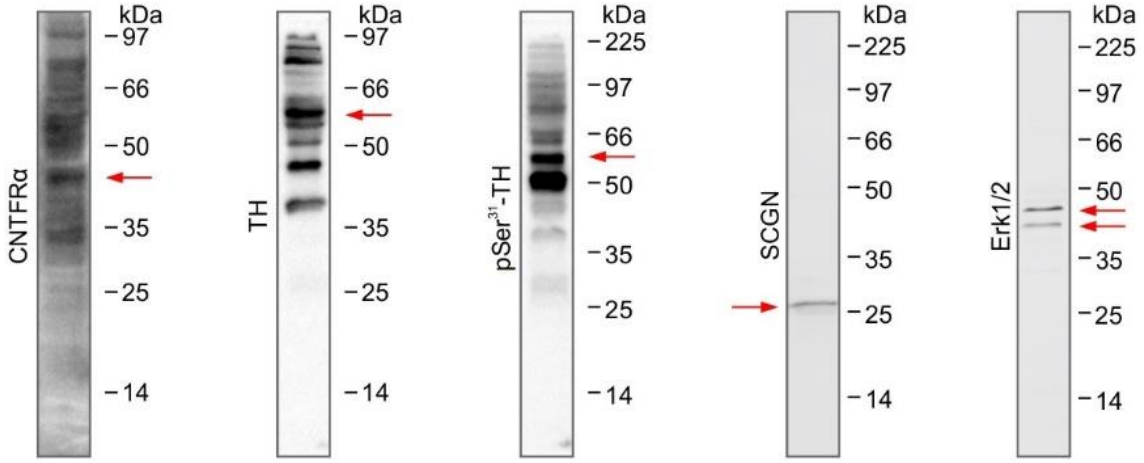
vizsgáltam, hogy a KO állat LC-ában jelentkezik-e a vad típusnál megfigyelhető különbség a 31-es szerinen foszforilált TH mennyiségében 20 perccel a formalin beadását követően. Vizsgáltam továbbá azt is, hogy a foszforilálatlan TH mennyisége miként változik. Míg a foszforilált enzim izoforma esetében azt találtam, hogy a secretagogin gén hiánya a vad típusú állat stressze kapcsán megfigyelhető fehérjeszint emelkedést megakadályozza, addig a nem foszforilált TH esetében sem a vad típusú, sem a génkiütött állatokban, sem e két csoport egyedei között nem mutatkozott szignifikáns különbség a fehérjeszintekben (20. ábra).



20. ábra. Formalin stressz TH foszforilációra gyakorolt hatása vad típusú és secretagogin génkiütött egerek LC-ában. Western blot

Vad típusú és secretagogin génkiütött felnőtt egerek hátsó végtagjába injektált formalin hatására a beadást követő 20. percben a vad típusú állat agytörzséből kinyert LC mintákban emelkedett a 31-es szerin helyen foszforilált TH szintje kontrollhoz képest, míg KO egerekben nincs szignifikáns változás a kezelt és a kontroll csoport között. Ugyancsak szignifikáns különbség mérhető a stresszelt állatcsoportok foszforilált enzimszintjei között is. A foszforilálatlan TH-szintek nem mutatnak változást. $p<0,05$, Student-féle t-próba. Rövidítések: kDa kilodalton, KO (knock-out) génkiütött, PFA formalin, pSer^{31} 31-es szerinen foszforilált tirozin-hidroxiláz, scgn secretagogin, TH tirozin-hidroxiláz, vt vad típusú állat.

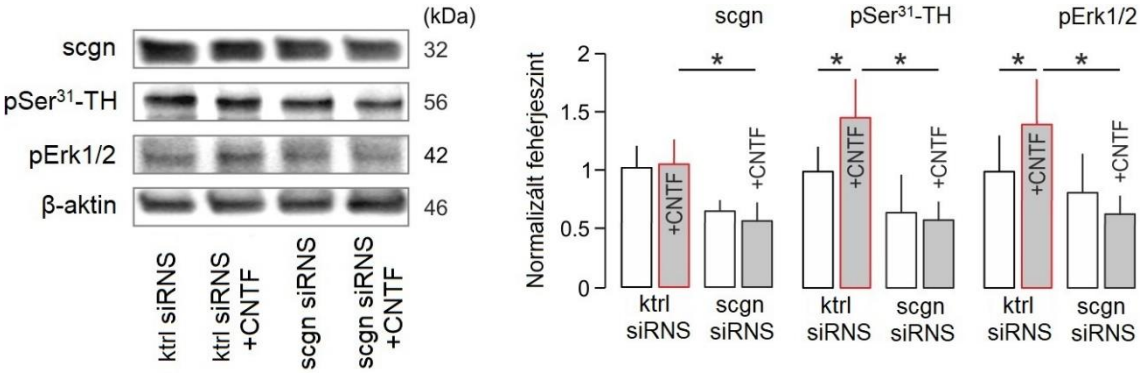
Ezen eredményeket alátámasztandó egy in vitro neurofarmakológiai kísérletet is végeztem, mely géncsendesítésből és CNTF adminisztrációjából állt. A kísérletet inzulinóma eredetű sejtkultúrámon végeztem, mivel – miként azt Western blottal magam is igazoltam – a sejtjei expresszálják mind a CNTF receptorát, mind a secretagogint, az Erk1/2-t, továbbá a foszforilálatlan és a 31-es szerinen foszforilált TH-t egyaránt (21. ábra).



21. ábra. Specifikus fehérjék kimutatása INS-1E inzulinóma sejtvonal sejtjeiben. Western blot

A begyűjtött és feldolgozott inzulinóma sejtek fehérje analízise igazolta a következő fehérjék sejtvonalbeli expresszióját (balról jobbra az ábrán a megfelelő, molekulatömegre skálázott nitrocellulóz membrán sávjaikkal): CNTF receptor alfa alegység, tirozin hidroxiláz, 31-es szerinen foszforilált tirozin-hidroxiláz, secretagogin, extrecelluláris szignál-regulált kináz 1/2. A piros nyilak az adott fehérjének megfelelő csíkra mutatnak, az Erk1/2 két csíkot adott. Rövidítések: CNTFRα ciliáris neurotrofikus faktor receptor alfa alegység, Erk1/2 extracelluláris szignál-regulált kináz 1/2, kDa kilodalton, pSer^{31} 31-es szerinen foszforilált tirozin-hidroxiláz, scgn secretagogin, TH tirozin-hidroxiláz.

A CNTF kezelés önmagában nem eredményezett secretagogin mennyiségbeli változást, 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, mely még a kontrollhoz képest is jelentős volt. A kísérlet során mértem az Erk1/2 foszforilálatlan és foszforilált formáinak sejteken belüli mennyiségét is, tekintve, hogy a TH enzim 31-es szerin reziduumának foszforilációja Erk1/2-függő folyamat [119]. Az Erk1/2 foszforilációjára nem volt hatással a secretagogin génjének csendesítése CNTF-kezelés nélkül, azonban CNTF hozzáadását követően a géncsendesítés következtében a foszforiláció csökkent (22. ábra).



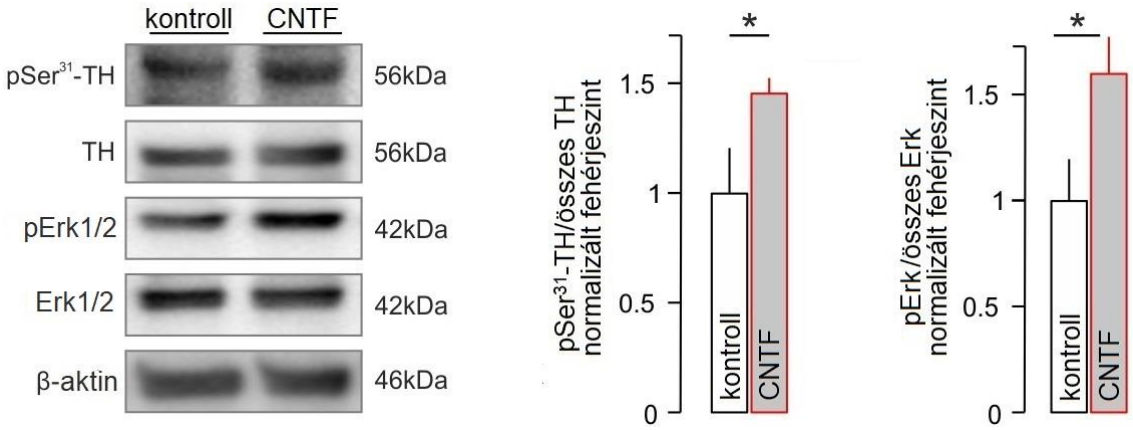
22. ábra. In vitro neurofarmakológia – géncsendesítés és CNTF kezelés INS-1E inzulinóma sejtvonalon. Western blot

CNTF kezelés hatására a 31-es szerin helyen végbemenő foszforiláció lép fel, melyet a foszforilálódva aktiválódott Erk1/2 enzim idéz elő. Ezen hatás gátolható secretagogin-géncsendesítéssel. $p<0,05$, Student-féle t-próba. Rövidítések: CNTF ciliáris neurotrofikus faktor, kDa kilodalton, ktrl kontroll, pErk1/2 foszforilált (aktivált) extracelluláris szignál-regulált kináz 1/2, pSer^{31} 31-es szerinen foszforilált tirozin-hidroxiláz, scgn secretagogin, siRNS rövid interferáló ribonukleinsav.

5.11. CNTF hatása agytörzsi szeletkultúrán Erk1/2 és TH foszforilációra

Az eddigi kísérletek alapján körvonalazódni látszott egy jelátviteli kaszkád, melyben a secretagogin az Erk1/2 közreműködésével közvetve vagy közvetlenül képes előidézni a TH 31-es szerinjének foszforilációját akut stressz során. Mivel az in vitro neurofarmakológiai kísérletben a CNTF hatékonyan emelte a foszforilált TH- és Erk1/2-szinteket, ráadásul secretagogintól függő módon, felmerült a kérdés, hogy elképzelhető-e, hogy ugyanez a faktor a központi idegrendszeren belül is szerepet játszik a LC-beli noradrenerg neuronok akut stressz során megfigyelhető TH-foszforilációjában.

Öt napos patkányok agytörzseiből készített 300 µm vastag, LC-t tartalmazó szeletek tápfolyadékához rekombináns CNTF-et adtam, 20 perccel ezt követően a mintákat homogenizáltam, majd megmértem a fehérjék mennyiségét. 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 kontrollhoz képest (23. ábra).

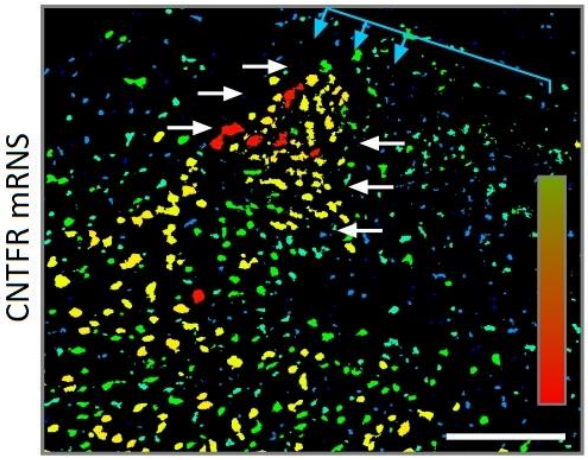


23. ábra. Rekombináns CNTF hatása ex vivo agytörzsi szeletkultúrán. Western blot

CNTF kezelés hatására a 31-es szerin helyen foszforilált TH és a foszforilált Erk enzimek szintje 20 perc elteltével megemelkedik. $p<0,05$, Student-féle t-próba. Rövidítések: CNTF ciliáris neurotrofikus faktor, Erk1/2 extracelluláris szignál regulálta kináz 1/2, kDa kilodalton, pErk1/2 foszforilált (aktivált) extracelluláris szignál regulálta kináz 1/2, pSer^{31}-TH 31-es szerinen foszforilált tirozin-hidroxiláz, TH tirozin-hidroxiláz.

5.12. A CNTF receptora megtalálható a LC-beli noradrenerg neuronokon

Rövid irodalomkutatást követően világossá vált, hogy az ex vivo kísérletben a CNTF pontosan mely sejtekre fejthette ki hatását. A nyílt forráskódú Allen Brain Atlas egyértelmű CNTF receptor mRNS jeldúsulást ábrázol egér LC-ában (24. ábra).

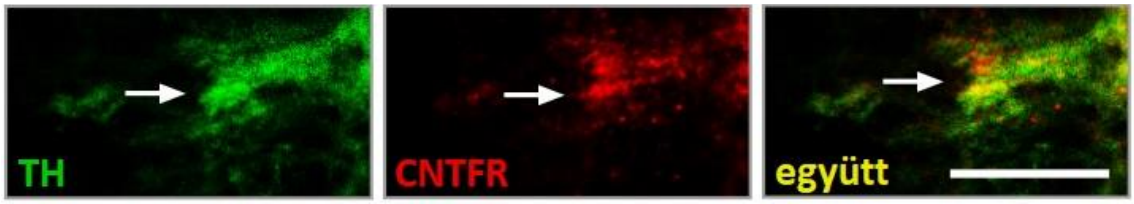


24. ábra. CNTF receptor mRNS expresszió egér LC-ban. In situ hibridizáció (forrás: [222])

A CNTF receptor mRNS expresszió színskálával kódoltan látható a LC-ban és a környező területeken. Minél magasabb egy sejt mRNS tartalma, annál inkább a spektrum vörös végéhez közeli árnyalattal ábrázolt, minél alacsonyabb, annál kékebb színnel jelölt. A

fehér nyilak a LC határaira mutatnak, az ependimával borított kamrai felszín kék vonallal, a LC egyes sejtjei és az ependima közötti lehetséges kontaktpontok pedig kék nyilakkal vannak jelölve. Rövidítések: CNTFR ciliáris neurotrofikus faktor receptor, mRNS hírvivő ribonukleinsav. Lépték: 100 µm.

Ezt az irodalmi adatot egy kettős jelölést alkalmazó immunohisztokémiai kísérlet segítségével még annyiban sikerült kiegészítenem, hogy a CNTF receptorát elsősorban TH tartalmú neuronok expresszálják e magban, kamrai felszínig kinyúló dendritjeik koexpresszálják a két fehérjét (25. ábra).

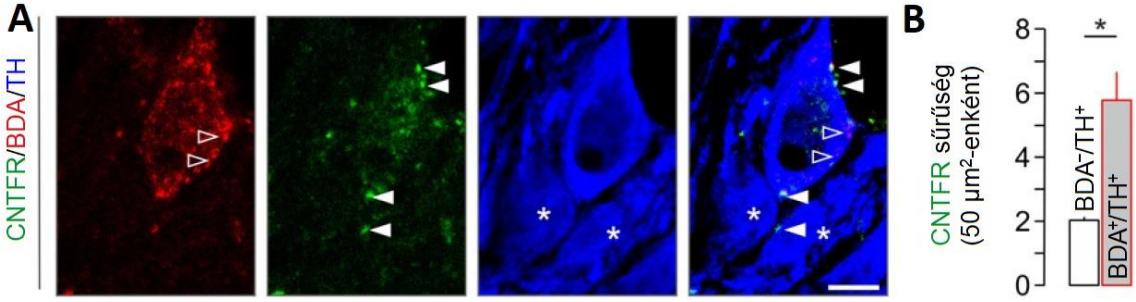


25. ábra. TH és CNTF receptor fehérjék kolokalizációja egy kamraközeli LC sejt nyúlványában. Immunohisztokémia

Az ábrán a TH és a CNTFR átfedő, sejtnyúlványon belüli eloszlása látható. A fehér nyíl az agykamrai felszínre mutat. Rövidítések: CNTFR ciliáris neurotrofikus faktor receptor, TH tirozin-hidroxiláz. Lépték: 10 µm.

5.13. A CNTF receptora elsősorban a mPFC-re vetülő LC neuronokon van jelen

A LC-beli neuronok felelősek a nagyagykéreg diffúz noradrenerg beidegzéséért, ezen belül a prefrontális kéregre kifejezetten gazdag rostozattal vetülnek [50]. Biotinilált dextránamin (BDA) pályajelölő anyag befecskendezésével megvizsgáltam, hogy a mPFC 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 (26. ábra).

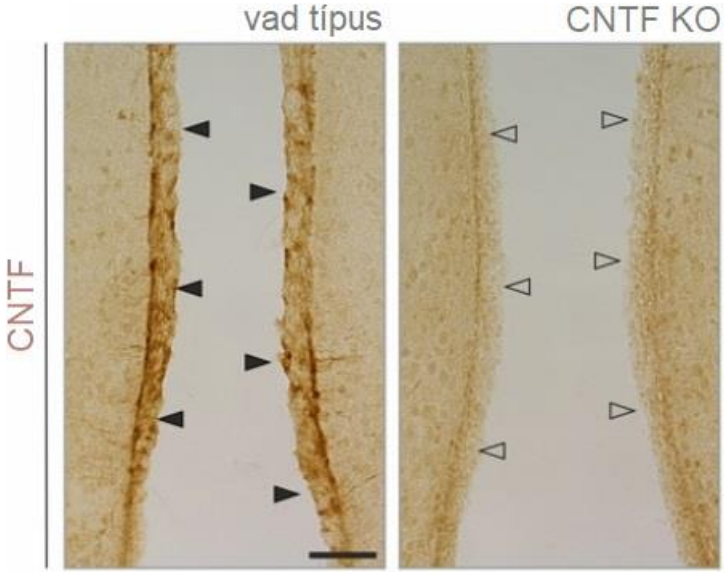


26. ábra. mPFC-be vetülő LC neuronok TH és CNTFR expressziója patkányban. Hármas jelölés, immunohisztokémia

Az A ábrarészen konfokális lézer szkenning mikroszkópos felvételen látható, hogy egy mediális prefrontális kéregből BDA-val retrográdan jelölt LC-beli TH pozitív sejt több CNTFR-immunoreaktív jelet hordoz testének felszínén, mint a pályakövető anyagot nem tartalmazó TH immunoreaktív neuronok. A fehér nyílhegyek periszomatikus CNTF receptorokra, az üres nyílhegyek BDA akkumulációs helyekre mutatnak, a csillagok pedig BDA negatív/TH pozitív sejteket jelölnek. A B ábrarész egy kvantitatív analízis nyomán készült oszlopdiagram, mely a BDA-val jelölődött és a BDA-val nem jelölődött noradrenerg neuronok sejtfelszíni CNTFR sűrűségét mutatja be. $p<0,05$, Student-féle t-próba. Rövidítések: BDA biotinilált dextránamin, CNTFR ciliáris neurotrofikus faktor receptor, TH tirozin-hidroxiláz. Lépték: 7 µm.

5.14. A CNTF fehérje és mRNS megtalálható a III. kamramenti ependimális rétegben

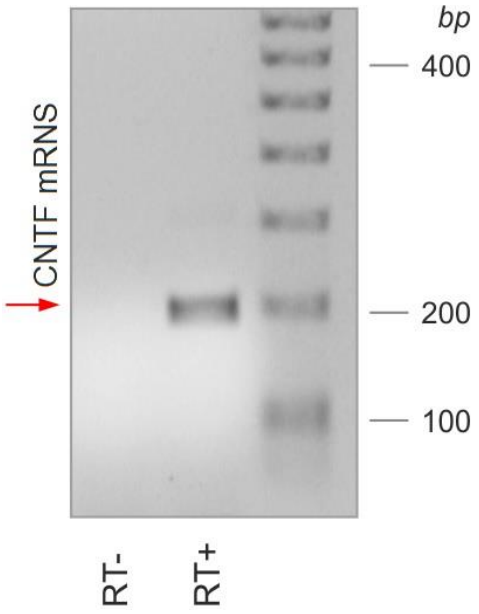
A következőkben a LC-neuronokon található receptorokhoz kötődni képes CNTF forrásául szolgáló agyterületeket kívántam felderíteni. Egyszeres immunfestéssel magát a fehérjét (27. ábra), kvalitatív PCR technikával pedig a CNTF mRNS-ét azonosítottam a III. agykamrát határoló felületes sejtrétegben (28. ábra).



27. ábra. CNTF fehérje a III. kamramenti felületes sejtrétegben. Immunohisztokémia

Az ábrán egy vad típusú és egy CNTF génkiütött egér III. agykamrája mentén két oldalt elhelyezkedő köztiagyi terület látható egyszeres immunohisztokémiával,

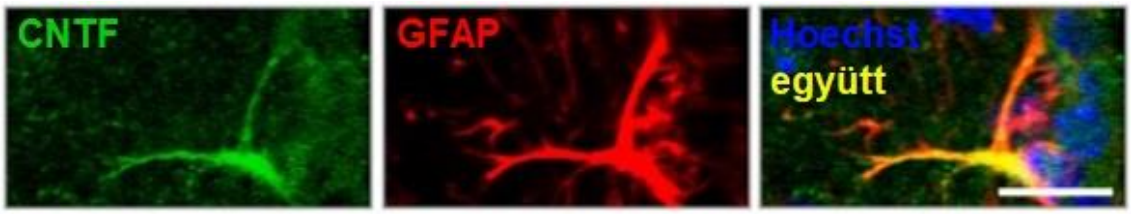
fénymikroszkópos felvételen. A vad típusú állatban a kamra üregét határoló felületes sejtréteg immunopozitív, a CNTF-et a fekete nyílhegyekkel jelölt sejtek tartalmazzák. Kontrollként CNTF génkiütött transzgenikus egéren is elvégeztem a festést, amelyben ugyanezen sejtek immunonegatívnak bizonyultak (üres nyílhegyek). Rövidítések: CNTF ciliáris neurotrofikus faktor, KO (knock-out) génkiütött. Lépték: 120 µm.



28. ábra. A III. kamramenti felületes sejtréteg CNTF mRNS tartalmának kimutatása kvalitatív PCR segítségével.

Az ábrán balról jobbra a reverz transzkripción át nem esett, majd a reverz transzkripción átesett minta sávja, végül pedig egy hozzávetőleges molekulaméret (bázispár) meghatározásra alkalmas cDNS standard sávja látható. Rövidítések: bp bázispár, CNTF ciliáris neurotrofikus faktor, mRNS hírvivő ribonukleinsav, RT reverz transzkriptáz.

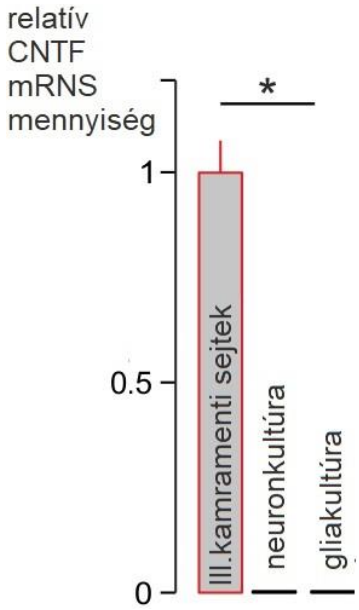
Egy további, Hoechst-magfestéssel kiegészített CNTF/GFAP kettős immunohisztokémiai reakció alapján a szóban forgó III. kamramenti sejtréteg a felületes ependimális sejtrétegnek bizonyult (29. ábra).



29. ábra. CNTF és GFAP fehérjék kolokalizációja egy III. kamramenti sejtben. Magfestéssel kiegészített kettős immunohisztokémia

Az ábrán a CNTF és a GFAP nagyban átfedő sejten belüli eloszlása figyelhető meg. Hoechst 33342 magfestéssel a sejtmagok láthatók. Rövidítések: CNTF ciliáris neurotrofikus faktor, GFAP gliális fibrilláris acidikus protein. Lépték: 5 µm.

Mivel a III. kamramenti agymintákkal párhuzamosan IV. kamramenti, LC-t egészében tartalmazó szövetblokkból készített neuron- és gliakultúrák CNTF mRNS-tartalmát is vizsgáltam, és ezekben nem volt jelen a keresett ribonukleinsav (30. ábra), ez alapján kizárhatóvá vált, hogy a CNTF lokálisan felszabadulva hatna a receptorral bíró LC sejtekre.



30. ábra. CNTF mRNS-tartalom a III. kamramenti felületes sejtrétegben, valamint a IV. kamramenti, LC-t tartalmazó mintából tenyésztett neuron-, illetve gliakultúrában. Valós idejű, kvantitatív PCR

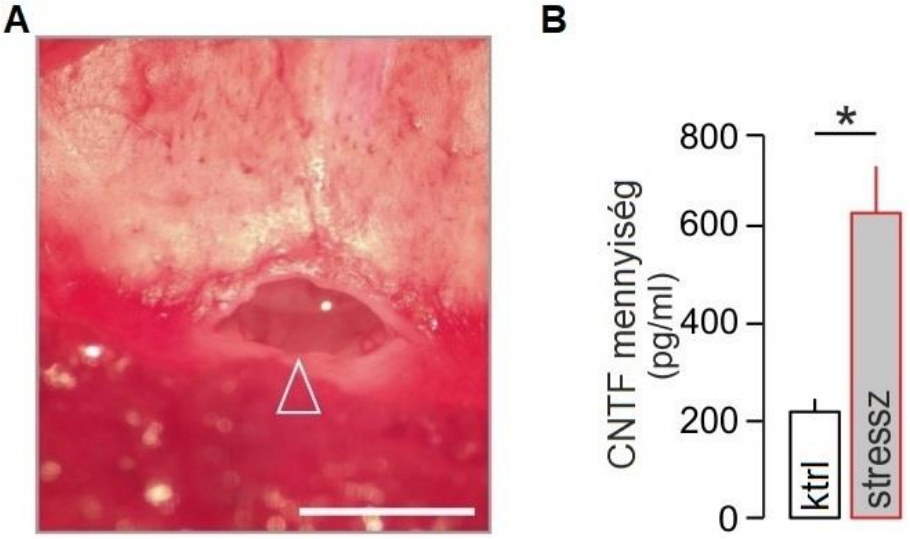
A diagramon a III. kamrát határoló felületes sejtréteg, egy agytörzsi neuron- és egy gliakultúra sejtjeinek relatív mRNS-tartalmát reprezentáló oszlopok láthatók. Míg a III. kamramenti sejtekben előfordul a szóban forgó ribonukleinsav, a sejtkultúrák nem tartalmazzák azt. $p<0,05$, Student-féle t-próba. Rövidítések: CNTF ciliáris neurotrofikus faktor, mRNS hírvivő ribonukleinsav.

5.15. Akut stressz során a liquor CNTF-szintje emelkedik

A III. kamra magasságában az ependimális réteg sejtjeiből felszabaduló CNTF az agyvízen keresztül képes eljutni a IV. kamráig, ahol kötődhet a LC-beli neuronokon levő

receptoraihoz. Munkám során arra kívántam fényt deríteni, vajon a központi idegrendszeri akut stresszválasz részeként megváltozik-e a CNTF fehérje mennyisége az agyvízben, mely szignál értékkel bírhat a rendszer elemei közötti kommunikációban.

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 mintáiban a kontrollokban levő CNTF-szinthez képest megközelítőleg háromszoros értéket mértem (31. ábra).



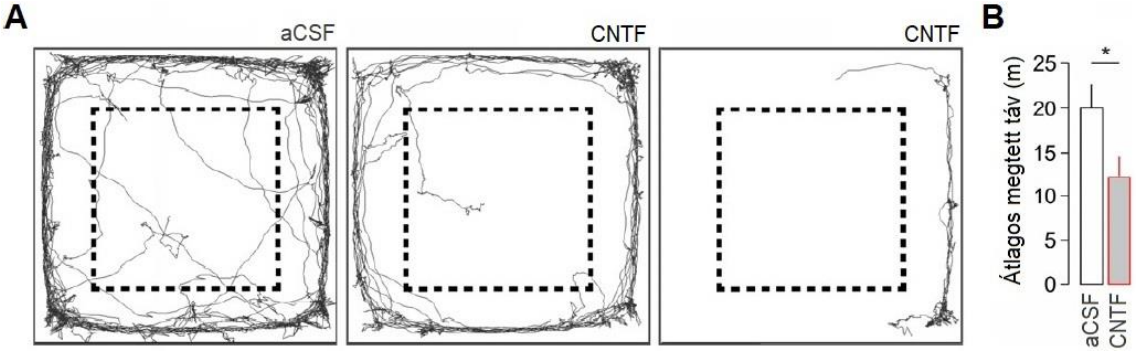
31. ábra. CNTF koncentráció meghatározása IV. kamrából kinyert liquormintákban. ELISA

Az A ábrarészen egy intraoperatív felvétel látható, melyen a membrana atlantooccipitalis harántmetszésével feltárt cisterna magna (üres nyílhegy), illetve mélyebben a nyúltvelő és a kisagy ábrázolódik. A B ábrarészen az ELISA fehérje analízis eredményét bemutató oszlopdiagram látható, melyen szignifikáns, közel háromszoros CNTF koncentrációbeli különbség figyelhető meg a kontroll és a kezelt csoport értékei között. $p<0,05$, Student-féle t-próba. Rövidítések: CNTF ciliáris neurotrofikus faktor, ktrl kontroll, ml milliliter, pg pikogramm. Lépték: 2 mm.

5.16. CNTF intracerebroventrikuláris adminisztrációjának hatásai

További kísérletekkel bizonyítottam, hogy a CNTF akut stresszben történő megemelkedése az agyvízben élettanilag jelentős folyamat. Viselkedésbiológiai kísérletet terveztem, melyben egy tartós kanülön aCSF-ben feloldott rekombináns CNTF-et

infundáltam 10 egér agykamrarendszerébe, majd 60 perc elteltével nyílt aréna (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 kezeltek mozgásszegényebbek lettek, valamint elsősorban a mező perifériásabb részein, a doboz falaihoz közel tartózkodtak, mely megfelel egy akut stressznek kitett állat viselkedésének (32. ábra).

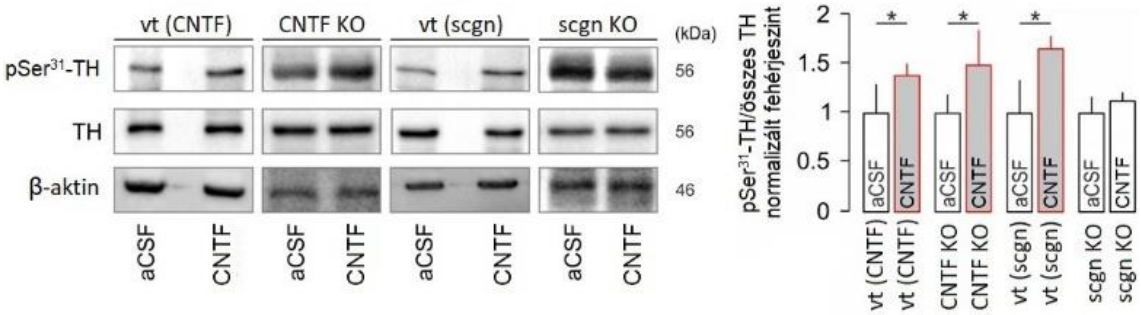


32. ábra. CNTF intracerebroventrikuláris adminisztrációjának hatása. Nyílt aréna teszt

Az A ábrarészen három kísérleti állat által bejárt útvonalat rajzoltunk le vékony vonallal. A szaggatott vonalas kontúrú négyzetek a dobozon belül kijelölt centrum-periféria határt jelölik. A kontroll csoportot képviselő állat jóval nagyobb távolságot tett meg a vizsgálati időtartam alatt, és a mező centrumában is többször megfordult. Ezzel szemben a CNTF-fel kezelt állatok rövidebb távot tettek meg, jellemzően szorosan a falhoz tapadva közlekedtek. A B ábrarész az állatok által átlagosan megtett távolságok méterben kifejezett értékeit mutatja be, jelentős különbséget mértünk a két kísérleti csoport között. $p<0,05$, Student-féle t-próba. Rövidítések: aCSF arteficiális cerebrospinális folyadék, CNTF ciliáris neurotrofikus faktor, m méter.

A viselkedéstesztet követően az állatok agyvelőit eltávolítottam, és további 20 hasonló intracerebroventrikuláris infúziós kezelésen átesett egér agyával együtt Western blot fehérje analízisre bocsátottam, hogy megmérjem a LC-beli TH enzimek mennyiségét. A további 20 állat 10 secretagogin génkiütött és 10 CNTF génkiütött egyed volt, melyek fele ismét csak aCSF-et, másik fele aCSF-ben feloldott CNTF-et kapott tartós kanüljén keresztül. Mivel a viselkedésteszten átesett vad típusú állatok szintén két csoportra voltak oszthatók az alapján, hogy a secretagogin vagy a CNTF génkiütött állatokkal közös törzsből származtak-e, a minták futtatatását és a kapott értékek grafikus megjelenítését

ennek megfelelően végeztem el (33. ábra). A CNTF-et kapott vad típusú állatok agytörzsi mintái, függetlenül attól, hogy melyik törzsből származtak, 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 secretagogin génkiütött állatokban ez a hatás elmaradt, mely utóbbi összhangban áll az inzulinóma sejtvonalon végzett in vitro neurofarmakológiai kísérletemnél tapasztaltakkal.

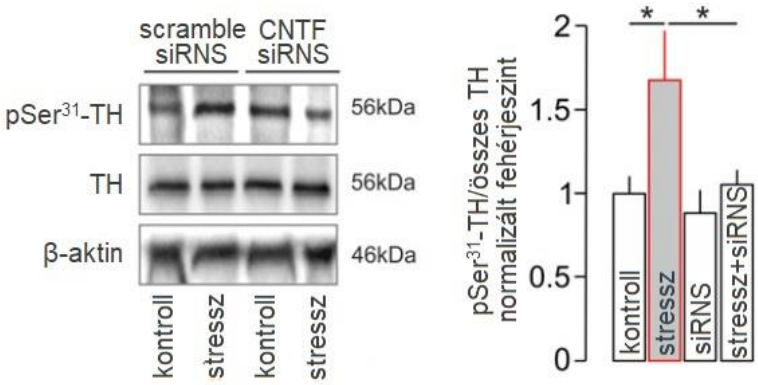


33. ábra. CNTF intracerebroventrikuláris adminisztrációjának hatása. Western blot

CNTF agykamrába történő beadása 70 perc elteltével szignifikáns mértékben emeli a 31-es szerinen foszforilált TH-szintjét vad típusú, valamint CNTF génkiütött egerek LC-ában. Secretagogin génkiütött állatokban ez a hatás elmarad. $p<0,05$, Student-féle t-próba. Rövidítések: aCSF arteficiális cerebrospinális folyadék, CNTF ciliáris neurotrofikus faktor, kDa kilodalton, KO (knock-out) génkiütött, pSer^{31}-TH 31-es szerinen foszforilált tirozin-hidroxiláz, scgn secretagogin, TH tirozin-hidroxiláz, vt vad típus.

5.17. In vivo CNTF géncsendesítés hatása a TH foszforilációjára akut stresszben

A CNTF jelátvitel szerepét akut stresszben még egy további kísérlettel igazoltam. Ennek során 8-8 patkány oldalkamrájába injektáltam CNTF vagy kontrollként randomizált szekvenciájú (scramble) siRNS-t, majd 96 óra elteltével az állatok közül csoportonként 4-et formalin stressznek tettem ki. A 60 perc után begyűjtött agyminták LC-t tartalmazó részein Western blot fehérje analízist végeztem, melynek eredményét a 34. ábra mutatja. Míg a nem interferáló RNS-t kapott állatokban a formalin stressz hatása az igazolt módon érvényesült, a CNTF siRNS beadása megakadályozta a TH 31-es szerinjének foszforilációját.

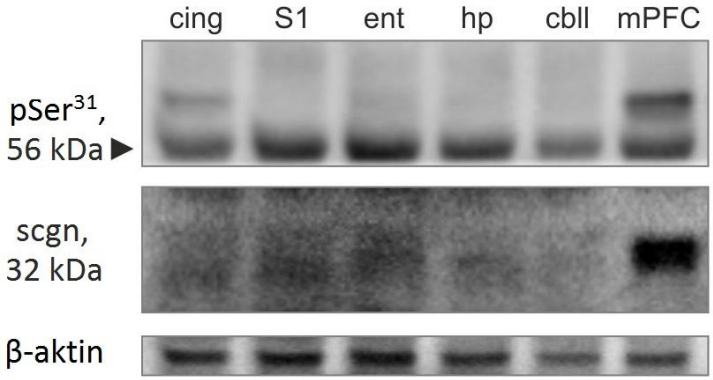


34. ábra. Intracerebroventrikuláris CNTF siRNS hatása akut stresszben. Western blot

CNTF siRNS agykamrába történő beadását követően formalin injekció hatására nem következik be a tirozin-hidroxiláz 31-es szerinjének foszforilációja. $p<0,05$, Student-féle t-próba. Rövidítések: CNTF ciliáris neurotrofikus faktor, kDa kilodalton, pSer^{31}-TH 31-es szerinen foszforilált tirozin-hidroxiláz, siRNS rövid interferáló ribonukleinsav, TH tirozin-hidroxiláz.

5.18. A prefrontális kérgi secretagogint és TH-t koexpresszáló rostok LC eredetűek

A LC-ból kiinduló felszálló rostok a mediális előagyi köteghez csatlakozva érik el a köztiagy és a nagyagy számos régióját [50]. 3 felnőtt hím patkány agyát fehérje analízis segítségével vizsgálva kimutattam a secretagogin és a 31-es szerinen foszforilált TH jelenlétét többek között az entorhinális kéregben, a primer szomatoszenzoros kéregben, a gyrus cinguliban, a hippokampuszban, a kisagyban, továbbá a mPFC-ben (35. ábra). A mPFC-ben a secretagogin expresszió különösen magas volt.

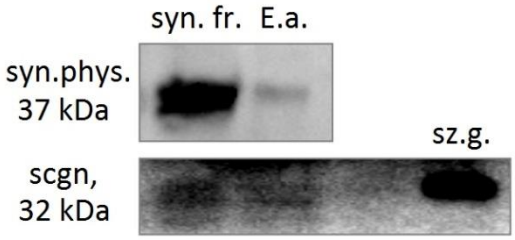


35. ábra. Nagyagykérgi területek fehérje analízise

A Western blot eredményén látható, hogy a vizsgált kéregrészekben mind jelen van a secretagogin és a 31-es szerinen foszforilált TH fehérje, a mediális prefrontális kéregben kiemelkedően nagy mennyiségben. Rövidítések: cbll cerebellum, cing gyrus cinguli, ent

entorhinalis cortex, hp hippocampus, kDa kilodalton, mPFC mediális prefrontális kéreg, pSer[31] 31-es szerinen foszforilált tirozin-hidroxiláz, S1 primer szomatoszenzoros kéreg, scgn secretagogin.

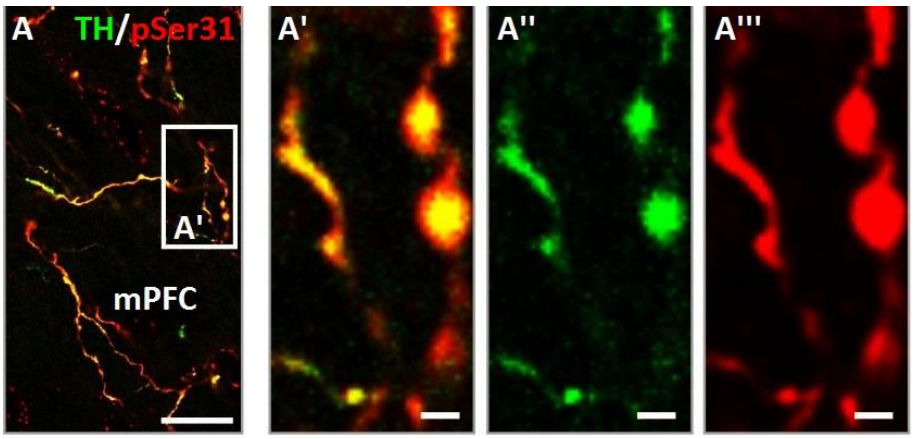
Ugyanezen állatokból nyert minták szinaptoszóma preparálásával bizonyítottam, hogy a secretagogin fehérje főként a szinapszisokban dúsul a mPFC állományán belül (36. ábra).



36. ábra. Szinaptoszóma-frakció fehérje analízise. Western blot

A mediális prefrontális kéreg állományából homogenizált mintán végzett Western blot vizsgálat segítségével sikerült kimutatnom, hogy a vizsgált kéregrészben jelen levő secretagogin szinapszisokban található. Az intenzív szinaptofizin-jel a szinaptoszóma preparálás sikerességét igazolja, a szaglógumót a secretagogin fehérje expresszió pozitív kontrolljaként alkalmaztam. Rövidítések: E.a. egész agykéregrész homogenizátum, scgn secretagogin, syn. fr. szinaptoszóma-frakció, syn.phys. szinaptofizin, sz.g. szaglógumó.

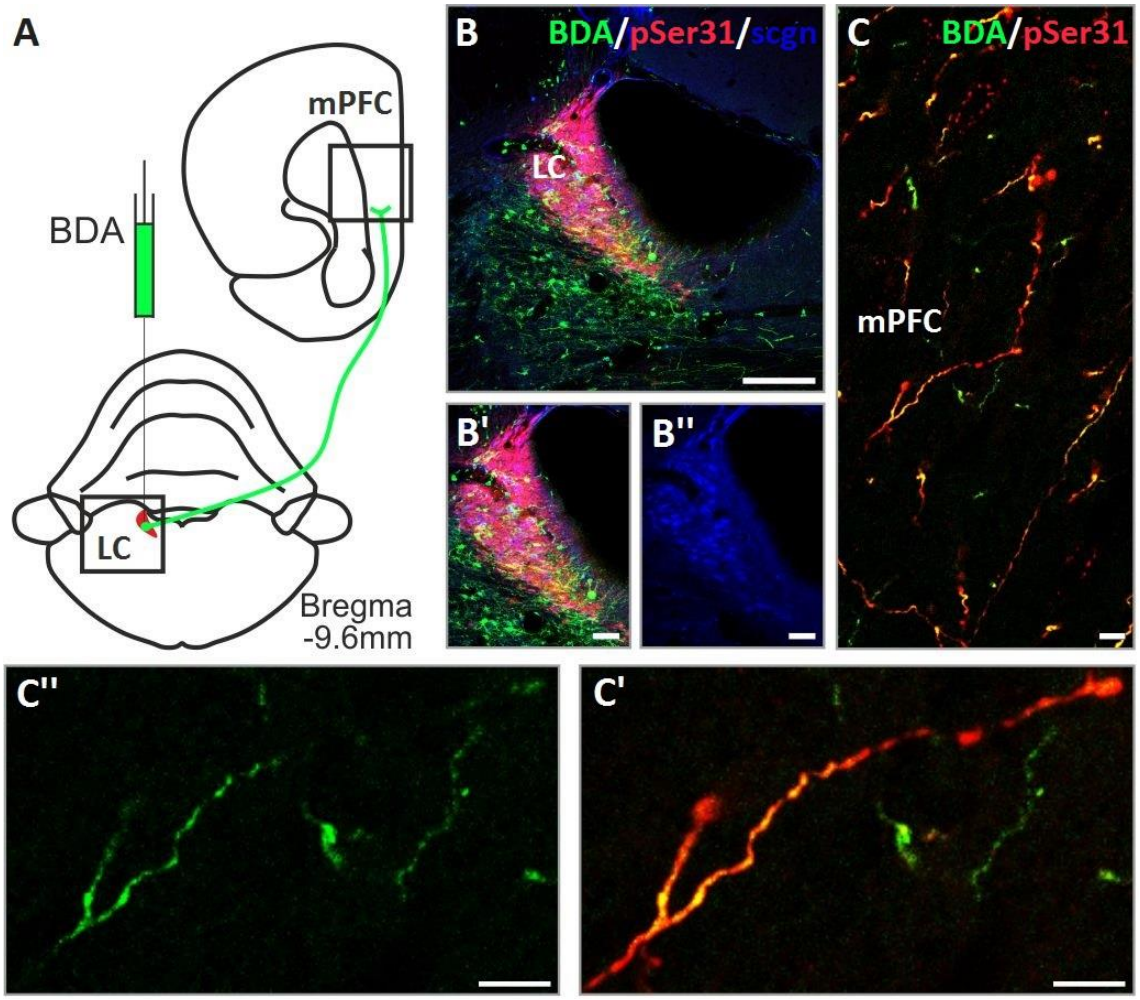
További 3 felnőtt hím patkányon végzett immunohisztokémiai módszerrel, kettős jelöléssel jelenítettem meg a mPFC-n belül TH-t és 31-es szerinen foszforilált TH-t tartalmazó rostokat és boutonokat. Számos helyen bukkantam a két fehérje együttes előfordulására (37. ábra).



37. ábra. TH és 31-es szerinen foszforilált TH expressziója axonokon belül a mPFC-ben. Immunohisztokémia

A két fehérje legtöbbször együtt fordul elő a rostokon belül, illetve a szinapszisok közelében. Rövidítések: mPFC mediális prefrontális kéreg, pSer[31] 31-es szerinen foszforilált tirozin-hidroxiláz, TH tirozin-hidroxiláz. Lépték: 20 µm (A), 2 µm (A'-A'').

A LC-nak 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 (38. ábra).

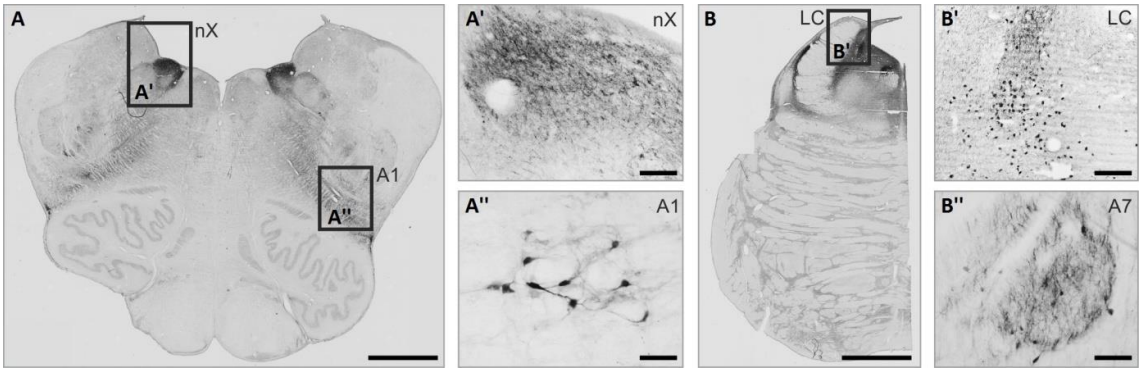


38. ábra. A mPFC-ben végződő LC eredetű rostok 31-es szerinen foszforilált TH-t tartalmaznak. Immunohisztokémia

A BDA injekció és az anterográd pályakövetés elve vázlatos rajzon (A). A LC területére bejuttatott pályakövető anyag a konfokális lézer szkenning mikroszkóppal készített képeken a beadás helyének megfelelő lokalizációban (B, B'), illetve a mediális prefrontális kérgi rostokban (C-C''). Rövidítések: BDA biotinilált dextránamin, LC locus coeruleus, mm milliméter, mPFC mediális prefrontális kéreg, pSer^{31} 31-es szerinen foszforilált tirozin-hidroxiláz, scgn secretagogin. Lépték: 200 µm (B), 40 µm (B', B''), 5 µm (C, C', C'').

5.19. A secretagogin fehérje eloszlása humán agytörzsben

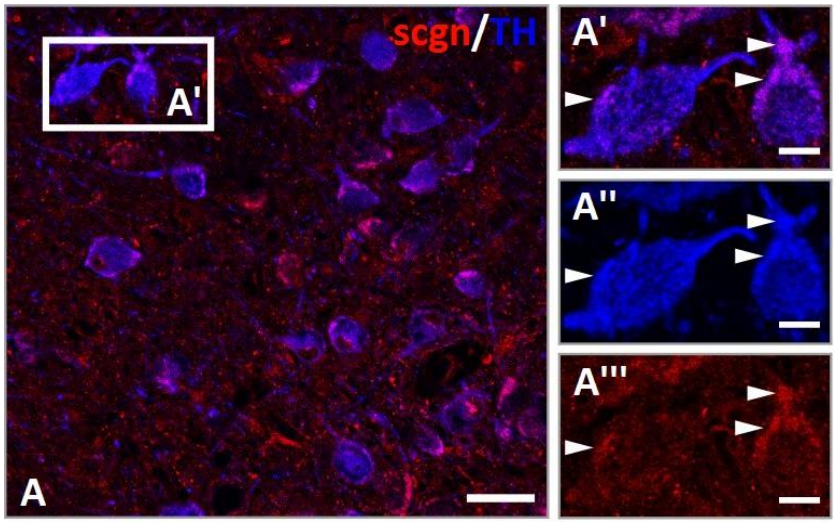
Vizsgálataim egy részét humán mintákra is kiterjesztettem. A perfúzióval fixált mintákból készített metszeteken immunohisztokémiai eljárással tettem láthatóvá a secretagogin tartalmú sejteket. A patkányban és egérben megfigyelthez hasonlóan emberben is secretagogin pozitívnak bizonyultak a noradrenerg agytörzsi sejtcsoportoknak imponáló területek, így az A1, az A6, azaz a LC, illetve az A7. Mindezek mellett a humán agytörzs további régióiban is tömörültek secretagogin tartalmú neuronok, rágcsálók agytörzsében találtakkal hasonló eloszlásban, például a nucleus dorsalis nervi vagiban (39. ábra).



39. ábra. Secretagogin expresszió az ember agytörzsében. Immunohisztokémia

Secretagogin-immunoreaktív neuronok a nyúltvelőben (A), a nyúltvelőbeli nucleus dorsalis nervi vagi-ban (A'), illetve az A1-nek megfelelő területen (A''). A hídbeli secretagogin tartalmú sejtek a LC területén csoportosulnak (B, B'). Secretagogin-immunoreaktív neuronok az A7 területén(B''). Rövidítések: A1, A7 noradrenerg sejtcsoportok, LC locus coeruleus, nX nucleus dorsalis nervi vagi. Lépték: 500 µm (A, B), 60 µm (A', B', B''), 25 µm (A'').

Ember LC-ában secretagogin expressziót TH-immunoreaktív sejtekben találtam. A secretagogin jelenlétére utaló immunjelet jellemzően a sejttestek perifériás részein, valamint a nyúlványokban azonosítottam (40. ábra).

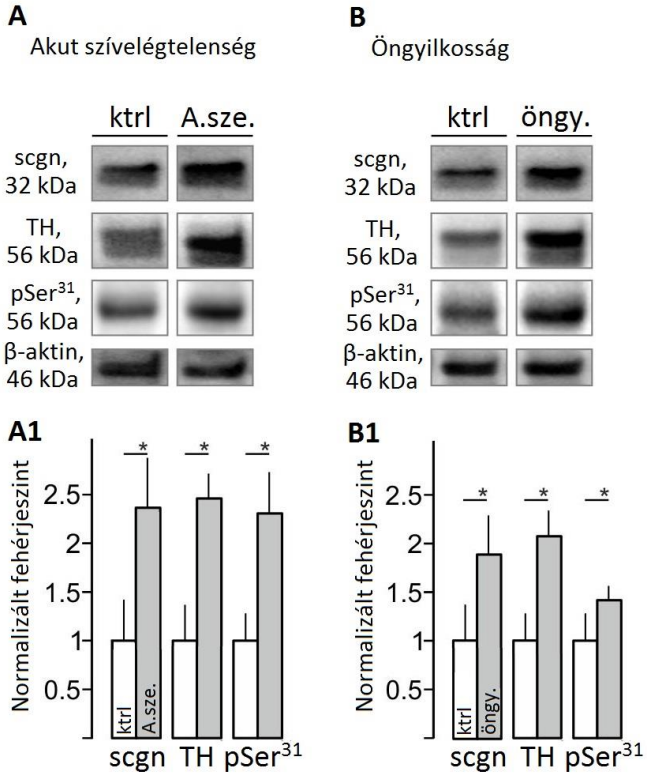


40. ábra. Secretagogin és TH expresszió humán LC-ban. Immunohisztokémia

A LC TH tartalmú neuronjai secretagogint expresszálnak. A secretagogin-jel a sejtmembrán mentén és a nyúlványok kilépési pontjainál intenzívebb (nyílhegyek az A'-A''' ábrákon). Rövidítések: scgn secretagogin, TH tirozin-hidroxiláz. Lépték: 25 µm (A), 1 µm (A'-A''').

5.20. Mennyiség és foszforiláció vizsgálata akut stresszben, humán mintákon

Emberi mintákon az agytörzsi secretagogin tartalmú idegsejtek hasonló eloszlást mutattak, mint patkányban és egérben, ezért feltételeztem, hogy akut stresszhatás emberben is változásokat indíthat el a LC-beli noradrenerg neuronokban. Kísérleteim egy részéhez akut szívelégtelenségben elhunyt személyek LC punch mintáit használtam, mivel e kórkép a halál beállta előtt erős fájdalommal, egyúttal akut stresszállapottal jár. A vizsgálati anyagban a secretagogin mennyisége kétszeresére nőtt a TH és a 31-es szerinen foszforilált TH szintjeinek emelkedése mellett (41. ábra A része). Ehhez hasonló eredményeket kaptam kísérleteim másik részében, ahol öngyilkosságot elkövetett személyek agytörzseiből származó LC punch mintákat dolgoztam fel (41. ábra B része). Megemelkedett secretagogin-, TH- és 31-es szerinen foszforilált TH-szinteket mértem, amely valószínűleg annak tudható be, hogy az öngyilkos cselekedet elkövetése előtt a személy erős stresszhelyzetben van.



41. ábra. Secretagogin és TH expresszió, valamint utóbbi foszforilációjának vizsgálata akut stresszhelyzetekben humán mintákon. Western blot

A LC-beli secretagogin- és TH-szintek megemelkedtek akut szívelégtelenségben elhunytakból származó micropunch technikával kinyert mintákban (A, A1). A LC-beli secretagogin- és TH-szintek megemelkedtek öngyilkosságot elkövetett egyedekből származó mintákban (B, B1). Rövidítések: A.sze. akut szívelégtelenség, ktrl kontroll, kDa kilodalton, öngy. öngyilkos, pSer^{31} 31-es szerinen foszforilált tirozin-hidroxiláz, scgn secretagogin, TH tirozin, hidroxiláz.

6. Megbeszélés

6.1. A secretagogin az emlős agytörzsében relémagokban, vegetatív és stressz központokban fordul elő

Az agytörzsön belül különböző funkciójú magokban találtam secretagogin tartalmú sejteket, csakúgy mint autonóm regulatorikus körök szabályozóközpontjaiban (nucleus parabrachialis, nucleus tractus solitarii, nucleus dorsalis nervi vagi), érzékszervi érzőpályák kapcsolóállomásaiban (vesztibuláris és vizuális rendszerek egyes elemei), illetve a noradrenerg mezők magjaiban. A különböző fajokból származó metszeteket vizsgálva az is egyértelművé vált, hogy a secretagogin eloszlási mintázata a törzsfejlődés során – így házicsirkében (kutatócsoportunk egy másik tagjának saját eredményei [223]), rágcsálókban és az emberben is igen nagymértékben konzerválódott.

Mindezek fényében megállapíthatjuk, hogy a secretagogin, más kalciumkötő fehérjékhez hasonlóan [17, 224, 225], egy jól használható neurokémiai markere lehet a jövőben az őt expresszáló agytörzsi sejtcsoportoknak.

Az agytörzsi monoaminerg rendszerek szerotoninerg, valamint dopaminerg magjaiban nem azonosítottam secretagogin jelet, melyek közül az utóbbi különösen figyelemre méltó, ugyanis csakúgy egy katekolaminerg sejtpopuláció, mint a noradrenerg sejtcsoportok együttese, melynek viszont szinte valamennyi eleme tartalmazta a fehérjét, mi több a noradrenalin bioszintézis sebesség-meghatározó lépését katalizáló TH-t tartalmazó neuronjaikban. A két fehérje kolokalizációja oly nagyfokúnak és a TH tartalmú noradrenerg sejtek minden alcsoportjára vonatkozóan olyannyira általános érvényűnek bizonyult, hogy a figyelmünket erőteljesen magára vonta, és a további kísérleteinkben a secretagogin egy esetleges TH-ra gyakorolt szabályozó szerepének felderítését tűztük ki célul.

6.2. A secretagogin befolyásolja a TH expresszióját és foszforilációját noradrenerg LC sejtekben

Egy reakciósor sebesség-meghatározó lépése mindig a leglassabb részfolyamatot jelenti, hiszen az azt megelőző lépések termékei hiába állnak rendelkezésre, ha nem tudnak továbbalakulni, az egyensúlyi reakciók szabályai értelmében egyszerűen visszaalakulnak prekurzoraikká [226]. A sebesség-meghatározó lépés tehát a legkritikusabb pontja, a

legszűkebb keresztmetszete egy bioszintetikus folyamatnak, értelemszerű tehát, hogy az ezt katalizáló enzim mennyiségén és aktivitásán keresztül lehet a leghatékonyabban befolyásolni a végtermék keletkezésének ütemét.

A TH, mint arra a bevezetőben is utaltam, a katekolamin szintézis sebesség-meghatározó enzimjeként igen sokrétűen szabályozott, mind gén, mind átirat, mind fehérje szinten. E feladatokat gyakran különböző kalcium szenzor fehérjék koordinálják [94].

A secretagogin és a TH kapcsolatát először úgynevezett „loss of function" kísérletekben vizsgáltam, melyek során a secretagogin mRNS-éhez képest komplementer bázissorrendű oligonukleotidokat juttattam TH tartalmú neuronokba. Ezzel a SCGN gén csendesítését értem el, melynek révén sikeresen mutattam meg, hogy csökkent secretagogin mennyiség mellett, 72 óra elteltével a TH mennyisége is csökkenést mutat. A secretagogin tehát egyike azoknak az intracelluláris szabályozó fehérjéknek, melyek a nyugalmi TH expresszió biztosításáért felelősek. Mi történik azonban, ha kibillentjük a rendszert az egyensúlyi helyzetből?

Az agytörzsi noradrenerg rendszer egyik legfőbb funkciója az akut stresszválasz során a gyors adaptáció feltételeinek megteremtése. Az ehhez szükséges enzimaktivitást növelő változásoknak a fehérje szinten rendelkezésre álló TH molekulákon kell végbemenniük. A különböző szerin reziduumok – főként a 40-es és a 31-es pozícióban levők – foszforilációi protein kinázok által épp ilyen módosulásai a TH enzimnek [94, 104], melyek közül fájdalomstresszel a 31-es szerin foszforilációját magam is kimutattam LC mintákon, ezzel igazolva a korábbi szakirodalmi adatokat. Hasonlóképp ismert volt már munkámat megelőzően az is, hogy ezt a foszforilációt az Erk1/2 enzim végzi [119, 127], mely egy korábbi tömegspektrometriai adatsorban már szerepelt, mint a secretagogin lehetséges interaktív partnere, saját eredményem viszont, hogy ezt az enzimet a secretagogin interaktómájában is sikerült azonosítanom.

Ebben a témában azonban a legfontosabb eredményeket akkor értem el, amikor ötvöztem a két fent vázolt kísérletes szituációt: in vivo és in vitro körülmények között egyaránt vizsgáltam, mi történik, ha a TH aktivitásának fokozódására van szükség, a secretagogin fehérje azonban nem, vagy csak korlátozott mértékben áll rendelkezésre. In vivo secretagogin génkiütött állatokat kezeltem intramuszkuláris formalin injekcióval, in vitro pedig inzulinóma sejteket kezeltem először secretagogin siRNS-sel, majd CNTF-fel, mely utóbbiról a szakirodalomban fellelhető információkra támaszkodva tudtam, hogy

képes specifikusan a TH 31-es szerinjének foszforilációját előidézni [118, 149]. Eredményeim mindkét esetben egyértelműen rámutattak a secretagogin nélkülözhetetlen szerepére. Körvonalazódni látszódott tehát egy akut stressz során aktiválódó jelátviteli kaszkád, melynek in vitro, inzulinóma sejtekben négy, in vivo három elemére derítettem fényt.

6.3. Akut stressz során a III. kamramenti ependimális réteg sejtjeiből felszabaduló CNTF liquor mediálta volumen transzmisszióval jut el a LC-beli TH tartalmú neuronokon található receptoraihoz

A kutatómunkának egy irodalmi adat adott új irányt, ugyanis a nyílt forráskódú Allen Brain Atlas hasznos információval szolgált arról, hogy a LC az agytörzsön belül kiemelkedően magas CNTF receptor expresszióval bír [222]. A receptort kamraközeli TH tartalmú neuronokon, azon belül is főként az akut stresszválaszban fontos projekcióval rendelkező, prefrontális kéregbe vetülő idegsejteken találtam meg, a CNTF TH-ra és Erk1/2-re gyakorolt hatását pedig ex vivo szeletkultúrán az inzulinóma sejtvonalon megfigyeltekkel azonosnak találtam. Feltételeztem ezek alapján, hogy a CNTF beilleszthető az in vivo stressz jelátviteli kaszkádba, mint valamiféle hírvivő molekula. A kérdés csupán az volt, hogy mely sejtek szabadítják fel, és hogyan jut el a IV. kamra magasságában helyet foglaló célsejtjeihez. Fehérje és RNS analízis segítségével egyaránt sikerült bizonyítanom, hogy a CNTF a köztiagy szintjében, a III. kamrát bélelő ependimális réteg sejtjeiben termelődik. Az ependima a glia egy típusa, axon és dendrit nélküli sejtjei fedőhámhoz hasonló módon borítják a belső liquorterek felszíneit, gyakran rendelkeznek szekretoros funkcióval, termékeiket általában közvetlenül az agykamrarendszerbe ürítik [227]. A CNTF jelenléte a liquorban, illetve koncentrációjának változásai különböző körülmények között irodalmi adatokként már rendelkezésre álltak munkámat megelőzően is [228, 229], így én elsősorban azt vizsgáltam, akut formalin stressznek kitett állatok liquormintáiban van-e arra utaló jel, hogy a CNTF tényleg a stressz jelátvitel egy eleme lehet. Az ELISA kísérlet eredményei meggyőzően igazolták hipotézisem helyességét, így újabb kísérletekkel más irányokból megközelítve tovább végezhettem a folyamatok feltérképezését. Intracerebroventrikuláris infúzióban adott CNTF a formalin stresszhez hasonló viselkedést vált ki a kísérleti állatokban, agytörzsi szövetmintáikban a TH 31-es

szerinjének foszforilációja szintén a stressz hatására jelentkező változásokkal analóg. A secretagogin szerepe ebben a modellben is minden kétséget kizáróan esszenciális, ahogy a génkiütött egerek vizsgálata ezt igazolja. A CNTF agyvízen keresztül terjedő, LC neuronok által mediált stresszválasz mechanizmusát erősíti továbbá, hogy CNTF siRNS intracerebroventrikuláris beadása esetén a stressz hatására egyébként jelentkező TH 31-es szerin foszforiláció a LC-ban elmarad.

6.4. A secretagogin befolyásolja a noradrenalin indukálta neuronális excitabilitást a prefrontális kéregben

Az ébrenlét és a vigilitás szabályozásáért felelős agytörzsi noradrenerg neuronok nagy számban projiciálnak a mPFC-be, mely többek között a stresszválasz részeként megjelenő küzdési-menekülési viselkedések szervezőközpontja [230, 231]. Mindezek, illetve saját eredményeim alapján feltételeztem, hogy ez a neokortikális terület lehet az utolsó eleme egy hipotalamusz-LC-mPFC stresszkörnek.

Anterográd pályakövetéssel bizonyítottam, hogy a 31-es szerinen foszforilált TH jelen van a prefrontális kérgi TH tartalmú rostokban, kimutattam továbbá, hogy ugyanitt a secretagogin is megtalálható, méghozzá elsősorban a szinapszisok területén. A két fehérje együttműködéséhez tehát minden adott ezen az agyterületen is.

Munkacsoportunk egyéb tagjai secretagogin génkiütött, kontroll és stresszelt állatokon végzett kísérletek segítségével – a kérgi noradrenalin mennyiségének mérésén keresztül, optogenetikai módszerekkel, valamint piramissejtek elektrofiziológiai vizsgálatával – idegélettani bizonyítékokkal szolgáltak a rendszer működését, és a secretagogin nélkülözhetetlen szerepét illetően [232].

Összességében adataink alapján elmondható, hogy a secretagogin noradrenerg rostok en passant szinapszisokat képző varikozitásaiban hatékonyan szabályozza a neurotranszmitter-felszabadulást, modulálva ezáltal a piramissejtek tüzelési frekvenciáját és a prefrontális kéreg egészének működését akut stressz során.

7. Következtetések

- A secretagogin egy jól használható neurokémiai markere agytörzsi relémagoknak, vegetatív és stressz központoknak.
- A secretagogin agytörzsi eloszlása nagyfokú hasonlóságot mutat egerekben, patkányokban és emberben.
- A secretagogin 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 ependimális 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 secretagogin jelen van a mPFC-ben, főként szinapszisokban.
- A mPFC-be projiciáló LC eredetű rostokon belül megtalálható a 31-es szerin reziduumon foszforilált TH.

8. Összefoglalás

Számos központi idegrendszeri sejttípus azonosítható az általa expresszált kalciumkötő fehérjék alapján. Munkánk során a secretagogin kalcium szenzor fehérjét noradrenerg neuronokban, szenzoros relémagokban, valamint vegetatív központokban azonosítottuk. Genetikai módszerekkel kiegészített in vitro és in vivo neurofarmakológiával igazoltuk a LC neuronok nélkülözhetetlen szerepét a központi idegrendszeri stresszválaszban. Kimutattuk, hogy a harmadik kamramenti ependimális réteg sejtjeiből felszabaduló CNTF liquor mediálta volumen transzmisszióval jut el a LC neuronokon levő receptorához, majd egy secretagogin-függő intracelluláris jelátviteli útvonalat aktiválva az Erk1/2 enzim közreműködésével előidézi a TH foszforilációját. Mind a CNTF, mind a secretagogin mennyiségének csökkentése megakadályozza a stressz indukálta kérgi noradrenalin felszabadulást, a fokozott neuronális excitabilitást, és a stresszre jellemző viselkedésformák megjelenését. Összefoglalásképp elmondható, hogy az általunk újonnan leírt stresszmechanizmus a hipotalamikus aktivációt késői, elnyújtott kérgi excitációvá, valamint jellegzetes viselkedési válasszá konvertálja.

9. Summary

Calcium-binding proteins are typically used to characterize neuronal subtypes in the central nervous system. We identify secretagogin as a calcium-sensor which typically labels norepinephrinergic neurons but also outlines distinct sensory relay and vegetative centres in the vertebrate brainstem. Using in vitro and vivo neuropharmacology combined with genetical tools we show that LC neurons are critical network players of a stress signaling route which acts via volume transmission through the cerebrospinal fluid. Thus, ependymal cell layer in the wall of the third ventricle release CNTF which binds to its cognate receptors of LC neurons. This initiates sequential phosphorylation of Erk1/2 and TH, which is critically reliant on secretagogin. Both CNTF and secretagogin ablation occlude stress-induced cortical noradrenaline synthesis, ensuing neuronal excitation and behavioural stereotypes. This newly described stress pathway converts hypothalamic activation into a postponed and long-lasting cortical excitability and behavioural response following acute stress.

10. Irodalomjegyzék

1. Paxinos, G., Watson, C., *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Elsevier, Academic Press, San Diego, 2005.
2. Paxinos, G., Franklin, K. B., *The mouse brain in stereotaxic coordinates.* Elsevier, Academic Press, San Diego, 1997.
3. Stefanini, M., (1950) *Studies on the role of calcium in the coagulation of blood.* Acta Med Scand,. **136**(4): p. 250-66.
4. Bell, N.H., (1967) *Dynamics of bone metabolism.* Annu Rev Med,. **18**: p. 299-312.
5. Ebashi, S. and M. Endo, (1968) *Calcium ion and muscle contraction.* Prog Biophys Mol Biol,. **18**: p. 123-83.
6. Heslop, J.P., (1975) *Axonal flow and fast transport in nerves.* Adv Comp Physiol Biochem,. **6**: p. 75-163.
7. Hammerschlag, R., (1980) *The role of calcium in the initiation of fast axonal transport.* Fed Proc,. **39**(10): p. 2809-14.
8. Meech, R.W., (1978) *Calcium-dependent potassium activation in nervous tissues.* Annu Rev Biophys Bioeng,. **7**: p. 1-18.
9. Clapham, D.E., (2007) *Calcium signaling.* Cell,. **131**(6): p. 1047-58.
10. Burnashev, N. and A. Rozov, (2005) *Presynaptic Ca2+ dynamics, Ca2+ buffers and synaptic efficacy.* Cell Calcium,. **37**(5): p. 489-95.
11. Pang, Z.P. and T.C. Sudhof, (2010) *Cell biology of Ca2+-triggered exocytosis.* Curr Opin Cell Biol,. **22**(4): p. 496-505.
12. Fonyó, A., *Az orvosi élettan tankönyve*. Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 2011: 67.
13. Skelton, N.J., J. Kordel, M. Akke, S. Forsen, and W.J. Chazin, (1994) *Signal transduction versus buffering activity in Ca(2+)-binding proteins.* Nat Struct Biol,. **1**(4): p. 239-45.
14. Bagur, R. and G. Hajnóczky, (2017) *Intracellular Ca(2+) Sensing: Its Role in Calcium Homeostasis and Signaling.* Mol Cell,. **66**(6): p. 780-788.
15. Südhof, T.C. and R. Jahn, (1991) *Proteins of synaptic vesicles involved in exocytosis and membrane recycling.* Neuron,. **6**(5): p. 665-77.

16. Wang, J.H. and D.M. Waisman, (1979) *Calmodulin and its role in the second-messenger system.* Curr Top Cell Regul,. **15**: p. 47-107.
17. Andressen, C., I. Blumcke, and M.R. Celio, (1993) *Calcium-binding proteins: selective markers of nerve cells.* Cell Tissue Res,. **271**(2): p. 181-208.
18. Freund, T.F. and G. Buzsaki, (1996) *Interneurons of the hippocampus.* Hippocampus,. **6**(4): p. 347-470.
19. Klausberger, T. and P. Somogyi, (2008) *Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations.* Science,. **321**(5885): p. 53-7.
20. Celio, M.R., W. Baier, L. Schärer, H.J. Gregersen, P.A. de Viragh, and A.W. Norman, (1990) *Monoclonal antibodies directed against the calcium binding protein Calbindin D-28k.* Cell Calcium,. **11**(9): p. 599-602.
21. Wagner, L., O. Oliyarnyk, W. Gartner, P. Nowotny, M. Groeger, K. Kaserer, W. Waldhäusl, and M.S. Pasternack, (2000) *Cloning and expression of secretagogin, a novel neuroendocrine- and pancreatic islet of Langerhans-specific Ca2+-binding protein.* J Biol Chem,. **275**(32): p. 24740-51.
22. Mulder, J., M. Zilberter, L. Spence, G. Tortoriello, M. Uhlén, Y. Yanagawa, F. Aujard, T. Hökfelt, and T. Harkany, (2009) *Secretagogin is a Ca2+-binding protein specifying subpopulations of telencephalic neurons.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,. **106**(52): p. 22492-22497.
23. Mulder, J., L. Spence, G. Tortoriello, J.A. Dinieri, M. Uhlén, B. Shui, M.I. Kotlikoff, Y. Yanagawa, F. Aujard, T. Hökfelt, Y.L. Hurd, and T. Harkany, (2010) *Secretagogin is a Ca2+-binding protein identifying prospective extended amygdala neurons in the developing mammalian telencephalon.* The European journal of neuroscience,. **31**(12): p. 2166-2177.
24. Gartner, W., W. Lang, F. Leutmetzer, H. Domanovits, W. Waldhäusl, and L. Wagner, (2001) *Cerebral expression and serum detectability of secretagogin, a recently cloned EF-hand Ca(2+)-binding protein.* Cereb Cortex,. **11**(12): p. 1161-9.

25. Rogstam, A., S. Linse, A. Lindqvist, P. James, L. Wagner, and T. Berggård, (2006) *Binding of calcium ions and SNAP-25 to the hexa EF-hand protein secretagogin.* Biochemical Journal,. **401**(1): p. 353-363.

26. Puthussery, T., J. Gayet-Primo, and W.R. Taylor, (2010) *Localization of the calcium-binding protein secretagogin in cone bipolar cells of the mammalian retina.* J Comp Neurol,. **518**(4): p. 513-25.

27. Kantor, O., S. Mezey, J. Adeghate, A. Naumann, R. Nitschke, A. Enzsoly, A. Szabo, A. Lukats, J. Nemeth, Z. Somogyvari, and B. Volgyi, (2016) *Calcium buffer proteins are specific markers of human retinal neurons.* Cell Tissue Res,. **365**(1): p. 29-50.

28. Kim, D.S., S.E. Ross, J.M. Trimarchi, J. Aach, M.E. Greenberg, and C.L. Cepko, (2008) *Identification of molecular markers of bipolar cells in the murine retina.* J Comp Neurol,. **507**(5): p. 1795-810.

29. Maj, M., I. Milenkovic, J. Bauer, T. Berggård, M. Veit, A. Ilhan-Mutlu, L. Wagner, and V. Tretter, (2012) *Novel insights into the distribution and functional aspects of the calcium binding protein secretagogin from studies on rat brain and primary neuronal cell culture.* Front Mol Neurosci,. **5**: p. 84.

30. Romanov, R.A., A. Alpár, M.D. Zhang, A. Zeisel, A. Calas, M. Landry, M. Fuszard, S.L. Shirran, R. Schnell, Á. Dobolyi, M. Oláh, L. Spence, J. Mulder, H. Martens, M. Palkovits, M. Uhlen, H.H. Sitte, C.H. Botting, L. Wagner, S. Linnarsson, T. Hökfelt, and T. Harkany, (2015) *A secretagogin locus of the mammalian hypothalamus controls stress hormone release.* Embo j,. **34**(1): p. 36-54.

31. Attems, J., M. Quass, W. Gartner, A. Nabokikh, L. Wagner, S. Steurer, S. Arbes, F. Lintner, and K. Jellinger, (2007) *Immunoreactivity of calcium binding protein secretagogin in the human hippocampus is restricted to pyramidal neurons.* Exp Gerontol,. **42**(3): p. 215-22.

32. Attems, J., M. Preusser, M. Grosinger-Quass, L. Wagner, F. Lintner, and K. Jellinger, (2008) *Calcium-binding protein secretagogin-expressing neurones in the human hippocampus are largely resistant to neurodegeneration in Alzheimer's disease.* Neuropathology and Applied Neurobiology,. **34**(1): p. 23-32.

33. Maj, M., W. Gartner, A. Ilhan, D. Neziri, J. Attems, and L. Wagner, (2010) *Expression of TAU in insulin-secreting cells and its interaction with the calcium-binding protein secretagogin.* J Endocrinol,. **205**(1): p. 25-36.

34. Attems, J., A. Ittner, K. Jellinger, R.M. Nitsch, M. Maj, L. Wagner, J. Gotz, and M. Heikenwalder, (2011) *Reduced secretagogin expression in the hippocampus of P301L tau transgenic mice.* J Neural Transm (Vienna),. **118**(5): p. 737-45.

35. Hof, P.R., K. Cox, W.G. Young, M.R. Celio, J. Rogers, and J.H. Morrison, (1991) *Parvalbumin-immunoreactive neurons in the neocortex are resistant to degeneration in Alzheimer's disease.* J Neuropathol Exp Neurol,. **50**(4): p. 451-62.

36. Hof, P.R., E.A. Nimchinsky, M.R. Celio, C. Bouras, and J.H. Morrison, (1993) *Calretinin-immunoreactive neocortical interneurons are unaffected in Alzheimer's disease.* Neurosci Lett,. **152**(1-2): p. 145-8.

37. Celio, M.R.; Available from: http://ejnblog.wordpress.com/2010/07/03/secretagogin-the-fourth-musketeer/.

38. Szentágothai, J., Réthelyi, M., *Funkcionális anatómia*. Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest, 2006: 1476-1480.

39. Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Katz, L. C., LaMantia, A. S., McNamara, J. O., Williams, S. M., *Neuroscience*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, 2011: 603-625.

40. Saladin, K.S., *Anatomy & Physiology: The Unity of Form and Function.* McGraw-Hill, Dubuque, 2009: 546-611.

41. Nolte, J., Sundsten, J. W., *The Human Brain: An Introduction to its Functional Anatomy*. Mosby Elsevier, Philadelphia, 2002.

42. Tindall, S.C., *Level of Consciousness*. In: H.K. Walker, W.D. Hall, and J.W. Hurst (ed.), *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*. Butterworth Publishers, Boston, 1990: Chapter 57.

43. Waymire, J.C. *Biogenic Amine Neurotransmitters*. In: *Neuroscience Online*. McGovern Medical School at UTHealth, Houston, 1997: Chapter 12.

44. Scammell, T.E., A.C. Jackson, N.P. Franks, W. Wisden, and Y. Dauvilliers, (2019) *Histamine: neural circuits and new medications.* Sleep,. **42**(1).

45. Hornung, J.P., (2003) *The human raphe nuclei and the serotonergic system.* J Chem Neuroanat,. **26**(4): p. 331-43.

46. Sos, K.E., M.I. Mayer, C. Cserép, F.S. Takács, A. Szőnyi, T.F. Freund, and G. Nyiri, (2017) *Cellular architecture and transmitter phenotypes of neurons of the mouse median raphe region.* Brain Struct Funct,. **222**(1): p. 287-299.

47. Törk, I., (1990) *Anatomy of the serotonergic system.* Ann N Y Acad Sci,. **600**: p. 9-34; discussion 34-5.

48. Grzanna, R. and M.E. Molliver, (1980) *The locus coeruleus in the rat: an immunohistochemical delineation.* Neuroscience,. **5**(1): p. 21-40.

49. Swanson, L.W., (1976) *The locus coeruleus: a cytoarchitectonic, Golgi and immunohistochemical study in the albino rat.* Brain Res,. **110**(1): p. 39-56.

50. Aston-Jones G SM, G.R., (1995) *The Locus Coeruleus, A5 and A7 Noradrenergic Cell Groups.*, in *The Rat Nervous System*., Academic Press. p. 183-213.

51. Groves, P.M. and C.J. Wilson, (1980) *Fine structure of rat locus coeruleus.* J Comp Neurol,. **193**(4): p. 841-52.

52. Fuxe, K., (1965) *Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system.* Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie,. **65**(4): p. 573-596.

53. Hancock, M.B. and C.L. Fougerousse, (1976) *Spinal projections from the nucleus locus coeruleus and nucleus subcoeruleus in the cat and monkey as demonstrated by the retrograde transport of horseradish peroxidase.* Brain Res Bull,. **1**(2): p. 229-34.

54. Hökfelt, T. and K. Fuxe, (1969) *Cerebellar monoamine nerve terminals, a new type of afferent fibers to the cortex cerebelli.* Exp Brain Res,. **9**(1): p. 63-72.

55. Kobayashi, R.M., M. Palkovits, I.J. Kopin, and D.M. Jacobowitz, (1974) *Biochemical mapping of noradrenergic nerves arising from the rat locus coeruleus.* Brain Res,. **77**(2): p. 269-79.

56. Lindvall, O., A. Björklund, A. Nobin, and U. Stenevi, (1974) *The adrenergic innervation of the rat thalamus as revealed by the glyoxylic acid fluorescence method.* J Comp Neurol,. **154**(3): p. 317-47.

57. Olson, L. and K. Fuxe, (1972)*Further mapping out of central noradrenaline neuron systems: projections of the "subcoeruleus" area.* Brain Res,. **43**(1): p. 289-95.

58. Swanson, L.W. and B.K. Hartman, (1975) *The central adrenergic system. An immunofluorescence study of the location of cell bodies and their efferent connections in the rat utilizing dopamine-beta-hydroxylase as a marker.* J Comp Neurol,. **163**(4): p. 467-505.

59. Fuxe, K., B. Hamberger, and T. Hökfelt, (1968) *Distribution of noradrenaline nerve terminals in cortical areas of the rat.* Brain Res,. **8**(1): p. 125-31.

60. Brownstein, M., J.M. Saavedra, and M. Palkovits, (1974) *Norepinephrine and dopamine in the limbic system of the rat.* Brain Res,. **79**(3): p. 431-6.

61. Descarries, L. and Y. Lapierre, (1973) *Noradrenergic axon in the cerebral cortex of rat. I. Radioautographic visualization after topical application of DL-(3 H)norepinephrine.* Brain Res,. **51**: p. 141-60.

62. Freedman, R., S.L. Foote, and F.E. Bloom, (1975) *Histochemical characterization of a neocortical projection of the nucleus locus coeruleus in the squirrel monkey.* Journal of Comparative Neurology,. **164**(2): p. 209-231.

63. Tohyama, M., T. Maeda, A. Kashiba, and N. Shimizu, (1974) *Fluorescence and electron microscopic analysis of axonal change of coerulo-cortical noradrenaline neuron system following destruction of locus coeruleus and administration of 6-hydroxydopa in the rat brain.* Med J Osaka Univ,. **24**(4): p. 205-21.

64. Descarries, L., K.C. Watkins, and Y. Lapierre, (1977) *Noradrenergic axon terminals in the cerebral cortex of rat. III. Topometric ultrastructural analysis.* Brain Res,. **133**(2): p. 197-222.

65. Bannister, K. and A.H. Dickenson, (2016) *What do monoamines do in pain modulation?* Curr Opin Support Palliat Care,. **10**(2): p. 143-8.

66. Jones, S.L., (1991) *Descending noradrenergic influences on pain.* Prog Brain Res,. **88**: p. 381-94.

67. Hornykiewicz, O., (1982) *Imbalance of brain monoamines and clinical disorders.* Prog Brain Res,. **55**: p. 419-29.

68. Hornykiewicz, O., (1975) *Brain monoamines and parkinsonism.* Natl Inst Drug Abuse Res Monogr Ser, (3): p. 13-21.

69. Delaville, C., P.D. Deurwaerdère, and A. Benazzouz, (2011) *Noradrenaline and Parkinson's disease.* Front Syst Neurosci,. **5**: p. 31.

70. Gerson, S.C. and R.J. Baldessarini, (1980) *Motor effects of serotonin in the central nervous system.* Life Sci,. **27**(16): p. 1435-51.

71. Davidoff, R.A. and J.C. Hackman, (1991) *Aspects of spinal cord structure and reflex function.* Neurol Clin,. **9**(3): p. 533-50.

72. Reis, D.J., A.R. Granata, T.H. Joh, C.A. Ross, D.A. Ruggiero, and D.H. Park, (1984) *Brain stem catecholamine mechanisms in tonic and reflex control of blood pressure.* Hypertension,. **6**(5 Pt 2): p. Ii7-15.

73. Leibowitz, S.F. and G. Shor-Posner, (1986) *Brain serotonin and eating behavior.* Appetite,. **7 Suppl**: p. 1-14.

74. Levin, B.E. and V.H. Routh, (1996) *Role of the brain in energy balance and obesity.* Am J Physiol,. **271**(3 Pt 2): p. R491-500.

75. Fernstrom, J.D. and M.H. Fernstrom, (2001) *Diet, monoamine neurotransmitters and appetite control.* Nestle Nutr Workshop Ser Clin Perform Programme,. **5**: p. 117-31; discussion 131-3.

76. Levy, A.D., M.H. Baumann, and L.D. Van de Kar, (1994) *Monoaminergic regulation of neuroendocrine function and its modification by cocaine.* Front Neuroendocrinol,. **15**(2): p. 85-156.

77. Jonassen, R. and N.I. Landrø, (2014) *Serotonin transporter polymorphisms (5-HTTLPR) in emotion processing: implications from current neurobiology.* Prog Neurobiol,. **117**: p. 41-53.

78. Outhred, T., B.E. Hawkshead, T.D. Wager, P. Das, G.S. Malhi, and A.H. Kemp, (2013) *Acute neural effects of selective serotonin reuptake inhibitors versus noradrenaline reuptake inhibitors on emotion processing: Implications for differential treatment efficacy.* Neurosci Biobehav Rev,. **37**(8): p. 1786-800.

79. Pfaus, J.G. and B.J. Everitt, *The psychopharmacology of sexual behavior.* In: Bloom, F. E., Kupfer, D. J. (ed.), Psychopharmacology: The fourth generation of progress. Raven Press, New York, 1995: 743-758.

80. Gorzalka, B.B., S.D. Mendelson, and N.V. Watson, (1990) *Serotonin receptor subtypes and sexual behavior.* Ann N Y Acad Sci,. **600**: p. 435-44; discussion 445-6.

81. Kafka, M.P., (1997) *A Monoamine Hypothesis for the Pathophysiology of Paraphilic Disorders.* Archives of Sexual Behavior,. **26**(4): p. 343-358.

82. Aston-Jones, G. and J.D. Cohen, (2005) *An integrative theory of locus coeruleus-norepinephrine function: adaptive gain and optimal performance.* Annu Rev Neurosci,. **28**: p. 403-50.

83. Ruhe, H.G., N.S. Mason, and A.H. Schene, (2007) *Mood is indirectly related to serotonin, norepinephrine and dopamine levels in humans: a meta-analysis of monoamine depletion studies.* Mol Psychiatry,. **12**(4): p. 331-59.

84. Dunlop, B.W. and C.B. Nemeroff, (2007) *The role of dopamine in the pathophysiology of depression.* Arch Gen Psychiatry,. **64**(3): p. 327-37.

85. Savitz, J.B. and W.C. Drevets, (2013) *Neuroreceptor imaging in depression.* Neurobiol Dis,. **52**: p. 49-65.

86. Meyer, J.H., N. Ginovart, A. Boovariwala, S. Sagrati, D. Hussey, A. Garcia, T. Young, N. Praschak-Rieder, A.A. Wilson, and S. Houle, (2006) *Elevated monoamine oxidase a levels in the brain: an explanation for the monoamine imbalance of major depression.* Arch Gen Psychiatry,. **63**(11): p. 1209-16.

87. Adell, A., (2015) *Revisiting the role of raphe and serotonin in neuropsychiatric disorders.* J Gen Physiol,. **145**(4): p. 257-9.

88. Andrews, P.W., A. Bharwani, K.R. Lee, M. Fox, and J.A. Thomson, Jr., (2015) *Is serotonin an upper or a downer? The evolution of the serotonergic system and its role in depression and the antidepressant response.* Neurosci Biobehav Rev,. **51**: p. 164-88.

89. Le Moal, M. and H. Simon, (1991) *Mesocorticolimbic dopaminergic network: functional and regulatory roles.* Physiol Rev,. **71**(1): p. 155-234.

90. Robbins, T., *Central norepinephrine neurons and behavior.* In: Bloom, F. E., Kupfer, D. J. (ed.), Psychopharmacology: The fourth generation of progress. Raven Press, New York, 1995: 363-372.

91. Fitzgerald, P.A. *Adrenal Medulla and Paraganglia.* In: Gardner, D. G., Shoback, D. G. (ed.), *Basic & Clinical Endocrinology*. McGraw-Hill, New York, 2011: Chapter 11.

92. Levitt, M., S. Spector, A. Sjoerdsma, and S. Udenfriend, (1965) *ELUCIDATION OF THE RATE-LIMITING STEP IN NOREPINEPHRINE BIOSYNTHESIS IN THE PERFUSED GUINEA-PIG HEART.* J Pharmacol Exp Ther,. **148**: p. 1-8.

93. Nagatsu, T., M. Levitt, and S. Udenfriend, (1964) *TYROSINE HYDROXYLASE. THE INITIAL STEP IN NOREPINEPHRINE BIOSYNTHESIS.* J Biol Chem,. **239**: p. 2910-7.

94. Tekin, I., R. Roskoski, Jr., N. Carkaci-Salli, and K.E. Vrana, (2014) *Complex molecular regulation of tyrosine hydroxylase.* J Neural Transm (Vienna),. **121**(12): p. 1451-81.

95. Kobayashi K, M.S., Sawada H, Mizuguchi T, Yamada K, Nagatsu I, Hata T, Watanabe Y, Fujita K, Nagatsu T, (1995) *Targeted disruption of the tyrosine hydroxylase locus results in severe catecholamine depletion and perinatal lethality in mice. J Biol Chem 270(45):27235–27243.*

96. Zhou QY, Q.C., Palmiter RD, (1995) *Targeted disruption of the tyrosine hydroxylase gene reveals that catecholamines are required for mouse fetal development.* Nature, **374**(6523): p. 640-643.

97. Ichinose, H., T. Suzuki, H. Inagaki, T. Ohye, and T. Nagatsu, (1999) *Molecular genetics of dopa-responsive dystonia.* Biol Chem,. **380**(12): p. 1355-64.

98. Segawa, M., Y. Nomura, and N. Nishiyama, (2003) *Autosomal dominant guanosine triphosphate cyclohydrolase I deficiency (Segawa disease).* Ann Neurol,. **54 Suppl 6**: p. S32-45.

99. Segawa, M., (2011) *Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation.* Brain Dev,. **33**(3): p. 195-201.

100. Daubner, S.C., T. Le, and S. Wang, (2011) *Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis.* Arch Biochem Biophys,. **508**(1): p. 1-12.

101. Dickson, P.W. and G.D. Briggs, (2013) *Tyrosine hydroxylase: regulation by feedback inhibition and phosphorylation.* Adv Pharmacol,. **68**: p. 13-21.

102. Dunkley, P.R., L. Bobrovskaya, M.E. Graham, E.I. von Nagy-Felsobuki, and P.W. Dickson, (2004) *Tyrosine hydroxylase phosphorylation: regulation and consequences.* J Neurochem,. **91**(5): p. 1025-43.

103. Nakashima, A., Y.S. Kaneko, Y. Kodani, K. Mori, H. Nagasaki, T. Nagatsu, and A. Ota, (2013) *Intracellular stability of tyrosine hydroxylase: phosphorylation and proteasomal digestion of the enzyme.* Adv Pharmacol,. **68**: p. 3-11.

104. Campbell, D.G., D.G. Hardie, and P.R. Vulliet, (1986) *Identification of four phosphorylation sites in the N-terminal region of tyrosine hydroxylase.* J Biol Chem,. **261**(23): p. 10489-92.

105. Roskoski, R., Jr., P.R. Vulliet, and D.B. Glass, (1987) *Phosphorylation of tyrosine hydroxylase by cyclic GMP-dependent protein kinase.* J Neurochem,. **48**(3): p. 840-5.

106. Albert, K.A., E. Helmer-Matyjek, A.C. Nairn, T.H. Muller, J.W. Haycock, L.A. Greene, M. Goldstein, and P. Greengard, (1984) *Calcium/phospholipid-dependent protein kinase (protein kinase C) phosphorylates and activates tyrosine hydroxylase.* Proc Natl Acad Sci U S A,. **81**(24): p. 7713-7.

107. Sutherland, C., J. Alterio, D.G. Campbell, B. Le Bourdelles, J. Mallet, J. Haavik, and P. Cohen, (1993) *Phosphorylation and activation of human tyrosine hydroxylase in vitro by mitogen-activated protein (MAP) kinase and MAP-kinase-activated kinases 1 and 2.* Eur J Biochem,. **217**(2): p. 715-22.

108. Toska, K., R. Kleppe, C.G. Armstrong, N.A. Morrice, P. Cohen, and J. Haavik, (2002) *Regulation of tyrosine hydroxylase by stress-activated protein kinases.* J Neurochem,. **83**(4): p. 775-83.

109. Haavik, J., D.L. Schelling, D.G. Campbell, K.K. Andersson, T. Flatmark, and P. Cohen, (1989) *Identification of protein phosphatase 2A as the major tyrosine hydroxylase phosphatase in adrenal medulla and corpus striatum: evidence from the effects of okadaic acid.* FEBS letters,. **251**(1-2): p. 36-42.

110. Bevilaqua, L.R., M.E. Graham, P.R. Dunkley, E.I. von Nagy-Felsobuki, and P.W. Dickson, (2001) *Phosphorylation of Ser(19) alters the conformation of tyrosine hydroxylase to increase the rate of phosphorylation of Ser(40).* J Biol Chem,. **276**(44): p. 40411-6.

111. Salvatore, M.F., R.W. Davis, J.C. Arnold, and T. Chotibut, (2012) *Transient striatal GLT-1 blockade increases EAAC1 expression, glutamate reuptake, and decreases tyrosine hydroxylase phosphorylation at ser19.* Experimental neurology,. **234**(2): p. 428-436.

112. Kawaai, K., A. Mizutani, H. Shoji, N. Ogawa, E. Ebisui, Y. Kuroda, S. Wakana, T. Miyakawa, C. Hisatsune, and K. Mikoshiba, (2015) *IRBIT regulates CaMKIIα activity and contributes to catecholamine homeostasis through tyrosine hydroxylase phosphorylation.* Proceedings of the National Academy of Sciences,. **112**(17): p. 5515-5520.

113. Haycock, J., J. Lew, A. Garcia-Espana, K. Lee, K. Harada, E. Meller, and M. Goldstein, (1998) *Role of serine-19 phosphorylation in regulating tyrosine hydroxylase studied with site-and phosphospecific antibodies and site-directed mutagenesis.* Journal of neurochemistry,. **71**(4): p. 1670-1675.

114. Funakoshi, H., S. Okuno, and H. Fujisawa, (1991) *Different effects on activity caused by phosphorylation of tyrosine hydroxylase at serine 40 by three multifunctional protein kinases.* J Biol Chem,. **266**(24): p. 15614-20.

115. Yamauchi, T. and H. Fujisawa, (1981) *Tyrosine 3-monoxygenase is phosphorylated by Ca2+-, calmodulin-dependent protein kinase, followed by activation by activator protein.* Biochem Biophys Res Commun,. **100**(2): p. 807-13.

116. Ichimura, T., T. Isobe, T. Okuyama, T. Yamauchi, and H. Fujisawa, (1987) *Brain 14-3-3 protein is an activator protein that activates tryptophan 5-monooxygenase and tyrosine 3-monooxygenase in the presence of Ca2+,calmodulin-dependent protein kinase II.* FEBS Lett,. **219**(1): p. 79-82.

117. Itagaki, C., T. Isobe, M. Taoka, T. Natsume, N. Nomura, T. Horigome, S. Omata, H. Ichinose, T. Nagatsu, L.A. Greene, and T. Ichimura, (1999) *Stimulus-coupled interaction of tyrosine hydroxylase with 14-3-3 proteins.* Biochemistry,. **38**(47): p. 15673-80.

118. Shi, X., W.R. Woodward, and B.A. Habecker, (2012) *Ciliary neurotrophic factor stimulates tyrosine hydroxylase activity.* J Neurochem,. **121**(5): p. 700-4.

119. Haycock, J.W., N.G. Ahn, M.H. Cobb, and E.G. Krebs, (1992) *ERK1 and ERK2, two microtubule-associated protein 2 kinases, mediate the phosphorylation of tyrosine hydroxylase at serine-31 in situ.* Proc Natl Acad Sci U S A,. **89**(6): p. 2365-9.

120. Luke, T.M. and T.D. Hexum, (2008) *Tyrosine hydroxylase phosphorylation increases in response to ATP and neuropeptide Y co-stimulation of ERK2 phosphorylation.* Pharmacol Res,. **58**(1): p. 52-7.

121. Yu, H.S., S.H. Kim, H.G. Park, Y.S. Kim, and Y.M. Ahn, (2011) *Intracerebroventricular administration of ouabain, a Na/K-ATPase inhibitor, activates tyrosine hydroxylase through extracellular signal-regulated kinase in rat striatum.* Neurochem Int,. **59**(6): p. 779-86.

122. Roskoski, R., Jr., (2012) *ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation.* Pharmacol Res,. **66**(2): p. 105-43.

123. Halloran, S.M. and P.R. Vulliet, (1994) *Microtubule-associated protein kinase-2 phosphorylates and activates tyrosine hydroxylase following depolarization of bovine adrenal chromaffin cells.* J Biol Chem,. **269**(49): p. 30960-5.

124. Vulliet, P.R., F.L. Hall, J.P. Mitchell, and D.G. Hardie, (1989) *Identification of a novel proline-directed serine/threonine protein kinase in rat pheochromocytoma.* J Biol Chem,. **264**(27): p. 16292-8.

125. Royo, M., S.C. Daubner, and P.F. Fitzpatrick, (2004) *Specificity of the MAP kinase ERK2 for phosphorylation of tyrosine hydroxylase.* Arch Biochem Biophys,. **423**(2): p. 247-52.

126. McTigue, M., J. Cremins, and S. Halegoua, (1985) *Nerve growth factor and other agents mediate phosphorylation and activation of tyrosine hydroxylase. A convergence of multiple kinase activities.* J Biol Chem,. **260**(15): p. 9047-56.

127. Haycock, J.W., (1990) *Phosphorylation of tyrosine hydroxylase in situ at serine 8, 19, 31, and 40.* J Biol Chem,. **265**(20): p. 11682-91.

128. Leal, R.B., A.T. Sim, C.A. Goncalves, and P.R. Dunkley, (2002) *Tyrosine hydroxylase dephosphorylation by protein phosphatase 2A in bovine adrenal chromaffin cells.* Neurochem Res,. **27**(3): p. 207-13.

129. Nankova, B., B. Hiremagalur, A. Menezes, R. Zeman, and E. Sabban, (1996) *Promoter elements and second messenger pathways involved in transcriptional activation of tyrosine hydroxylase by ionomycin.* Brain Res Mol Brain Res,. **35**(1-2): p. 164-72.

130. Lewis-Tuffin, L.J., P.G. Quinn, and D.M. Chikaraishi, (2004) *Tyrosine hydroxylase transcription depends primarily on cAMP response element activity, regardless of the type of inducing stimulus.* Mol Cell Neurosci,. **25**(3): p. 536-47.

131. Mishra, R.R., G. Adhikary, M.S. Simonson, N.S. Cherniack, and N.R. Prabhakar, (1998) *Role of c-fos in hypoxia-induced AP-1 cis-element activity and tyrosine hydroxylase gene expression.* Brain Res Mol Brain Res,. **59**(1): p. 74-83.

132. Papanikolaou, N.A. and E.L. Sabban, (1999) *Sp1/Egr1 motif: a new candidate in the regulation of rat tyrosine hydroxylase gene transcription by immobilization stress.* J Neurochem,. **73**(1): p. 433-6.

133. Papanikolaou, N.A. and E.L. Sabban, (2000) *Ability of Egr1 to activate tyrosine hydroxylase transcription in PC12 cells. Cross-talk with AP-1 factors.* J Biol Chem,. **275**(35): p. 26683-9.

134. Nakashima, A., A. Ota, and E.L. Sabban, (2003) *Interactions between Egr1 and AP1 factors in regulation of tyrosine hydroxylase transcription.* Brain Res Mol Brain Res,. **112**(1-2): p. 61-9.

135. Sun, B. and A.W. Tank, (2003) *c-Fos is essential for the response of the tyrosine hydroxylase gene to depolarization or phorbol ester.* J Neurochem,. **85**(6): p. 1421-30.

136. Rani, C.S., N. Elango, S.S. Wang, K. Kobayashi, and R. Strong, (2009) *Identification of an activator protein-1-like sequence as the glucocorticoid response element in the rat tyrosine hydroxylase gene.* Mol Pharmacol,. **75**(3): p. 589-98.

137. Bauer, A.L., W.R. Paulding, J.B. Striet, P.O. Schnell, and M.F. Czyzyk-Krzeska, (2002) *Endogenous von Hippel-Lindau tumor suppressor protein regulates catecholaminergic phenotype in PC12 cells.* Cancer Res,. **62**(6): p. 1682-7.

138. Schnell, P.O., M.L. Ignacak, A.L. Bauer, J.B. Striet, W.R. Paulding, and M.F. Czyzyk-Krzeska, *Regulation of tyrosine hydroxylase promoter activity by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and hypoxia-inducible transcription factors.* J Neurochem, 2003. **85**(2): p. 483-91.

139. Maharjan, S., L. Serova, and E.L. Sabban, (2005) *Transcriptional regulation of tyrosine hydroxylase by estrogen: opposite effects with estrogen receptors alpha and beta and interactions with cyclic AMP.* J Neurochem,. **93**(6): p. 1502-14.

140. Romano, G., M. Macaluso, C. Lucchetti, and L. Iacovitti, (2007) *Transcription and epigenetic profile of the promoter, first exon and first intron of the human tyrosine hydroxylase gene.* J Cell Physiol,. **211**(2): p. 431-8.

141. Kumer, S.C. and K.E. Vrana, (1996) *Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression.* J Neurochem,. **67**(2): p. 443-62.

142. Czyzyk-Krzeska, M.F. and J.E. Beresh, (1996) *Characterization of the hypoxia-inducible protein binding site within the pyrimidine-rich tract in the 3'-untranslated region of the tyrosine hydroxylase mRNA.* J Biol Chem,. **271**(6): p. 3293-9.

143. Gozal, E., Z.A. Shah, J.M. Pequignot, J. Pequignot, L.R. Sachleben, M.F. Czyzyk-Krzeska, R.C. Li, S.Z. Guo, and D. Gozal, (2005) *Tyrosine hydroxylase expression and activity in the rat brain: differential regulation after long-term intermittent or sustained hypoxia.* J Appl Physiol,. **99**(2): p. 642-9.

144. Roe, D.F., G.L. Craviso, and J.C. Waymire, (2004) *Nicotinic stimulation modulates tyrosine hydroxylase mRNA half-life and protein binding to the 3'UTR in a manner that requires transcription.* Brain Res Mol Brain Res,. **120**(2): p. 91-102.

145. Tank, A.W., L. Xu, X. Chen, P. Radcliffe, and C.R. Sterling, (2008) *Post-transcriptional regulation of tyrosine hydroxylase expression in adrenal medulla and brain.* Ann N Y Acad Sci,. **1148**: p. 238-48.

146. Royo, M., P.F. Fitzpatrick, and S.C. Daubner, (2005) *Mutation of regulatory serines of rat tyrosine hydroxylase to glutamate: effects on enzyme stability and activity.* Arch Biochem Biophys,. **434**(2): p. 266-74.

147. Nakashima, A., K. Mori, Y.S. Kaneko, N. Hayashi, T. Nagatsu, and A. Ota, (2011) *Phosphorylation of the N-terminal portion of tyrosine hydroxylase triggers proteasomal digestion of the enzyme.* Biochem Biophys Res Commun,. **407**(2): p. 343-7.

148. Nakashima, A., (2012) *Proteasomal degradation of tyrosine hydroxylase and neurodegeneration.* J Neurochem,. **120**(2): p. 199-201.

149. Shi, X. and B.A. Habecker, (2012) *gp130 cytokines stimulate proteasomal degradation of tyrosine hydroxylase via extracellular signal regulated kinases 1 and 2.* J Neurochem,. **120**(2): p. 239-47.

150. Selye, H., *Stress and the General Adaptation Syndrome.* (1950) British Medical Journal,. **1**(4667): p. 1383-1392.

151. Pacák, K. and M.s. Palkovits, (2001) *Stressor Specificity of Central Neuroendocrine Responses: Implications for Stress-Related Disorders.* Endocrine Reviews,. **22**(4): p. 502-548.

152. Lupien, S.J., F. Maheu, M. Tu, A. Fiocco, and T.E. Schramek, (2007) *The effects of stress and stress hormones on human cognition: Implications for the field of brain and cognition.* Brain and Cognition,. **65**(3): p. 209-237.

153. Joëls, M. and T.Z. Baram, (2009) *The neuro-symphony of stress.* Nat Rev Neurosci,. **10**(6): p. 459-66.

154. Dayas, C.V., K.M. Buller, J.W. Crane, Y. Xu, and T.A. Day, (2001) *Stressor categorization: acute physical and psychological stressors elicit distinctive recruitment patterns in the amygdala and in medullary noradrenergic cell groups.* Eur J Neurosci,. **14**(7): p. 1143-52.

155. Fonyó, A., *Az orvosi élettan tankönyve*. Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 2011: 500.

156. McCarty, R., *Chapter 2 - The Alarm Phase and the General Adaptation Syndrome: Two Aspects of Selye's Inconsistent Legacy*, in Fink, G. (ed.) *Stress: Concepts, Cognition, Emotion, and Behavior*. Academic Press, San Diego, 2016: 13-19.

157. Fink, G., *Chapter 1 - Stress, Definitions, Mechanisms, and Effects Outlined: Lessons from Anxiety*, in Fink, G. (ed.) *Stress: Concepts, Cognition, Emotion, and Behavior*. Academic Press, San Diego, 2016: 3-11.

158. Monroe, S.M. and Slavich, G. M., *Chapter 13 - Psychological Stressors: Overview*, in Fink, G. (ed.) *Stress: Concepts, Cognition, Emotion, and Behavior*. Academic Press, San Diego, 2016: 109-115.

159. Stephenson, E., King, D. B., and DeLongis, A. *Chapter 44 - Coping Process*, in Fink, G. (ed.) *Stress: Concepts, Cognition, Emotion, and Behavior*. Academic Press, San Diego, 2016: 359-364.

160. Selye, H., (1936) *A Syndrome produced by Diverse Nocuous Agents.* Nature,. **138**(3479): p. 32-32.

161. Joëls, M., R.A. Sarabdjitsingh, and H. Karst, (2012) *Unraveling the time domains of corticosteroid hormone influences on brain activity: rapid, slow, and chronic modes.* Pharmacol Rev,. **64**(4): p. 901-38.

162. Hodes, G.E. and C.N. Epperson, (2019) *Sex Differences in Vulnerability and Resilience to Stress Across the Life Span.* Biol Psychiatry,. **86**(6): p. 421-432.

163. Dienstbier, R.A. and L.M. Zillig, *Toughness.* The Oxford Handbook of Positive Psychology, (2 Ed.), 2012.

164. Lazarus, R.S. and S. Folkman, (1987) *Transactional theory and research on emotions and coping.* European Journal of Personality,. **1**(3): p. 141-169.

165. Ulrich-Lai, Y.M. and J.P. Herman, (2009) *Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses.* Nat Rev Neurosci,. **10**(6): p. 397-409.

166. de Kloet, E.R., M. Joëls, and F. Holsboer, (2005) *Stress and the brain: from adaptation to disease.* Nat Rev Neurosci,. **6**(6): p. 463-75.

167. Fenoglio, K.A., K.L. Brunson, and T.Z. Baram, (2006) *Hippocampal neuroplasticity induced by early-life stress: functional and molecular aspects.* Front Neuroendocrinol,. **27**(2): p. 180-92.

168. Machado, B.H., (2001) *Neurotransmission of the cardiovascular reflexes in the nucleus tractus solitarii of awake rats.* Ann N Y Acad Sci,. **940**: p. 179-96.

169. Zoccal, D.B., W.I. Furuya, M. Bassi, D.S. Colombari, and E. Colombari, (2014) *The nucleus of the solitary tract and the coordination of respiratory and sympathetic activities.* Front Physiol,. **5**: p. 238.

170. Aston-Jones, G., J. Rajkowski, P. Kubiak, R.J. Valentino, and M.T. Shipley, *Chapter 23 Role of the locus coeruleus in emotional activation*, in Holstege, G., Bandler, R., and Saper, C., B. (ed.) *Progress in Brain Research*,. San Diego, Elsevier. 1996: 379-402.

171. Valentino, R.J. and E. Van Bockstaele, (2008) *Convergent regulation of locus coeruleus activity as an adaptive response to stress.* Eur J Pharmacol,. **583**(2-3): p. 194-203.

172. Cunningham, E.T., Jr. and P.E. Sawchenko, (1988) *Anatomical specificity of noradrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus.* J Comp Neurol,. **274**(1): p. 60-76.

173. Dempsey, B., S. Le, A. Turner, P. Bokiniec, R. Ramadas, J.G. Bjaalie, C. Menuet, R. Neve, A.M. Allen, A.K. Goodchild, and S. McMullan, (2017) *Mapping and Analysis of the Connectome of Sympathetic Premotor Neurons in the Rostral Ventrolateral Medulla of the Rat Using a Volumetric Brain Atlas.* Frontiers in Neural Circuits,. **11**(9).

174. Saper, C.B. and R.L. Stornetta, *Central autonomic system*, in Paxinos, G. (ed.) *The rat nervous system*. San Diego, Elsevier. 2015: 629-673.

175. Herman, J.P., M.M. Ostrander, N.K. Mueller, and H. Figueiredo, (2005) *Limbic system mechanisms of stress regulation: Hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis.* Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry,. **29**(8): p. 1201-1213.

176. Sara, S.J., (2009) *The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition.* Nat Rev Neurosci,. **10**(3): p. 211-23.

177. Radley, J.J., C.M. Arias, and P.E. Sawchenko, (2006) *Regional differentiation of the medial prefrontal cortex in regulating adaptive responses to acute emotional stress.* Journal of Neuroscience,. **26**(50): p. 12967-12976.

178. Jones, K.R., B. Myers, and J.P. Herman, (2011) *Stimulation of the prelimbic cortex differentially modulates neuroendocrine responses to psychogenic and systemic stressors.* Physiology & behavior,. **104**(2): p. 266-271.

179. Herman, J.P., H. Figueiredo, N.K. Mueller, Y. Ulrich-Lai, M.M. Ostrander, D.C. Choi, and W.E. Cullinan, (2003) *Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo–pituitary–adrenocortical responsiveness.* Frontiers in neuroendocrinology,. **24**(3): p. 151-180.

180. Bains, J.S., J.I.W. Cusulin, and W. Inoue, (2015) *Stress-related synaptic plasticity in the hypothalamus.* Nature Reviews Neuroscience,. **16**(7): p. 377-388.

181. Chandler, D.J., B.D. Waterhouse, and W.-J. Gao, (2014) *New perspectives on catecholaminergic regulation of executive circuits: evidence for independent modulation of prefrontal functions by midbrain dopaminergic and noradrenergic neurons.* Frontiers in Neural Circuits,. **8**(53).

182. Pelletier, J.G., E. Likhtik, M. Filali, and D. Paré, (2005) *Lasting increases in basolateral amygdala activity after emotional arousal: implications for facilitated consolidation of emotional memories.* Learning & memory,. **12**(2): p. 96-102.

183. Roozendaal, B., B.S. McEwen, and S. Chattarji, (2009) *Stress, memory and the amygdala.* Nature Reviews Neuroscience,. **10**(6): p. 423-433.

184. Prewitt, C.M. and J.P. Herman, (1998) *Anatomical interactions between the central amygdaloid nucleus and the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat: a dual tract-tracing analysis.* Journal of chemical neuroanatomy,. **15**(3): p. 173-186.

185. Do-Monte, F.H., K. Quinones-Laracuente, and G.J. Quirk, (2015) *A temporal shift in the circuits mediating retrieval of fear memory.* Nature,. **519**(7544): p. 460-463.

186. LeDoux, J., (2012) *Rethinking the emotional brain.* Neuron,. **73**(4): p. 653-676.

187. Barbas, H. and G.J. Blatt, (1995) *Topographically specific hippocampal projections target functionally distinct prefrontal areas in the rhesus monkey.* Hippocampus,. **5**(6): p. 511-533.

188. Janak, P.H. and K.M. Tye, (2015) *From circuits to behaviour in the amygdala.* Nature,. **517**(7534): p. 284-292.

189. Radley, J., D. Morilak, V. Viau, and S. Campeau, (2015) *Chronic stress and brain plasticity: mechanisms underlying adaptive and maladaptive changes and implications for stress-related CNS disorders.* Neuroscience & Biobehavioral Reviews,. **58**: p. 79-91.

190. Godsil, B.P., J.P. Kiss, M. Spedding, and T.M. Jay, (2013) *The hippocampal–prefrontal pathway: the weak link in psychiatric disorders?* European Neuropsychopharmacology,. **23**(10): p. 1165-1181.

191. Bagot, R.C., E.M. Parise, C.J. Peña, H.X. Zhang, I. Maze, D. Chaudhury, B. Persaud, R. Cachope, C.A. Bolaños-Guzmán, J.F. Cheer, K. Deisseroth, M.H. Han, and E.J. Nestler, (2015) *Ventral hippocampal afferents to the nucleus accumbens regulate susceptibility to depression.* Nat Commun,. **6**: p. 7062.

192. Cullinan, W.E., J.P. Herman, and S.J. Watson, (1993) *Ventral subicular interaction with the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence for a relay in the bed nucleus of the stria terminalis.* Journal of Comparative Neurology,. **332**(1): p. 1-20.

193. Canteras, N. and L. Swanson, (1992) *Projections of the ventral subiculum to the amygdala, septum, and hypothalamus: a PHAL anterograde tract-tracing study in the rat.* Journal of Comparative Neurology,. **324**(2): p. 180-194.

194. Herman, J.P., C.M.-F. Prewitt, and W.E. Cullinan, (1996) *Neuronal circuit regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical stress axis.* Critical Reviews™ in Neurobiology,. **10**(3-4).

195. Jacobson, L. and R. Sapolsky, (1991) *The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis.* Endocrine reviews,. **12**(2): p. 118-134.

196. Herman, J.P. and N.K. Mueller, (2006) *Role of the ventral subiculum in stress integration.* Behavioural brain research,. **174**(2): p. 215-224.

197. McCarty, R., *The Fight-or-Flight Response: A Cornerstone of Stress Research*, In: Fink, G. (ed.), *Stress: Concepts, Cognition, Emotion, and Behavior*. Academic Press, San Diego, 2016: 33-37.

198. McEwen, B.S., *Central Role of the Brain in Stress and Adaptation: Allostasis, Biological Embedding, and Cumulative Change*, In: Fink, G. (ed.), *Stress: Concepts, Cognition, Emotion, and Behavior*. Academic Press, San Diego, 2016: 39-55.

199. Goto, Y., S. Otani, and A. Grace, (2007) *The Yin and Yang of dopamine release: A new perspective.* Neuropharmacology,. **53**: p. 583-7.

200. Adamec, R., A. Holmes, and J. Blundell, (2008) *Vulnerability to lasting anxiogenic effects of brief exposure to predator stimuli: sex, serotonin and other factors-relevance to PTSD.* Neurosci Biobehav Rev,. **32**(7): p. 1287-92.

201. Swanson, L.W., P.E. Sawchenko, J. Rivier, and W.W. Vale, (1983) *Organization of Ovine Corticotropin-Releasing Factor Immunoreactive Cells and Fibers in the Rat Brain: An Immunohistochemical Study.* Neuroendocrinology,. **36**(3): p. 165-186.

202. Chen, Y., R.A. Bender, M. Frotscher, and T.Z. Baram, (2001) *Novel and transient populations of corticotropin-releasing hormone-expressing neurons in developing hippocampus suggest unique functional roles: a quantitative spatiotemporal analysis.* J Neurosci,. **21**(18): p. 7171-81.

203. Kozicz, T., (2007) *On the role of urocortin 1 in the non-preganglionic Edinger-Westphal nucleus in stress adaptation.* Gen Comp Endocrinol,. **153**(1-3): p. 235-40.

204. Koob, G.F., (2008) *A role for brain stress systems in addiction.* Neuron,. **59**(1): p. 11-34.

205. Young, E.A., J. Abelson, and S.L. Lightman, (2004) *Cortisol pulsatility and its role in stress regulation and health.* Front Neuroendocrinol,. **25**(2): p. 69-76.

206. Karssen, A.M., O.C. Meijer, I.C. van der Sandt, P.J. Lucassen, E.C. de Lange, A.G. de Boer, and E.R. de Kloet, (2001) *Multidrug resistance P-glycoprotein hampers the access of cortisol but not of corticosterone to mouse and human brain.* Endocrinology,. **142**(6): p. 2686-94.

207. Shapey, J., A. Toma, and S.R. Saeed, (2019) *Physiology of cerebrospinal fluid circulation.* Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg,. **27**(5): p. 326-333.

208. Chiu, C., M.C. Miller, I.N. Caralopoulos, M.S. Worden, T. Brinker, Z.N. Gordon, C.E. Johanson, and G.D. Silverberg, (2012) *Temporal course of cerebrospinal fluid dynamics and amyloid accumulation in the aging rat brain from three to thirty months.* Fluids and Barriers of the CNS,. **9**(1): p. 3.

209. Oshio, K., H. Watanabe, Y. Song, A.S. Verkman, and G.T. Manley, (2005) *Reduced cerebrospinal fluid production and intracranial pressure in mice lacking choroid plexus water channel Aquaporin-1.* Faseb j,. **19**(1): p. 76-8.

210. Agnati, L.F., D. Guidolin, M. Guescini, S. Genedani, and K. Fuxe, (2010) *Understanding wiring and volume transmission.* Brain Res Rev,. **64**(1): p. 137-59.

211. Agnati, L.F., M. Zoli, I. Strömberg, and K. Fuxe, (1995) *Intercellular communication in the brain: wiring versus volume transmission.* Neuroscience,. **69**(3): p. 711-26.

212. Chen, K.C. and C. Nicholson, (2000) *Changes in brain cell shape create residual extracellular space volume and explain tortuosity behavior during osmotic challenge.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,. **97**(15): p. 8306-8311.

213. Barañano, D., C. Ferris, and S. Snyder, (2001) *Atypical neural messengers.* Trends in Neurosciences,. **24**: p. 99-106.

214. Guidolin, D., K. Fuxe, G. Neri, G.G. Nussdorfer, and L.F. Agnati, (2007) *On the role of receptor-receptor interactions and volume transmission in learning and memory.* Brain Res Rev,. **55**(1): p. 119-33.

215. Mittelbrunn, M. and F. Sánchez-Madrid, (2012) *Intercellular communication: diverse structures for exchange of genetic information.* Nat Rev Mol Cell Biol,. **13**(5): p. 328-35.

216. Zoli, M., Å. Jansson, E. Syková, L. Agnati, and K. Fuxe, (1999) *Volume transmission in the CNS and its relevance for neuropsychopharmacology.* Trends in pharmacological sciences,. **20 4**: p. 142-50.

217. Palkovits, M., (1973) *Isolated removal of hypothalamic or other brain nuclei of the rat.* Brain Res,. **59**: p. 449-50.

218. Gulyás, M., N. Bencsik, S. Pusztai, H. Liliom, and K. Schlett, (2016) *AnimalTracker: An ImageJ-Based Tracking API to Create a Customized Behaviour Analyser Program.* Neuroinformatics,. **14**(4): p. 479-81.

219. J. Mulder, M.Z., L. Spence, G. Tortoriello, M. Uhlen, Y. Yanagawa, F. Aujard, and T.H. T. Hokfelt, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106.* 2009: p. 22492-22497.

220. J. Mulder, L.S., G. Tortoriello, J.A. Dinieri, M. Uhlen, B. Shui, M.I. Kotlikoff, Y. and F.A. Yanagawa, T. Hokfelt, Y.L. Hurd, T. Harkany, *European Journal of Neuroscience 31.* 2010: p. 2166-2177.

221. Ong, L.K., L. Sominsky, P.W. Dickson, D.M. Hodgson, and P.R. Dunkley, (2012) *The sustained phase of tyrosine hydroxylase activation in vivo.* Neurochem Res,. **37**(9): p. 1938-43.

222. *Allen Brain Atlas: Mouse Brain*.

223. Zahola, P., J. Hanics, A. Pintér, Z. Máté, A. Gáspárdy, Z. Hevesi, D. Echevarria, C. Adori, S. Barde, B. Törőcsik, F. Erdélyi, G. Szabó, L. Wagner, G.G. Kovacs, T. Hökfelt, T. Harkany, and A. Alpár, (2019) *Secretagogin expression in the vertebrate brainstem with focus on the noradrenergic system and implications for Alzheimer's disease.* Brain Struct Funct,. **224**(6): p. 2061-2078.

224. Celio, M.R., (1990) *Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system.* Neuroscience,. **35**(2): p. 375-475.

225. Jacobowitz, D.M. and L. Winsky, (1991) *Immunocytochemical localization of calretinin in the forebrain of the rat.* J Comp Neurol,. **304**(2): p. 198-218.

226. Faragó, A., *Enzimek*. In: Ádám, V. (ed.), *Orvosi biokémia*. Semmelweis Kiadó, Budapest, 2016: 21-42.

227. Ross, M., *Histology: A Text and Atlas*. Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health, Philadelphia, 2011.

228. Massaro, A.R., C. Soranzo, and A. Carnevale, (1997) *Cerebrospinal-fluid ciliary neurotrophic factor in neurological patients.* Eur Neurol,. **37**(4): p. 243-6.

229. Kepa, L., (2012) *[Evaluation of the concentration of cerebrospinal fluid ciliary neurotrophic factor (CNTF) in patients with purulent, bacterial meningitis--own observations]*. Przegl Epidemiol,. **66**(3): p. 425-30.

230. McNaughton, N. and P.J. Corr, (2004) *A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance.* Neurosci Biobehav Rev,. **28**(3): p. 285-305.

231. Schwabe, L., (2017) *Memory under stress: from single systems to network changes.* Eur J Neurosci,. **45**(4): p. 478-489.

232. Alpár, A., P. Zahola, J. Hanics, Z. Hevesi, S. Korchynska, M. Benevento, C. Pifl, G. Zachar, J. Perugini, I. Severi, P. Leitgeb, J. Bakker, A.G. Miklosi, E. Tretiakov, E. Keimpema, G. Arque, R.O. Tasan, G. Sperk, K. Malenczyk, Z. Máté, F. Erdélyi, G. Szabó, G. Lubec, M. Palkovits, A. Giordano, T.G. Hökfelt, R.A. Romanov, T.L. Horvath, and T. Harkany, (2018) *Hypothalamic CNTF volume transmission shapes cortical noradrenergic excitability upon acute stress.* Embo j,. **37**(21).

11. Saját publikációk jegyzéke

11.1. A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

Zahola P, Hanics J, Pintér A, Máté Z, Gáspárdy A, Hevesi Z, Echevarria D, Adori C, Barde S, Törőcsik B, Erdélyi F, Szabó G, Wagner L, Kovacs G, 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.

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.

11.2. 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.

12. Köszönetnyilvánítás

Először is szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Prof. Alpár Alánnak, aki nélkül e disszertáció alapját képező kutatómunka nem valósulhatott volna meg. Hálás vagyok, hogy nyolc évvel ezelőtt csatlakozhattam laborjához, és megismerhettem. Hatalmas tudása, precizitása, emberséges hozzáállása, valamint tudomány iránti elhivatottsága, mely alázattal és szerénységgel párosul valóságos példaképpé tette őt számomra.

Köszönettel tartozom a Kísérletes Neuroanatómiai és Fejlődésbiológiai Csoport valamennyi munkatársának, kiváltképp Dr. Hanics Jánosnak, Németh Andreának és Hevesi Zsófiának, akik megannyi kísérlet tervezésében, kivitelezésében segítségemre voltak, türelemmel és higgadtsággal válaszolták meg a felmerülő kérdéseimet, hasznos módszertani tippekkel láttak el, és azon túl, hogy bevezettek a kísérletes munka világába, mindig kellemes, jó hangulatot biztosítottak a laborban.

Hálával tartozom Prof. Harkány Tibornak és munkacsoportjának, akik világviszonylatban is élenjáró szakmai tudásuk, metodikai ismereteik és laborjuk eszközparkja révén igen nagy mértékben hozzájárultak a kísérletes adathalmaz gyarapodásához, továbbá a megosztott első szerzős közleményem kéziratának kiteljesedéséhez.

Köszönetet szeretnék mondani Deák Szilviának, hogy az állatkísérletek végzésénél fáradhatatlan segítőm volt, időt és energiát nem sajnálva dolgozott a kezem alá, és mozdította elő a műtői folyamatok gördülékenységét. Köszönöm Gróti Zoltánnak, hogy a kísérleti állatoknak megfelelő gondját viselte, a kísérleti feltételeket mindig biztosította számomra.

Hálásan köszönöm az Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet valamennyi munkatársának, hogy egy támogató és motiváló környezetben végezhettem kutatómunkámat, és tölthetem napjaimat.

Végül, de nem utolsó sorban ezúton is köszönetemet szeretném kifejezni családomnak és barátaimnak, amiért mellettem álltak, bátorítottak, valamint ha kétségeim támadtak, segítettek a helyes út megtalálásában.