



**Állatorvostudományi
Egyetem**

Anatómiai és Szövettani Tanszék

TDK DOLGOZAT

Az amygdala érzelmi aktivitásának feltérképezése korai aktivációjú génkifejeződés vizsgálatával

Dolgozat készítő neve: Szeidl Réka

Témavezető: Dr. Mátyás Ferenc

MTA Természettudományi Kutatóközpont és az Állatorvostudományi
Egyetem Anatómiai és Szövettani tanszék tudományos főmunkatársa

Annotáció

Az embert nap mint nap érik különböző környezeti és társadalmi behatások, legyen szó akár pozitív vagy negatív, másik embertárstól származó (szociális) vagy személytől független (nem szociális) eseményekről. A különböző ingerek hatására érzelmek, az érzelmek hatására pedig viselkedési formák alakulnak ki. Ilyen érzelem például az öröm vagy a félelem. Számos olyan mentális betegség ismert, melyekben a megfelelő válaszreakció hiánya vagy éppen a fokozott megléte okoz problémákat, kihatva az ember életére, társas kapcsolataira, munkájára és egyes esetekben még a fizikális egészségére is. Viszont ahhoz, hogy ezek gyógyíthatók legyenek, először a betegségért felelős agyi mechanizmusokat kell megérteni.

A szakirodalmi adatok és az eddigi eredményeink szerint az amygdala komplex elsődleges szerepet játszhat az érzelmeken alapuló viselkedésformák kialakulásában. Különösen 4 almagja kapott az eddigiekben kitüntetett szerepet: a laterális (LA), basolaterális (BA), a centrális amygdala (CeA) és az ezek körül elhelyezkedő interkaláris sejtcsoport (ITC). Felmerül a kérdés, hogy valamennyi azonos módon vesz-e részt az egyes behatásokra kialakított válaszreakciókban.

Ennek megválaszolására kísérleti modellállatként hím egereket tettünk ki különböző ingereknek, majd korán aktiválódó gén, a c-Fos expressziójának feltérképezésével vizsgáltuk meg a 4 amygdaláris mag aktiválódását. A negatív szociális ingerként alkalmazott természetes predátor (macska, róka) szag és a negatív nem-szociális inger, a félelmi kondicionálás félelem érzetet (ledermedést) váltott ki. Pozitív (örömrzet) szociális ingerként hormonnal kezelt nőtényt helyeztünk a kísérleti állat mellé, míg nem-szociális behatásként cukrozott tejet alkalmaztunk. A behatások után 60 perccel az egereket perfundáltuk és az agymetszeteiken hisztokémiai festéseket végeztünk.

Peroxidáz és többszörös fluoreszcens immunfestési eljárások során megjelenítettük az inger-aktivált, cFos fehérjét termelő idegsejteket, valamint különböző neurokémiai markerekkel azonosítottuk az egyes

amygdala magokat. Előzetes eredményeink alapján megállapítható, hogy az egyes behatások más-más amygdala területen okoztak idegsejt aktivációt (pl. cukrozott tej a centrális amygdalában és félelmi kondicionálás a laterális amygdalában), melyek hozzájárulhatnak a megfelelő érzelmi reakciók kialakulásához.

Ezen eredmények segítségével pontosabb képet kaphatunk arról, hogy mely érzelmi behatások melyik amygdaláris hálózatot aktiválják, hozzájárulva a stimulushoz kapcsolható mentális betegség (pl. kóros zabálás vagy pánik-betegségek) mögött meghúzódó agyi folyamatok megértéséhez.

Annotation

People are exposed to various, positive or negative, social or non-social effects on a daily basis. These stimuli cause emotions leading to appropriate behavioural responses. Such emotions are, for example, joy or fear. There are many mental disorders which are caused by the lack or exaggeration of correct emotional responses. These affect people's lives, their social connections, jobs or even their physical health. To find an effective treatment, the first step is to understand the brain mechanisms leading to these abnormal conditions.

According to the literature and our previous results, the amygdala complex plays a pivotal role in the development of emotion-related behaviours. Especially four of the amygdaloid subregions are accepted to be crucial in behavioural responses such as the lateral, the basolateral, the central amygdala and the so-called intercalated cells mass. The question arises whether all of these amygdalar regions are equally involved in the responses to each effect.

To answer this, we used animal models. Male mice were exposed to various positive/negative/social and non-social stimuli. Then, the activation of the four amygdalar nuclei was examined via mapping the expression of an early immediate gene, the c-Fos. The natural predator's (cat or fox) smell was used as a negative social stimulus and a fear conditioning as a negative non-social stimulus; both causing fear responses (freezing). A hormone-treated female was placed next to the male as a positive social stimulus, while sugared milk was used as a non-social stimulus; both are widely accepted to be causing pleasure for a male mouse. Sixty minutes after a stimulus presentation, mice were perfused, and the prepared brain slices went through various histochemical procedures.

Stimulus-activated c-Fos expressing neurons were visualised with either peroxidase or multiple fluorescent immunostaining approaches meanwhile each amygdala nucleus was identified with different neurochemical markers. Based on our preliminary results, stimulus-specific activation patterns were found. E.g. sugared milk caused c-Fos activation

primarily in the central amygdala labelled with delta isoform of protein kinase C (PKC δ) while fear conditioning in the lateral amygdala (marked with dense calretinin immunostaining). Thus, these amygdaloid subregions may contribute to the development of corresponding emotional responses.

Completing our investigations, our results will provide a more accurate picture about the functional organization of the amygdala complex by identifying emotion-specific activation patterns in distinct amygdalar microcircuits. These can contribute to our better understanding of brain mechanisms leading to the development of mental disorders, such as binge eating or panic disorder.

Tartalom

Annotáció.....	2
Annotation.....	4
Rövidítések jegyzéke	8
1. Bevezetés/Irodalmi áttekintés	10
1.1. Ingerek és az azokra adott válaszreakciók	10
1.2. Amygdala	11
1.2.1. A laterális amygdala (LA).....	12
1.2.2. A basolaterális amygdala (BA)	13
1.2.3. A centrális amygdala (CeA).....	13
1.2.4. Az interkaláris amygdaláris (ITC) sejtek	14
1.3. Idegsejt aktivitásának anatómiai vizsgálata	15
1.4. Az amygdala almagjainak meghatározása	15
2. Célkitűzések.....	17
3. Anyag és módszerek	18
3.1. Magatartás vizsgálati módszerek	18
3.1.1. Negatív veleszületett hatás	18
3.1.2. Pozitív veleszületett hatás	18
3.2. Perfúzió	19
3.3. Hisztokémiai kísérletek.....	20
3.3.1. Fluoreszcens festések	20
3.3.2. DAB-Nikkel festés	21
3.4. Mikroszkópia.....	21
4. Eredmények	23
4.1. cFos expresszió az amygdalában.....	23
4.2. Az amygdaláris területek azonosítása	23
4.4. Sejtaktiváció negatív ingerek hatására	24

4.5. Sejtaktiváció pozitív ingerek hatására	26
6. Diskusszió	28
7. Kitekintés	30
8. Irodalomjegyzék	30
9. Köszönetnyilvánítás	34

Rövidítések jegyzéke

ABC – Avidin-Biotin Complex

Amy – amygdala

Astr – amygdalostriatal transition area

BA – basális amygdala

BM – basomediális amygdala

CeA – centrális amygdala

CeL – centrolaterális amygdala

CeM – centromediális amygdala

ChAT – kolin-acetil-transzferáz enzim

CPu – caudate putamen

CR – calretinin

dm-ITC – dorsomediális interkaláris amygdaláris sejtek

ec – external capsule

FoxP2 – Forkhead box protein P2

GABA – γ -amino-vajsav

ITC – interkalát amygdaláris sejtek

LA – laterális amygdala

LGP – lateral globus pallidus

l-ITC laterális interkaláris amygdaláris sejtek

MeA – mediális amygdala

PIL – posterior intralaminar nucleus

Pir – piriform cortex

PKC δ – protein-kináz C delta

SG – superior colliculus

SIC – felső interkaláris magcsoport (supra-intercalated cluster)

TMT – Trimethylthiazoline (róka vizelet kivonat)

vGLUT2 – 2-es típusú vezikuláris glutamát transzporter

v-ITC ventrális interkaláris amygdaláris sejtek

1. Bevezetés/Irodalmi áttekintés

1.1. Ingerek és az azokra adott válaszreakciók

Az embert nap mint nap érik különböző behatások, legyen szó akár pozitív vagy negatív, másik embertárstól származó (szociális) vagy személytől független (nem szociális) eseményekről. A különböző ingerek érzelmeket, az érzelmek pedig viselkedési formákat váltanak ki. Ehhez a folyamathoz először szükség van egy motivációra, ami az egész viselkedés alappillére. Ilyen alapmotiváció az éhség, a szomjúság, a fájdalom vagy a szexualitás. Ezeknek a motivációknak, illetve a külső ingereknek az együtt hatása alakítja ki az érzelmeket. Hat alapérzelem fajtát szokás megkülönböztetni: ezek az öröm, a bánat, a düh, a meglepődés, a félelem és az undor. Mindegyik ösztönös és minden fejlettebb állatban megfigyelhetők.

Ezek az érzelmek viselkedés mintázatokban fejeződnek ki. Ezeket a magatartásformákat különböző szempontok szerint lehet csoportosítani. Beszélhetünk társas vagy egyénnel kapcsolatos viselkedésről. Attól függően, hogy hogyan alakul ki az adott válaszreakció lehet szó ösztönös vagy tanult magatartásról. Ezek pedig együttesen vizsgálhatóak abból a szempontból, hogy az inger pozitív vagy negatív érzelmeket vált ki az állatnál. Kutatócsoportunk korábbi kísérlete során a negatív, antiszociális, tanult magatartásformát vizsgálta félelmi kondicionálás során (Barsy, Mátyás és mtsai, 2020). Ebben a kísérletben pedig modelleztük a negatív behatás által kiváltott antiszociális, ösztönös, valamint a pozitív behatás által kiváltott ösztönös szociális és antiszociális viselkedésformákat.

Napjainkban számos olyan mentális betegség ismeretes, melyeknek az alapja valamelyik érzelemfajta. A megfelelő válaszreakció hiánya vagy éppen a fokozott megléte okozhat problémákat, melyek kihatnak az ember életére, társas kapcsolataira, munkájára és egyes esetekben még a fizikális egészségére is. Ide sorolhatjuk a különböző fóbiákat, a depressziót, vagy a félelem érzet hiányát, a Klüver-Bucy szindrómát is. Ezeknek a betegségeknek a kezelése csak részben megoldott, de számos mellékhatás (pl. szedatív hatás) révén széleskörű alkalmazása kétséges, így szükséges lenne célratörőbb, specifikusabb gyógymódokat kifejleszteni.

Viszont ahhoz, hogy egy ilyen gyógymód felállítható vagy akár egy gyógyszer előállítható legyen először a betegségért felelős agyi mechanizmusokat kell megérteni, a résztvevő agyterületet azonosítani, sejteinek működését, a többi agyi struktúrákkal való kapcsolatát megismerni. Csak ezután lehet a károsodott rendszer helyreállítására megoldást találni.

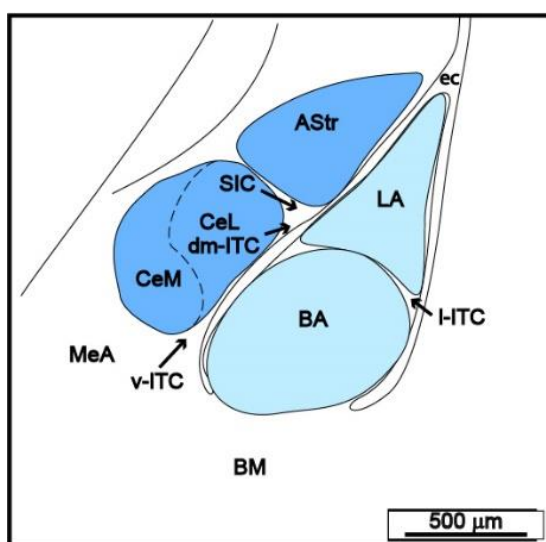
Kutatásunk során ezeknek az általános érzelmeknek és a válaszreakcióknak a kialakulási helyét igyekeztünk feltárni. Arra voltunk kíváncsiak, hogy mely agyi struktúrák, milyen neuronok vehetnek részt ezekben a folyamatokban. Köztudott, hogy az érzelmek és az affektív reakciók kialakulásában elsődleges szerepet játszik az amygdala (Amy), ezért ezt az agyterületet kezdtük el tüzetesebben átvizsgálni.

Kutatócsoportunk korábban azonosította, hogy félelmi tanulás (kondicionálás) során mely Amy almagok mutatnak aktiváció változást (Barsy, Mátyás és mtsai, 2020). A legerősebb aktivációt egy speciális GABAerg sejtekből álló interkaláris sejtcsoportban (ITC) találták, ugyanakkor számos Amy terület egyáltalán nem mutatott eltérést a kontrollokhöz képest. Vagyis az alkalmazott negatív és tanulásra alapuló magatartásforma egy jellegzetes almag-szelektív 'reakciót' váltott ki. Ezekből az adatokból kiindulva arra kerestük a választ, hogy az ösztönös viselkedésformák ehhez hasonló vagy eltérő aktivitásmintázatot eredményeznek az Amy területén.

1.2. Amygdala

Az Amy egy ősi agyi struktúra, ami az evolúció során keveset változott, ezért is lehet arra következtetni, hogy szerepe lehet az alapvető és általános érzelmi folyamatokban (Janak és Tye, 2015). Számos kutatás szolgáltat bizonyítékot arra, hogy az egyszerűbb szervezetek, mint például az egér amygdalájának felépítése nagyon hasonló az emberéhez. Ezért választottuk az egeret, mint kísérleti modellt, mert így valós adatokat kaphatunk erről az agyterületről.

Az Amy egy mandula alakú, több magból álló agyi struktúra, amely a temporális lebeny mediális részén helyezkedik el. Két fő részből áll össze: laterálisan az agykérgi, idegen szóval a kortikális rész, mediálisabban pedig a törzsdúci, azaz a striatális régió alkotja. Ez a két terület tovább bontható almagokra. A kortikális részt a laterális (LA), a bazális (BA) és a bazomediális (BM) magok alkotják. (Sok szakirodalom a basalis és lateralis területeket együtt kezeli és basolaterális (BLA) amygdalaként említi, azonban szerintünk ez pontatlan területkijelölés, hiszen ezek a területek mind felépítésükben, mind funkciójukban eltérnek egymástól.) A striatális rész pedig a centrális amygdalából (CeA), amygdalostriatal transtition area-ból (Astr) és a mediális amygdalából (MeA) tevődik össze. Ezeken a területeken kívül meg kell említenünk egy, a közelmúltban leírt amygdaláris sejtcsoportot, az interkaláris (ITC) sejteket, melyek a többi almag között és azok körül helyezkednek el és jelentős hatással bírnak a tanult félelmi magatartásformák megjelenésére (Likhtik és mtsai, 2008; Busti és mtsai, 2011; Asade és mtsai, 2015). A szakirodalomban leírt tények, illetve az eddigi kutatások alapján 4 amygdala területet (LA, BA, CeA, ITC; 1. ábra) kezdtük el vizsgálni, mert hipotézisünk szerint ezek a sejtek játszhatnak fontos szerepet a félelem és egyéb érzelmi reakciók kialakulásában.



1. ábra – amygdala felépítése.

ec – external capsule, AStr – amygdalostriatal transition area, LA – laterális amygdala, BA – basális amygdala, BM – basomediális amygdala, CeL – centrolateralis amygdala, CeM – centromediális amygdala, MeA – mediális amygdala, SIC – supra-intercalated cluster, dm-ITC – dorsomediális-ITC, v-ITC – ventrális-ITC, l-ITC – laterális-ITC.

1.2.1. A laterális amygdala (LA)

Az LA a hallással kapcsolatos információk feldolgozásának első szakasza az amygdalán belül. Direkt auditoros bemeneteket kap a

thalamusból (azon belül is főként a laterális thalamusból) és a kéregből, ezen kívül kapcsolatban áll a centrális amygdalával is (Blair, LeDoux, mtsai, 2001). Ez az agyi terület aktivitása kulcsfontosságú szerepet játszhat az asszociatív félelmi emlékek feldolgozásában (Johansen és mtsai 2010).

1.2.2. A basolaterális amygdala (BA)

A BA-t (az LA-val egyetemben) az agykérgi struktúrákhoz hasonlóan dominánsan (80-90%) glutamáterg (serkentő) neuronok alkotják. Ezek a sejtek több területtel tartanak fenn kapcsolatot, egyrészt a szomszédos BA sejtekkel lokális áramköröket létesítve, másrészt az Amy magokkal és egyéb agyi struktúrákkal (Pape és Pare, 2010). A másik fő sejttípus (10-20%), a rövid axonú GABA-erg interneuronok, gátló idegsejtek. Ez a mag multiszenzoros bemeneteket kap a thalamusból (Do Monte és mtsai, 2015, Mátyás, Komlósi és mtsai, 2018), a hippocampusból és a kortikális területekről is (Xu és mtsai, 2016). A BA-ban lévő fő sejtek axonjai a CeA felé haladnak, közben pedig szinapszisokat képeznek az ITC sejteivel is. Ezenkívül az LA sejtekkel is kapcsolatban áll. Ezekre az Amy területekre a glutamáterg neuronjaival egyformán serkentő hatással van. Fontos megemlíteni, hogy ez a terület képez kimeneti pályákat a kortikális és a striatális régiók felé (Pape és Pare, 2010). Fontos Amy terület a különböző érzelmi hatások kifejeződésében (Namburi és mtsai, 2015; Zhang és Li, 2018; Tye, 2018).

1.2.3. A centrális amygdala (CeA)

A CeA több almagra osztható, közülük a legnagyobbak a centrolaterális (CeL) és a centromediális amygdala (CeM). A CeA többségében GABA-erg idegsejtekből áll, melyek közepes méretű tüskékkel rendelkeznek, hasonlóan a striátumhoz. Erre a területre számos külső bemenet érkezik, például az agytörzsi parabrachiális magokból (Han és mtsai, 2015), a hippocampusból (Xu, Lüthi és mtsai, 2016) és a thalamusból (Penzo és mtsai, 2015, Mátyás, Komlósi és mtsai, 2018), ezen kívül sokféle neuropeptid jelentléte is megfigyelhető (Fadok és mtsai,

2018). Ezek együttesen arra utalnak, hogy a CeA-t egymástól eltérő funkciójú sejtek alkotják, melyek főként az adaptív viselkedésformák (például a védekező, vagy étvágygerjesztő reakciók) kialakításáért felelősek (Fadok és mtsai, 2018). Arányaiban sokkal kevesebb lokális áramkört tartalmaz, mint a BA, inkább külső területekre vetít, ezért ezt a magot az Amy elsődleges kimeneti régiói közé szokás sorolni. Bemeneteket ad az agytörzsi területekhez, a laterális hipothalamuszhoz, a bazális előagyhoz, striatális sejtekhez és a középagyhoz (PAG) is (Pape és Pare, 2010; Fadok és mtsai, 2018).

1.2.4. Az interkaláris amygdaláris (ITC) sejtek

Az ITC GABA-erg sejtek csoportosulása az LA, BA és a CeA magok körül, mely „kikapcsolóként” játszik szerepet gátolva a CeA kimeneti neuronjait, illetve a BA sejtjeit (Quirk és Mueller, 2008). Több kisebb sejtcsoportosulások formájában helyezkednek el. Elkülönítünk dorsomedialis-ITC-t (dm-ITC), laterális-ITC-t (l-ITC) és ventrális-ITC-t (v-ITC). Az ITC is kap érzékszervi információt a thalamusból és ezek alapján tudja szabályozni a többi amygdaláris régiót (Busti és mtsai, 2011; Asede és mtsai, 2015). Az ITC egy külön része különösen erős aktivációt mutat fájdalmi ingerre, melyet kutatócsoportunk felső interkaláris magcsoportnak (supra-intercalated cluster-nek, SIC) nevezett el (Barsy, Mátyás és mtsai, 2020). Így ezt az agyterületet is érdemes megvizsgálni a különböző előjelű és eredetű hatások közvetítésével kapcsolatban. Fontos különbség a két terület között, hogy amíg az ITC sejteket meg lehet jelölni a *Forkhead box protein P2* (FoxP2) nevű fehérje elleni immureakcióval (Lásd később), addig a SIC sejtek döntő része FoxP2 negatív.

Ezek az anatómiai kapcsolatok, neuronösszetételek, be- és kimenetek alapján úgy gondoltuk, hogy az említett magokat (LA, BA, CeA, ITC/SIC; 1. ábra) érdemes megvizsgálni az Amy-n belül. Feltételezzük, hogy a különböző érzelmek és az azok által indukált válaszreakciók kialakulásában ezen Amy területek vehetnek részt. Azonban ezeknek az Amy magoknak az elkülönítése nem igazán megoldott, és ezáltal nagyon sok ellentmondás születik.

1.3. Idegsejt aktivitásának anatómiai vizsgálata

Első lépésként igazolnunk kell, hogy az Amy-ban pozitív és negatív behatások sejtaktivációt váltanak ki. Erre a célra a korán aktiválódó, proto-onkogén cFos fehérje volt a legalkalmasabb, melyet széles körben használnak az agyi sejtek aktivitásának jelzőjeként (Sagar, Sharp és Curran, 1988, Lanuza, Moncho_Bogani és LeDoux, 2008). A cFos számos agyterületen használt sejtaktivációs marker, többek között a hipotalamusz paraventriculáris és dorsomediális magjaiban, a retrochiasmatikus terület laterális részében, valamint a mediális és a kortikális amygdala magokban is (Cullinan és mtsai, 1995). Stressz hatására is aktiválódik ez a gén, ami aztán cFos fehérjét expresszál és a sejtmagban koncentrálnak. A szakirodalom alapján az aktiváció csúcsszintje 60 perces időpontban volt megfigyelhető, 120 perccel a behatás után a markáns jelcsökkenés már látható volt. Kutatócsoportunk is széleskörben használta e megközelítést eddigi kísérleteiben. A cFos alkalmas volt a középvonali thalamus (KT) vizsgálatára (Mátyás, Komlósi és mtsai, 2018). Ezen felül az amygdaláris területeket megfigyelésére is használták félelmi kondicionálás során. A félelmi tanulás alatt a LA, a SIC, a CeM és a BM mutatott megemelkedett cFos expressziót (Barsy, Mátyás és mtsai, 2020).

1.4. Az amygdala almagjainak meghatározása

Az egyes agyterületek azonosítására a szakirodalom széleskörben elfogadott egéragy atlaszokat használ. Ilyen pl. George Paxinos és Keith B.J. Franklin által szerkesztett „The Mouse Brain” (2001) vagy az elmúlt években használt, az Allen Brain Institute által fejlesztett és szabadon használható online atlasz (<https://mouse.brain-map.org/static/atlas>). Azonban ezeknek a térképeknek megvannak a saját korlátjaik, ráadásul az eltérő nevezéktan is számos ellentmondást szül (Mátyás, Komlósi és mtsai, 2018; Barsy, Kocsis és mtsai, 2020). Ezért kutatócsoportunk a neurokémiai markerek alapján és/vagy egy adott agyterület ki- és bemeneti sajátosságai alapján kezdte el a különböző agyterületek pontos beazonosítását (Mátyás és mtsai, 2014; Mátyás, Komlósi és mtsai, 2018; Barsy, Kocsis és mtsai,

2020). Az Amy elhelyezkedésének, határaiknak az elkülönítéséhez 2 különböző markert használtunk, a FoxP2 és a PKC δ fehérjék elleni antitestet.

A FoxP2 a szinaptikus plaszticitásban szerepet játszó transzkripciós faktor. Ez egy olyan gén, amely ok-okozati összefüggésben van a beszéd és nyelv fejlődésével, énekesmadaraknál a dalok elsajátításában, előállításában és felismerésében. Egerekben a FoxP2 expressziója az agykéreg 6 rétege mellett főként az amygdalában van jelen, beleértve az interkaláris sejteket is (Campbell és mtsai, 2009, Busti és mtsai, 2011; Vicario, Mendoza és mtsai, 2016).

A protein-kináz C (PKC) egy 10 szerin/treonin kináz család, melyből számunkra a PKC δ -nak van jelentős szerepe, melyet az Amy-ban a CeA sejtek termelnek jelentős mennyiségben, így annak jelölésére használják (Haubensak és mtsai, 2010, Thompson és Neugebauer, 2017). Ezekből az adatokból kiindulva arra a következtetésre jutottunk, hogy ez a két marker megfelelő lehet az általunk vizsgálni kívánt területek kijelölésére.

A szakirodalmi adatok miatt kísérleteink során ezt a három neurológiai markert (cFos, FoxP2, PKC δ) kombinálva azonosítottuk az amygdaláris területeket és a különböző érzelmi behatások által aktiválódott sejtek elhelyezkedését.

2. Célkitűzések

Bár az Amy magok helyzetéről, kapcsolatrendszeréről és átfogó, fő funkciójukról számos tanulmány született az évek során, mégis a pontos, almagokra lebontott feladatokkal kapcsolatban sok kérdés tisztázatlan.

Célunk, hogy pontosabb képet kapjunk az amygdaláris magok szerkezetéről és funkciójáról. Kíváncsiak vagyunk arra, hogy a különböző érzelmi viselkedésformák kialakulásáért vagy éppen gátlásáért mely területek felelősek és ezek milyen mértékben vesznek részt az idegi folyamatokban. Azonban ahhoz, hogy fel tudjuk térképezni ezeket a régiókat és nyomon tudjuk követni a sejtaktivitást a különböző érzelmeket kiváltó ingerek hatására, szükségünk van olyan molekuláris markerekre is, melyek egyszerre jellemezhetik a vizsgálandó neuronokat.

Összegezve, a következő kérdésekre kerestük a választ:

1. Hogyan tudjuk azonosítani az egyes amygdaláris magokat?
2. Negatív, ösztönös válaszreakciók esetén ugyanazok az Amy területek aktiválódnak, mint a félelmi kondicionálás (félelmi tanulás) esetén vagy sem?
3. A különböző, pozitív/negatív, társas/nem-szociális érzelmek kialakulásáért külön régiók felelősek vagy általános aktiváció/gátlódás történik?

3. Anyag és módszerek

A kísérleteket során fiatal hím (60-80 nap; $n = 28$) egereket használtunk (C57Bl/6J), a Pest Megyei Kormányhivatal, Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Bizottsága által kiadott engedélyek szerint (PEI/001/2290-11/2015). Ezeket az állatokat különféle behatásoknak tettük ki, majd perfúziót követően immunhisztokémiai kísérleteket végeztünk az agymetszeteiken. Nőstény egereket ($n = 6$) csak a szociális interakcióban használtunk fel, további kísérletekben nem vettek részt.

3.1. Magatartás vizsgálati módszerek

A kísérleteink során választ keresünk arra a kérdésre, hogy a különböző, veleszületett viselkedésformákat kiváltó érzelmi behatásokra az egereknek mely Amy agyterületei válaszolnak. Valamennyi egér a kísérlet megkezdése előtt 1 héttel izolálva volt, és több napos kézhez szoktatás és habituáción estek át. A viselkedésteszteket Dr. Barsy Boglárka végezte az Természettudományi Kutatóközpontban.

3.1.1. Negatív veleszületett hatás

Hím egereket negatív behatásként egy ragadozó (macska, róka) szagának tettünk ki, amely ösztönös ijedtséget váltott ki (Rosen és mtsai, 2015). Az egyik csoport egerei elé róka vizelet kivonatát (TMT; Sigma) helyeztünk egy műanyag Petri-csészébe, a másik csoport pedig ugyancsak Petri-csészébe helyezett macskaszőrt (TTK) kapott 10 percre. A kontroll állatokhoz csak üres Petri-csészét helyeztünk (2. ábra). A kiváltott viselkedést videokamerával rögzítettük.

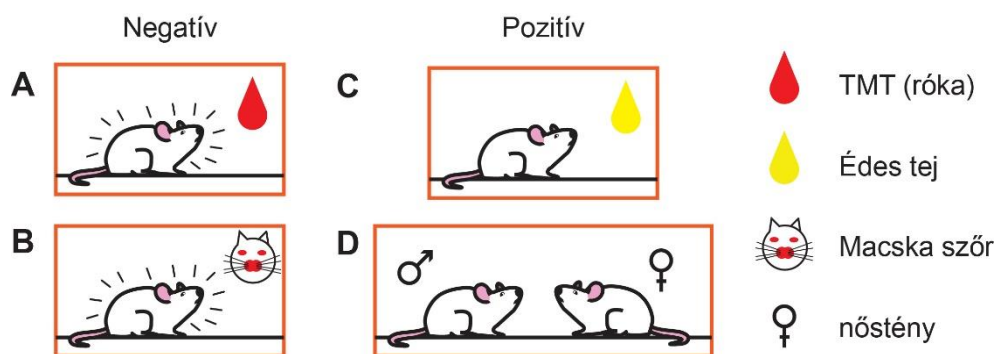
3.1.2. Pozitív veleszületett hatás

Ösztönös pozitív ingerként a hím állatok mellé nőstényeket helyeztünk. Ez egyben szociális hatásként is szolgált. Egyes esetekben pározás is történt az egyedek között, ezeket a kutatás jelen fázisában nem kezeltük külön csoportként. Nem-szociális, pozitív és veleszületett hatást

pedig sűrített, édes tejjel értük el nem szomjaztatott egereknél. A kontroll csoportnál csak a ketrechez nyúltunk, de az állatok semmit sem kaptak (2. ábra).

A nőstény jelenléte erőteljes szociális viselkedési mintázatokat váltott ki: szaglászás, exploráció, párzás. A cukrozott, sűrített tej pedig erős ivási reflexet váltott ki. Bár az állatok nem voltak szomjaztatva, jelentős mennyiségű édes tejet ittak. Mindezek megfelelnek az elvárt ösztönös magatartásformáknak.

A behatások után 60 perccel az állatokat termináltuk mély altatásos perfúzióval.



2. ábra – magatartás vizsgálati módszerek. (A-B) A hím egerek elé negatív ingerként az róka vizelet (TMT) kivonatát (A) és macskaszőrt helyeztünk (B). (C) Az állatok pozitív nem szociális ingerként édes tejet kaptak. Fontos, hogy az állatok nem voltak szomjaztatva. (D) Pozitív szociális ingerként a hím állat mellé nőstényt helyeztünk.

3.2. Perfúzió

Az állatok mellkasát mélyaltatásban (ketamin (75 mg/kg)/xylazine (5mg/kg) keveréke) felnyitottuk, majd egy kanült helyeztünk a szív bal kamrájába. Ezen a kanülön keresztül elsőként fiziológiás sóoldattal (0.9 % NaCl; 2 perc) mostuk át a keringési rendszert, másodjára pedig 4%-os paraformaldehid oldatot (0.1 M foszfát pufferben (PB) oldva, pH = 7.4) pumpáltunk a szívbe (150 ml, 20 perc). A paraformaldehid eljutott az agyat ellátó erekhez is és így fixálta az egyébként lágy szöveteket. Ezután a megfixálódott agyat eltávolítottuk a koponyából, utána pedig Leica

vibratómmal 50 µm-es metszeteket készítettünk. A metszeteket további felhasználásig etilén-glikol oldatban tároltuk mélyhűtőben.

3.3. Hisztokémiai kísérletek

3.3.1. Fluoreszcens festések

A metszeteket először jól átmostuk foszfát-pufferrel (2x gyors + 3x10 perc). Majd blokkoló oldatban inkubáltuk (10% normál szamar szérum + 0.5% Triton-X, 30 perc). A blokkolást követően került rájuk a primer antitestek keveréke (1. táblázat), majd ebben hagytuk őket egy éjszakán keresztül, szobahőmérsékleten, rázógépen.

Elsődleges Ellenanyag	Forrás	Hígítás	Inkubációs idő
Mouse anti-FoxP2	Millipore/Merck	1:2000	1 éjszaka
Rabbit anti-FoxP2	Abcam	1:2000	1 éjszaka
Rabbit anti-cFos	Millipore/Merck	1:1000	1 éjszaka
Guinea pig anti-cFos	Synaptic Systems	1:500	1 éjszaka
Mouse anti-PKCδ	BD Biosciences	1:1000	1 éjszaka

1. táblázat. A kísérleteinkben használt elsődleges ellenanyagok

Másnap ismét alaposan lemostuk őket, majd a szekunder antitesteket helyeztünk a metszetekre (2. táblázat). A szekunder antitestek a sejteken lévő primer antitestekhez kötődnek és fluoreszcens fehérjével rendelkeznek, a megfelelő hullámhosszú fény megvilágítása mellett fluoreszkálnak. Így többszörös immunreakciók során egyszerre több fehérje jelenlétét is ki lehet mutatni különböző színnel. Azért, hogy a mFoxP2 jelölése erősebb legyen horse anti-mouse biotinilált szekunder ellenanyagot is használtunk a kísérlet során. Ez úgy működik, hogy a primer antitesthez a biotinilált másodlagos ellenanyag illeszkedik, amihez kötődik egy Avidin-Biotin Complex (ABC) enzim molekula, majd a fluoreszcens-fehérjével konjugált streptavidin szubsztrátként ez az ABC köti meg, ezzel felerősítve annak a detektálható jelét. A fluoreszcens ellenanyagokat is lemostuk és a metszeteket tárgylemezre kiraktuk. Miután megszáradtak Vectashield (Vector) fedőanyaggal fedtük le őket.

Szekunder ellenanyagok	Forrás	Hígítás	Inkubációs idő
Streptavidin Alexa Fluor 488	Jackson	1:2000	2 óra
Donkey Anti-Rabbit Alexa Fluor 555	Invitrogén	1:500	2 óra
Donkey Anti-Guinea pig CY3	Jackson	1:500	2 óra
Donkey Anti-Mouse Alexa Fluor 647	Jackson	1:500	2 óra

2. táblázat. A kísérleteink során használt, fluoreszcens fehérjével kapcsolt, másodlagos ellenanyagok.

3.3.2. DAB-Nikkel festés

A cFos megjelenítéséhez ún. Ni intenzifikált 3,3'-Diaminobenzidine (DAB-Ni) jelölést alkalmaztunk. Először 1% H₂O₂ oldattal kezeltük a metszeteket (10 perc), majd blokkoló oldatban inkubáltuk őket. (10% normál szamár/kecske szérum és 0,2% Triton-X, 30 perc). Ezután került rájuk a primer cFos antitest (rabbit). Másnap először biotinilált ellenanyaggal (biotinilált kecske anti-nyúl; Vector; 2 óra), majd ABC (Vektor)-vel kezeltük a metszeteket (2 óra), majd ezek után következett a DAB-Ni oldatban történő inkubáció (20 perc). (A DABNi az alábbi összetevők alapján készült: 16 ml 0,1 M PB, pH 7.4; 1ml 0,5% DAB oldat, 6,6 mg NH₄Cl és 0,8 ml 0,05 M NiNH₄SO₄). A DAB kromogén megjelenését H₂O₂-oldattal értük el (5-10 perc). A reakciót foszfát-puffer mosásokkal állítottuk le. Végül a metszeteket xilolban dehidráltuk (2 x 10 perc) és DePex-ben (Serva) raktuk ki tárgylemezekre.

3.4. Mikroszkópia

A metszeteket fény- (Leica DM2500, kamera: Olympus DP73) és konfokális (Olympus BX61, Zeiss LSM 710) mikroszkóppal vizsgáltuk. A fénymikroszkóppal elsőként a DAB-Ni metszeteket néztük meg 5x és 10x nagyításon, hogy igazolni tudjuk a cFos expressziót az amygdaláris sejtekben. Ezután 10x nagyításon konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk a

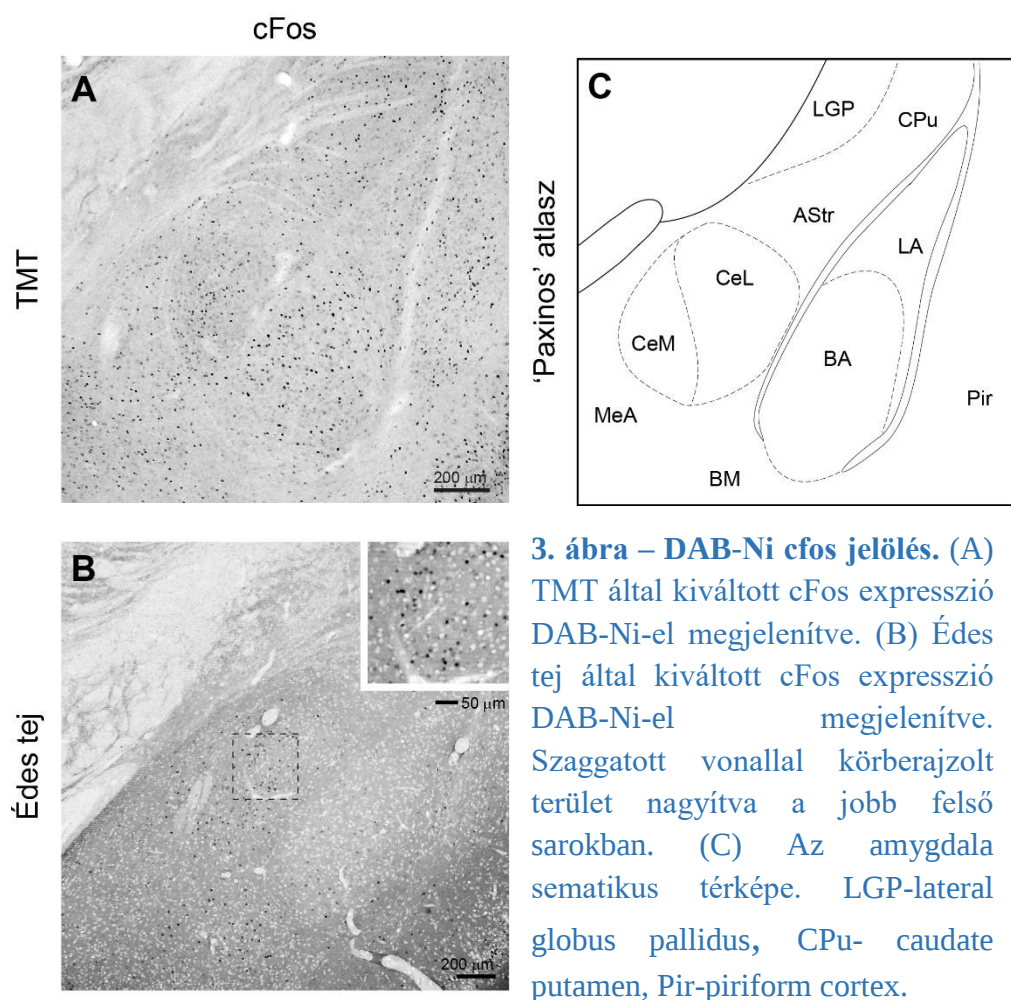
fluoreszcens festéssel készített metszeteket, hogy a cFos jelölés mely Amy területeken mutatott eltérést a kontrolokhoz képest (piros, zöld és farred színekben), majd lefotóztuk a különböző amygdaláris területeket.

A kutatásaink során eddig még csak kvalitatív vizsgálatokat végeztünk. Az eredményeink és megfigyeléseink hitelesítése érdekében a következőkben a cFos változásokat kvantifikálni fogjuk a kutatócsoport korábbi munkája alapján (Barsy, Kocsi és mtsai, 2020).

4. Eredmények

4.1. cFos expresszió az amygdalában

A DAB-Ni immunperoxidáz reakcióval készített metszetek segítségével megjelenítettük a cFos-t kifejező sejteket valamennyi kísérleti csoportban. A vártnak megfelelően a cFos jelölés homogén, pontszerű mintázatot eredményezett, utalva a sejtmag lokalizációra. Szembetűnő volt, hogy egyes hatások más-más Amy területeken váltottak ki cFos expressziót (3. ábra). Ezen területek pontos meghatározásához többszörös fluoreszcens immunfestéseket hajtottunk végre.



4.2. Az amygdaláris területek azonosítása

A FoxP2 és a PKC δ markerek segítségével sikerült pontosan beazonosítani az amygdala almagjait. A FoxP2-t zöld színben jelenítettük meg a mikroszkópos képeken. Az *external capsule* (ec), melynek

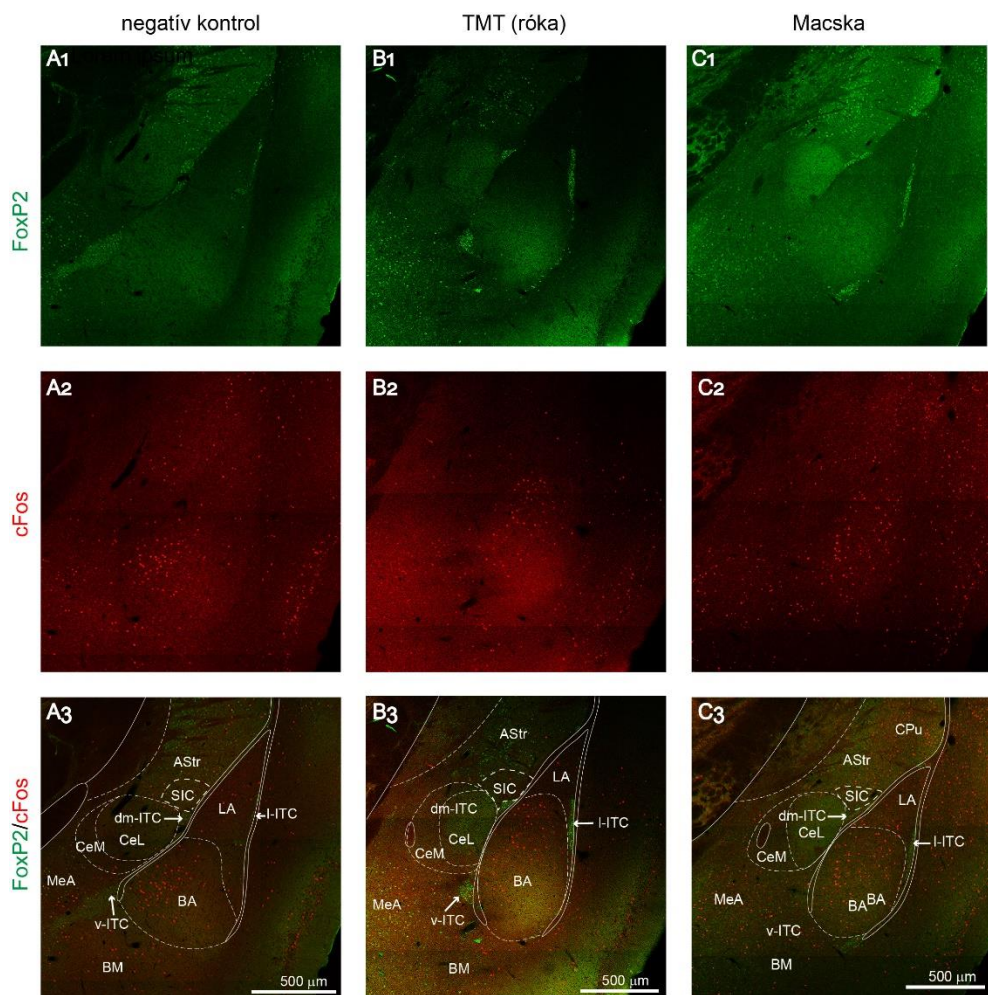
szétválásánál kezdődik az LA sötétebb maradt, ezzel szemben a FoxP2 kontrasztosan megjelenítette az Amy széli részeit egyfajta körvonalat kölcsönözve ennek az agyterületnek. 3 helyen volt kimondottan erős a FoxP2 jelölés. Egyrészt az Amy dorsomediális részén, a CeA és a BA között megjelenítve a dm-ITC-t, illetve az ettől mediálisabban lévő Astr területén. Másrészt erős jelölést lehet látni a LA laterális szélén, ahol a BA kezdődik, ez a terület felel meg a l-ITC-nek. Végül a harmadik jelölt rész a BA ventromediális sarka volt, ahol a v-ITC található. A dm-ITC felett található a SIC terület, mely főleg FoxP2 negatív sejteket tartalmaz, így ezt az almagot is könnyen be lehetett azonosítani. Így a FoxP2 jelöléssel jól azonosítható az LA+BA területe, a CeA és a LA/BA határa, illetve a BM szétválása a BA-tól (4-5. ábra).

A CeA, illetve az alterületeinek (CeM, CeL) pontos kijelölésére azonban ez a marker nem volt alkalmas. Erre a feladatra a PKC δ -t használtuk, mely egyidejűleg festhető volt a FoxP2-vel. Ez ciánkék színnel látható a képeken, azonban nem egy-egy sejtet kijelölő pontokként, hanem viszonylag homogén módon. A PKC δ a CeL GABAerg sejtjeit jelölte meg, így meghatározva ennek az almagnak a pontos területét (5. ábra).

Elmondható, hogy a FoxP2, és a PKC δ alkalmas neurológiai marker az Amy egyes területeinek az elkülönítésére.

4.4. Sejtaktiváció negatív ingerek hatására

Kutatócsoportunk előzetes munkái során igazolta, hogy félelmi kondicionálás alatt a következő amygdaláris területek aktiválódnak: a LA, a SIC/ITC, a CeM és a BM (Barsy, Mátyás és mtsai, 2020). A félelmi kondicionálás alatt kialakuló érzelmi válaszreakció (az egér ledermed a lábsokkot jelző hang hallatára) egy tanult magatartásforma. Jelen vizsgálataink célja annak kiderítése, hogy az öröklött válaszreakciók kialakulásakor ugyanezek az Amy területek aktiválódnak vagy sem.



4. ábra – Negatív behatások által kiváltott sejt aktiváció az amygdalában. (A) Egy reprezentatív egér koronális metszetén az amygdala jelölődése. A zöld szín a FoxP2 jelölést (A1), a piros a cFos expressziót ábrázolja (A2). A két festést együtt ábrázoló képen (A3) feltüntettük a FoxP2 által kijelölt területek határait. (B) Róka vizelet kivonatot kapott állat. (B1) FoxP2, (B2) cFos, (B3) Amy területek FoxP2 és cFos festés együttesen. (C) Macskaszőrt kapott állat. (C1) FoxP2, (C2) cFos, (C3) Amy területek FoxP2 és cFos festés együttesen.

Az állatokban félelem érzetét váltottunk ki különböző predátorok (róka, macska) szagával. A természetes ragadozó érzékelése az állatokban paraszimpatikus túlsúlyt, félelmet, ledermedést és a menekülés ösztönös megjelenését (ugrálást, kaparást) váltotta ki. Ez kimondottan egy öröklött magatartásmintázat. Mindkét állatcsoportban erős cFos jel látható a BA területén, viszont a LA-ban csak elszórtan található néhány aktiválódott sejt.

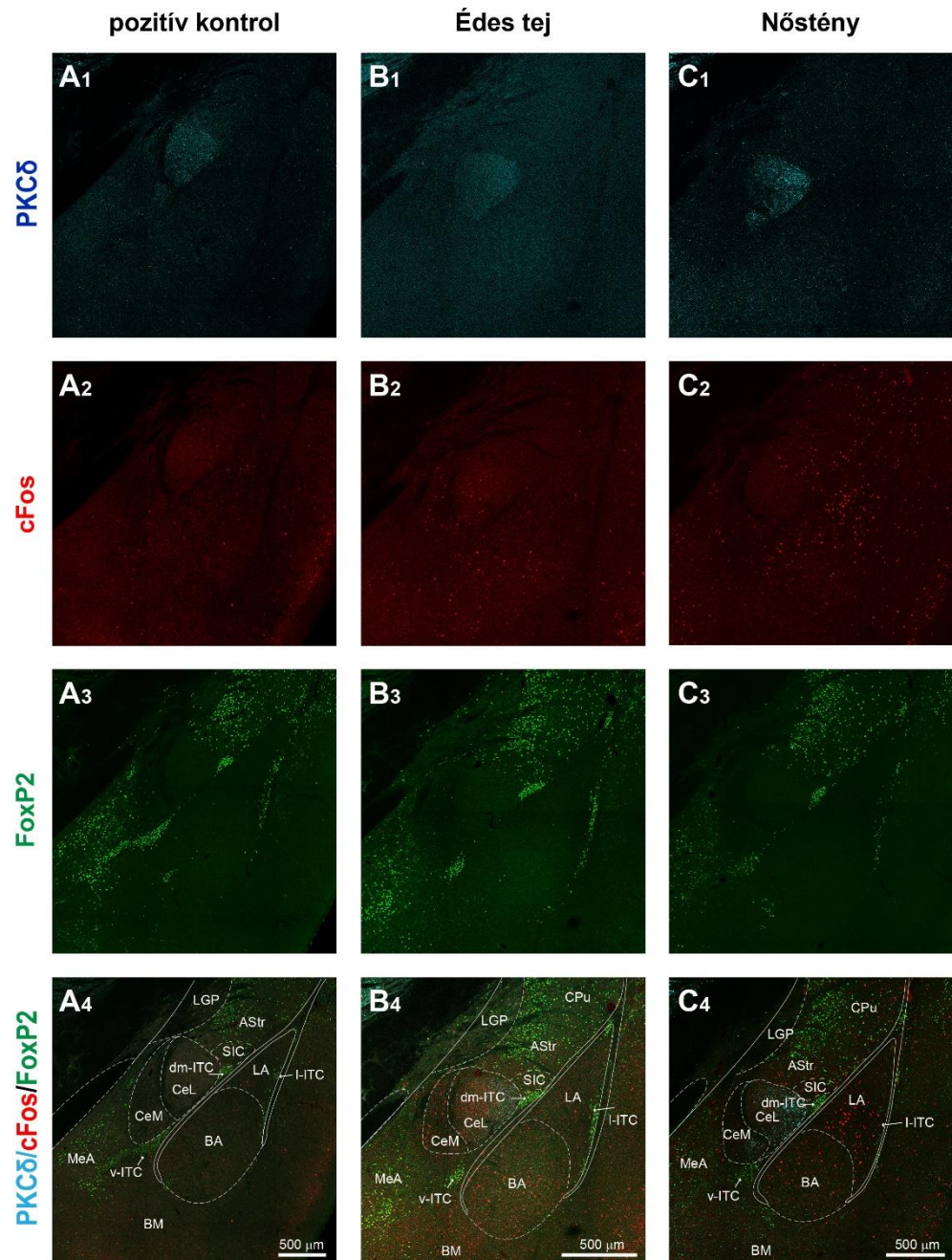
A többi Amy területen elszórtan láttunk aktivált sejteket (4. ábra). Azonban összevetve ezeket a kontroll állatok metszeteivel, a kép már sokkal árnyaltabbá válik. A kontrollokban hasonló helyeken láttunk cFos kifejeződést, ami arra utal, hogy a negatív, ösztönös hatások nem váltanak ki jelentős aktivációt az általunk vizsgált területeken. Későbbiekben terület-arányos kvantifikálásunk során ezen megfigyelésünk megerősítésre vár.

4.5. Sejtaktiváció pozitív ingerek hatására

Miután megvizsgáltuk a negatív ingerek hatásait, kíváncsiak voltunk arra, hogy pozitív ingerek mely területeken okoznak aktivációt. Az egyik állatcsoport cukrozott tejet kapott, ezzel előidézve egy ösztönös, nem-szociális válaszreakciót. A másik csoportot szintén pozitív, ugyanakkor szociális ingerek érték. Hím állatok kerültek nőstény egyedekkel kapcsolatba.

Az előzetes DAB-Ni festések alapján úgy láttuk, hogy az édes tejet kapott állatoknál erős cFos aktiváció van a CeA területén. (2. ábra). Emiatt egy harmadik markert, a PKC δ -t is használtunk a FoxP2-n és a cFos-n kívül. Ez az antitest a CeL területét jelölte ki számunkra. A fluoreszcens festések is bizonyították, hogy az édes tejet kapott állatoknál a BA-ban és a CeL-ban, valamint a CeM-ban volt megnövekedett sejtaktivitás, a LA-ban, a SIC-ben és az ITC-ben pedig a cFos jelölt sejtek száma szemmel nem volt megkülönböztethető a kontrollokétól (5. ábra).

Ezzel szemben a nősténnyel kapcsolatba került egereknél a CeA nem mutatott aktivitást. Ezeknél az állatoknál ugyanakkor erős jelet lehet megfigyelni a BA, a LA és az ITC területeken is. Ezen felül gyenge jelölés látható az Astr területén is (5. ábra).



5. ábra – Pozitív behatások által kiváltott sejtaktivációk. (A) Kontroll állatok agyából készült koronális metszet az amygdala síkjában. A kék szín a PKC δ jelenlétét mutatja (A1), a piros a cFos expressziót ábrázolja (A2), a zöld szín a FoxP2 jelölés (A3). A három festést együtt ábrázoló képen (A4) feltüntettük a FoxP2 és a PKC δ által kijelölt területek határait. (B) Édes tejet kapott állat. (B1) PKC δ , (B2) FoxP2, (B3) cFos, (B4) Amy területek FoxP2, PKC δ és cFos festés együttesen. (C) Nősténnyel találkozott állat. (C1) PKC δ , (C2) FoxP2, (C3) cFos, (C4) Amy területek FoxP2, PKC δ és cFos festés együttesen.

6. Diszkusszió

Az eredményeket összefoglalva elmondhatjuk, hogy a különböző ingerek hatására kialakuló érzelmi válaszreakciók során különböző amygdaláris területek aktiválódnak.

Összesen 4 fajta ösztönös viselkedést kiváltó ingert vizsgáltunk a kísérleteinkben, 2 negatív és 2 pozitív behatást alkalmazva. A negatív behatások során a természetes predátor (róka, macska) szaga volt az inger. Pozitív, nem-szociális ingerként cukrozott tejet kaptak az állatok, szociális behatás pedig a nőstény megjelenése volt a hím egyedek számára.

A válaszreakciók kialakulásában résztvevő sejteket korán aktiválódó gén, a cFos segítségével azonosítottuk. Először DAB-Ni festéssel vizsgáltuk a sejtek cFos expresszióját. Igazolni tudtuk a szakirodalomban leírt tényt, hogy a cFos jól használható sejtaktivációs marker az amygdaláris sejtek vizsgálatához. Mind a negatív inger (róka szag), mind pedig a pozitív inger (édes tej) hatására erőteljes sejtaktiváció volt látható.

Ezután immunhisztokémiai festések kombinálásával pontosan kijelöltük az amygdala almagjainak határait. Erre azért volt szükség, mert a szakirodalom ellentmondásosan, sokszor random módon határozza meg az Amy területek. Viszont ahhoz, hogy be tudjuk azonosítani, hogy mely magokban volt aktiváció, meg kellett határoznunk neurológiai markerekkel a területek határait. Erre a FoxP2 és a PKC δ fehérjék elleni immunjelölések megfelelőek voltak.

Miután sikerült beazonosítani az almagokat, a cFos segítségével megvizsgáltuk, hogy mely inger hatására hol történt sejtaktiváció. Korábban kutatócsoportunk félelmi kondicionálás esetén erőteljes cFos szintet figyelt meg a LA, a SIC/ITC, a CeM és a BM területén (Barsy, Kocsis és mtsai, 2020). Azonban a félelmi kondicionálással ellentétben az ösztönösen kialakuló válaszreakció során (TMT, macska) a BA területén volt, míg az LA és az ITC/SIC területeken pedig nem volt jelentős cFos jel. Ugyanakkor ehhez hasonló erős cFos aktiváció volt megfigyelhető a kontroll állatokban is. Fontos megjegyezni, hogy ezzel ellentétben a pozitív behatások során alkalmazott egerek alap cFos szintje nagyon alacsony volt, sokkal

alacsonyabb, mint a negatív behatásos vizsgálatokban használt kontrollokéban tapasztaltak. Ennek magyarázata a következő lehet. Minden kísérleti csoportnak saját kontroll csoportja volt. Ezen állatok más-más alomból származnak, így ezek alap stressz-szintje, így alap cFos expressziója is különböző lehet. Összehasonlítást viszont mindig a saját kontroll csoporttal összevetve végeztük. A TMT, illetve macskaszőr okozta változásokat (vagy annak hiányát) későbbiekben úgy is validálhatjuk, hogy megvizsgálunk olyan területeket, melyek a szakirodalomban erős aktivációt mutatnak predátorok szagára (pl. mediális amygdala, bed nucleus stria terminális, periaqueductal grey). Ha ezekben jelentős különbségeket találunk, akkor eredményeinket 'valódinak' tekinthetjük. Ha nem, akkor meg kell ismételni a kísérleteinket. De ezt kizárólag minden eshetőség kizárása után tervezzük a 3R szabály betartása miatt.

A pozitív stimulusoknál szintén más-más területek vettek részt a válaszreakció kialakításában. Édes tejet kapott állatoknál a BA és a CeA aktiválódott, a LA, a SIC és az ITC nem. A nősténnyel kapcsolatba lévő egyedeknél szintén volt aktiváció a BA-ban, de ezen felül a LA, az ITC és az Astr területén is. Az édes tejet kapott egerekkel szemben itt nem volt aktiváció a CeA-ban.

A fent összefoglalt eredmények és a szakirodalomban leírtak alapján elmondható, hogy az amygdala szerepet játszik az érzelmi válaszreakciók kialakulásában, azonban más-más régiói. A vizsgált területek közül a legszembetűnőbb a BA, mert ennek a sejtei minden ingernél cFos expresszálást mutattak: valamilyen módon aktiválódtak a pozitív és a negatív ingerekre is. Ez megfelel azokkal az adatokkal, miszerint a BA mind a pozitív, mind pedig a negatív hatások közvetítésében jelentős szerepet játszik; bár valószínű, hogy ezekben más-más BA sejtek vesznek részt (Namburi és mtsai, 2015; Zhang és Li, 2018; Tye, 2018). A LA a félelmi tanulás mellett (Barsy, Kocsis és mtsai, 2020) a szociális, pozitív behatások esetén aktiválódott (nőstény esetén a leginkább, de enyhe aktivációt a negatív inger hatására is mutatott). A CeA csak azoknál az állatoknál aktiválódott, ahol az inger pozitív, nem szociális behatás volt (cukros tej). Ez egybeesik a korábbi irodalmi adatokkal (Haubensak és mtsai, 2010;

Fadok és mtsai, 2018). Bár kisebb változásokat tapasztaltuk az ITC/SIC területein, a kis méretük miatt valós képet ezekről csak a kvantifikálás során kaphatunk.

7. Kitekintés

Elsőként a kvalitatív eredményeink kvantifikálása elengedhetetlen a későbbi kutatásaink során. Másodsorban, mivel jelentős változásokat tapasztaltunk a BA/LA területein, ezek pontos elkülönítése is fontos. A szubkortikális bemeneteket jelölő 2-es típusú vezikuláris glutamát transzporter (vGLUT2) lehet egy újabb neurokémiai marker céljaink eléréséhez. Kutatócsoportunk ezt a markert a thalamusz és az amygdala közötti kapcsolatrendszer feltérképezésénél használta már (Mátyás és mtsai, 2014). A calretinin (CR) nevű kalcium-kötő fehérje is alkalmas lehet az amygdalába futó rostok különböző CR szintjének köszönhetően az egyes Amy almagok elkülönítésére (Barsy, Kocsis és mtsai, 2020). Továbbá a kolin-acetil-transzferáz enzim (ChAT) elleni immunreakció is egy gyakori pályajelölési mód, főleg az amygdala komplex kolinerg beidegzésének megjelenítésére használják (Amaral, Bassett és mtsai, 1989). Ez elsősorban a BA területén koncentrálódik, így ez könnyen körvonalazható a ChAT elleni jelölés segítségével.

Ezen vizsgálatok véghezvitelével pontos képet kaphatunk a különböző hatások okozta amygdaláris aktivációs mintázatok feltérképezésében. Ezek fontos adatokat szolgáltathatnak a számos kognitív funkcióban jelentős szerepet játszó amygdala nagyobb fokú megismeréséhez.

8. Irodalomjegyzék

Amaral, J. L. Bassett, Cholinergic innervation of the monkey amygdala: An immunohistochemical analysis with antisera to choline acetyltransferase. *Journal of Comparative Neurology* (1989 Mar 15;281(3):337-61)

Asede, D. Bosch, A. Lüthi és mtsai, Sensory Inputs to Intercalated Cells Provide Fear-Learning Modulated Inhibition to the Basolateral Amygdala. *Neuron* (2015 Apr 22;86(2):541-54)

Barsy, K. Kocsis, A. Magyar, Á. Babiczky, M. Szabó, J. M. Veres, D. Hillier, I. Ulbert, O. Yizhar, F. Mátyás, Associative and plastic thalamic signaling to the lateral amygdala controls fear behavior. *Nature neuroscience* (2020 May; 23(5):625-637)

Beyeler, K. M. Tye, mtsai, Organization of Valence-Encoding and Projection-Defined Neurons in the Basolateral Amygdala. *Cell Reports* (2018 Jan 23;22(4):905-918)

Blair, J. E. LeDoux és mtsai, Synaptic Plasticity in the Lateral Amygdala: A Cellular Hypothesis of Fear Conditioning. *Learning Memory* (2001 Sep-Oct; 8(5):229-42)

Busti, R. Geracitano, N. Whittle és mtsai, Different Fear States Engage Distinct Networks within the Intercalated Cell Clusters of the Amygdala. *The Journal of Neuroscience* (2011 March; 31 (13) 5131-5144)

Carter, S. Han, R. D. Palmiter, Parabrachial Calcitonin Gene-Related Peptide Neurons Mediate Conditioned Taste Aversion. *Journal of Neuroscience* (2015 March; 35 (11) 4582-4586)

Cho, S. D. Rendall, J. M. Gray, Brain-wide maps of Fos expression during fear learning and recall. *Learning Memory* (2017; 24: 169-181)

Cullinan, J. P. Herman, D. F. Battaglia, H. Akil, S. J. Watson, Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Elsevier* (1995; Pages 477-505)

Do Monte, G. J. Quirk és mtsai, A temporal shift in the circuits mediating retrieval of fear memory. *Nature* (2015 Jan; 519, pages 460–463)

Fadok, M. Markovic, P. Tovote, A. Lüthi, New perspectives on central amygdala function. *Elsevier* (2018 Apr; 49:141-147)

Freneau, K. Kam, T. Quershi, J. Johson, Vesicular Glutamate Transporters 1 and 2 Target to Functionally Distinct Synaptic Release Sites. *Science* (2004 Jun 18;304(5678):1815-9)

Goosens, S. Maren, Contextual and Auditory Fear Conditioning are Mediated by the Lateral, Basal, and Central Amygdaloid Nuclei in Rats. *Learning Memory* (2001 May; 8(3): 148–155)

Haubensak, P. Kunwar és mtsai, Genetic dissection of an amygdala microcircuit that gates conditioned fear. *Nature* (2010 Nov; 468, pages 270–276)

Janak, K. M. Tye, From circuits to behaviour in the amygdala. *Nature* (2015 Jan; 517, pages 284–292)

Johansen, J.E. LeDoux és mtsai, Optical activation of lateral amygdala pyramidal cells instructs associative fear learning. *PNAS* (2010 Jul; 107 (28) 12692-12697)

Launza, J. Moncho-Bogani, J. E. LeDoux, Unconditioned Stimulus Pathways to the Amygdala: Effects of Lesions of the Posterior Intralaminar Thalamus on Footshock-Induced c-Fos Expression in the Subdivisions of the Lateral Amygdala. *Neuroscience* (2008 Aug 26;155(3):959-68)

Likhtik, I. S. Grunfeld, Mixed selectivity encoding and action selection in the prefrontal cortex during threat assessment. *Elsevier* (2018; Pages 108-115)

Mátyás, G. Komlósi és mtsai, A highly collateralized thalamic cell type with arousal-predicting activity serves as a key hub for graded state transitions in the forebrain. *Nature neuroscience* (2018 Oct; 21, pages1551–1562)

Mátyás, J. Lee, H-S. Shin, L. Acsády, The fear circuit of the mouse forebrain: connections between the mediodorsal thalamus, frontal cortices and basolateral amygdala. *European Journal of Neuroscience* (2014 Jun; 9(11):1810-23)

Namburi, A. Beyeler, K. M. Tye, A circuit mechanism for differentiating positive and negative associations. *Nature* (2015 Apr; 520, pages675–678)

- Pape, D. Pare, Plastic Synaptic Networks of the Amygdala for the Acquisition, Expression, and Extinction of Conditioned Fear. *Physiol Rev.* (2011 Apr; 90(2): 419–463)
- Penzo, V. Robert, J. Tucciarone és mtsai, The paraventricular thalamus controls a central amygdala fear circuit. *Nature* (2015 Jan; 519, pages455–459)
- Quirk, D. Mueller, Neural Mechanisms of Extinction Learning and Retrieval. *Neuropsychopharmacology* (2007 Sept; 33, pages56–72)
- Rosen, A. Asok, T. Chakraborty, The smell of fear: innate threat of 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline, a single molecule component of a predator odor. *Front. Neurosci.* (2015 Aug 25;9:292)
- Thompson, V. Neugebauer, Amygdala Plasticity and Pain. *Pain Res Manag.* (2017 Article 8296501)
- Vicario, E. Mendoza, A. Abellán, C. Scharff, L. Medina, Genoarchitecture of the extended amygdala in zebra finch, and expression of FoxP2 in cell corridors of different genetic profile. *Brain Struct. Funct.* (2016 May; 222 (1): 481–514)
- Wolff, J. Gründemann, A. Lüthi és mtsai, Amygdala interneuron subtypes control fear learning through disinhibition. *Nature* (2014 May; 509, pages453–458)
- Xu, S. Krabbe, A. Lüthi és mtsai, Distinct Hippocampal Pathways Mediate Dissociable Roles of Context in Memory Retrieval. *Cell* (2016 Nov; Pages 961-972.e16)
- Yokoi, S. L Campbell és mtsai, Increased c-fos expression in the central nucleus of the amygdala and enhancement of cued fear memory in Dyt1 Δ GAG knock-in mice. *Elsevier* (2009 Nov; Pages 228-235)
- Zhang, B. Li, Population coding of valence in the basolateral amygdala. *Nature Communications* (2018 Dec; 5195)

9. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt témavezetőmnek, Dr. Mátyás Ferencnek szeretném megköszönni a rengeteg segítséget, tanácsadást, támogatást és energiát, melyet a dolgozatom készítése során kaptam tőle. Köszönettel tartozom továbbá a MTA Természettudományi Kutatóközpont Hálózat és Viselkedés Neurobiológia kutatócsoport tagjainak – különösen Barsy Boglárkának, Babiczky Ákosnak, Magyar Alettának, Kocsis Kingának és Herczeg Tamásnak – a sok segítségért. Ezenkívül szeretném megköszönni a lehetőséget az Állatorvostudományi Egyetem Anatómiai és Szöveti Tanszékének, hogy csatlakozhattam a Tudományos Diákköri tevékenységükhöz.

