

Digitális atlasz létrehozása kínai paradicsomhal (*Macropodus opercularis*) agyműködésének vizsgálatára

37. OTDK Biológia Szekció

Írta:
Tarcsa Virág

Eötvös Loránd Tudományegyetem
Természettudományi Kar
Biológia Alapszak, 3. évfolyam

Témavezetők:
Szabó Nóra, doktorandusz
Dr. Varga Máté, egyetemi docens
ELTE TTK Genetikai Tanszék



Tartalom

Tartalom	1
Rövidítésjegyzék	2
Összefoglaló	3
Bevezetés	4
Célkitűzések	7
Anyagok és módszerek	9
Embriók begyűjtése és tartása	9
Fixálás	9
Immunfluoreszcens eljárás	9
Mikroszkópia	10
<i>In silico</i> módszerek	10
ImageJ	10
Python és ANTs	10
Agyspecifikus génexpresszió vizsgálata klasszikus <i>in situ</i> hibridizációval	11
RNS izolálás	11
cDNS szintézis	11
Primertervezés	11
PCR	11
PCR tisztítás gélből	12
DNS fragmentum ligálása vektorba	12
Transzformálás, molekuláris klónozás és szekvenálás	12
Antiszensz, <i>in situ</i> hibridizációs próba készítése	12
<i>In situ</i> hibridizáció	12
Eredmények	14
Kolin-acetiltranszferáz a (chata)	14
Kortikotropin-releasing hormon b (crhb)	15
5-hidroxitriptamine (szerotonin) receptor 3a (htr3a)	15
Immunfluoreszcens eljárás	16
Közösségben és izoláltan tartott paradicsomhalak tERK/pERK immunjelölése	18
Agy-templát készítése	18
Diszkusszió	21
Szerzői hozzájárulás	23
Köszönetnyilvánítás	24
Irodalomjegyzék	25

Rövidítésjegyzék

ANTs: Advanced Normalisation Tools

cDNS: intront nem tartalmazó DNS

chata: kolin-acetiltransferáz-a

CRH: kortikotropin realising hormon

crhb: kortikotropin realising hormon b

DNS: dezoxiribonukleinsav

dpf: napos (days post fertilization)

ERK: extracelluláris szignál-regulált kináz

fosab: v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog Ab

Gb: giga bázis

HCR: hibridizációs láncreakción alapuló fluoreszcens *in situ* hibridizáció

htr3a: 5-hidroxitriptamine (szerotonin) receptor 3a

HTR3B: 5-hidroxitriptamine (szerotonin) receptor 3b

LMP: alacsony olvadáspontú agaróz (low melting point agarose)

Mb: mega bázis

PBS: foszfát pufferelt sóoldat

PBTr: foszfát pufferelt oldat TritonX-szel kiegészítve

PCR: polimerizációs láncreakció (polymerase chain reaction)

pERK: foszforilált extracelluláris szignál-regulált kináz

pth3: paratiroid hormon 3

RNS: ribonukleinsav

tERK: teljes extracelluláris szignál-regulált kináz

µm: mikroliter

Összefoglaló

A kínai paradicsomhal (*Macropodus opercularis*) egy Kelet-Ázsiában őshonos csontoshal faj, amely a hipoxikus környezethez való alkalmazkodást segítő, speciális anatómiai adaptációkkal, illetve komplex viselkedésmintázattal rendelkezik. Utóbbinak köszönhetően az Eötvös Loránd Tudományegyetem Etológiai Tanszékén több évtizeden keresztül foglalkoztak ezzel a fajjal viselkedésbiológiai tanulmányok keretében. A paradicsomhal kutatási szempontból számos előnyös tulajdonsággal rendelkezik, hiszen a genetika tudományterületén alkalmazott zebradánióhoz (*Danio rerio*) hasonlóan egyszerű a tartása és viszonylag rövid generációs idővel rendelkezik, ugyanakkor – utóbbival ellentétben – rendkívül fejlett társas viselkedésmintázatokat is mutat.

Munkám fókuszában a paradicsomhalak agyához köthető génexpressziós mintázatok feltárása áll. Erre a célra szeretnék létrehozni egy háromdimenziós agyi atlaszt, melynek segítségével nem csak az agy működésébe és evolúciójába nyerhetünk betekintést, de kutathatjuk a faj komplex viselkedésmintázatainak genetikai hátterét is. Egy ilyen jellegű digitális atlasz az idegrendszer működésének és összefüggéseinek mélyebb megértését szolgálja.

Az agyi atlasz létrehozásához zebradánión már kipróbált és működő protokollokat optimalizáltam paradicsomhalakra. Az atlasz készítése során azt is dokumentáltam, hogy miképp különbözik az egyedül, illetve közösségben nevelt paradicsomhalak agyi működése.

Bevezetés

„Fészket épít, udvarol, agresszíven védelmezi és gondozza ivadékait, nagyon kíváncsi, gyorsan tanul, és fajtársaival bonyolult kapcsolatokat tart.”¹ Ez a kínai paradicsomhal (*Macropodus opercularis*) viselkedését leíró idézet a ma már jól ismert magyar etológustól, Dr. Csányi Vilmostól származik. Az ő munkájának és víziójának köszönhetően az Eötvös Loránd Tudományegyetem (ELTE) Természettudományi Karának kutatói az 1970-es évektől kezdődően évtizedeken át foglalkoztak az előbb említett állatokkal különféle etológiai kutatások keretében². A paradicsomhalak rendkívül fejlett társas magatartásformákkal rendelkeznek, ilyen például a hímek között tapasztalható agresszív viselkedés, továbbá a fajra jellemző komplex ívás és utódgondozás folyamata³. Az Etológiai Tanszék munkatársai kutatásaik során sikeresen állítottak elő genetikailag homogén paradicsomhal törzseket és ezen kísérletek eredményei egyértelműen kimutatták, hogy az állatok természetes viselkedési elemeiért feltehetően kevés gén felel⁴. Ebben az időszakban kevesebb vizsgálati módszer állt a kutatók rendelkezésére a viselkedés molekuláris genetikai hátterének feltárására, illetve az etológusok megfigyelései érthető módon a különféle viselkedésminták leírására és elemzésére koncentráltak. Mára azonban a molekuláris biológia eszköztára nagy mértékben bővült, lehetővé téve így az ilyen jellegű molekuláris mechanizmusok mélyebb megértését.

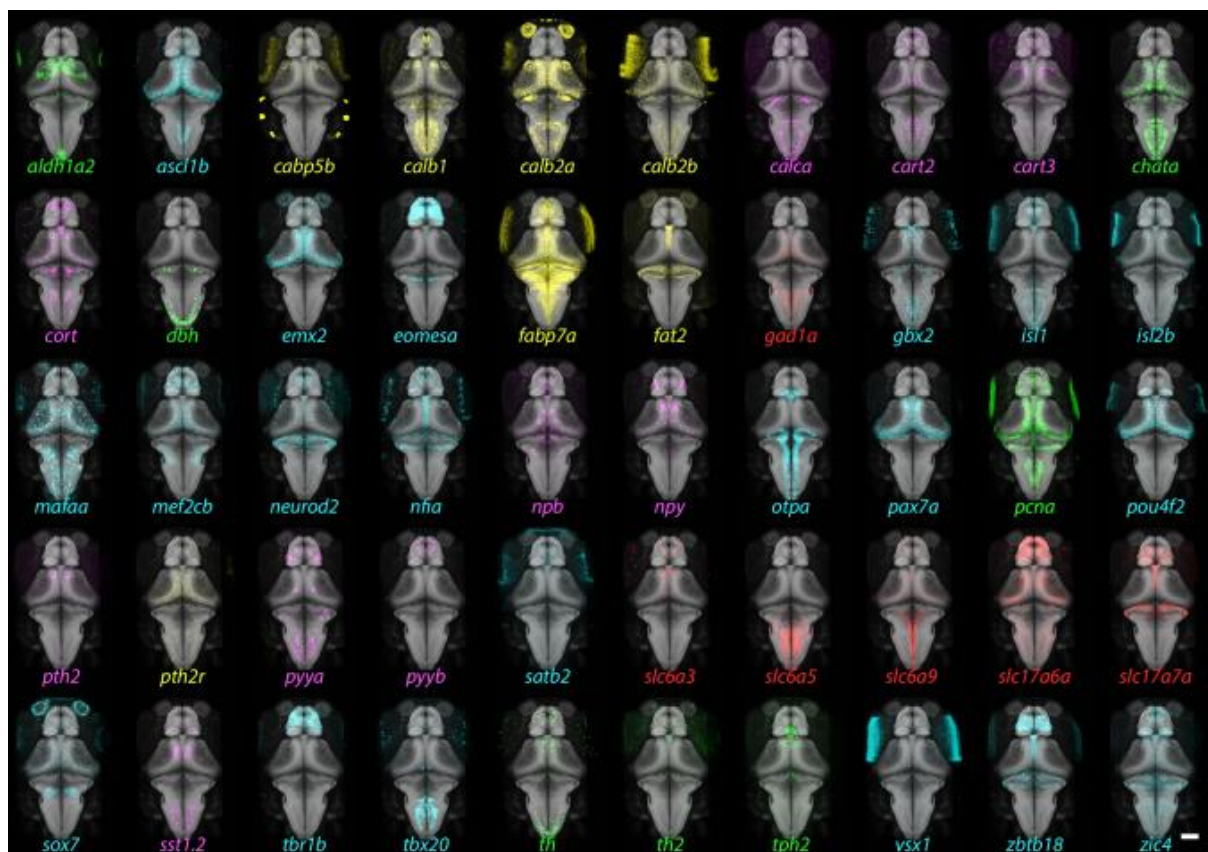
Laborunkban, genetikai modellszervezetként alapvetően zebradániót (*Danio rerio*) alkalmazunk, amely kis méretének, rövid reprodukciós idejének és áttetsző embrióinak köszönhetően kiválóan alkalmas a különféle genetikai vizsgálatok kivitelezésére⁵. Azonban a felsorolt tulajdonságok a paradicsomhalra is igazak, így az előző években elkezdtük az utóbbi faj részletesebb vizsgálatát is. Munkánkat nagymértékben elősegítette az, hogy elmúlt pár évben csoportunk sikeresen létrehozta a paradicsomhalak referencia genomját. E munka során fény derült arra, hogy genomjuk kis méretű és kompakt, mindössze 485 Mb nagyságú, mely körülbelül egy-harmada a zebradánió genomjának (1.5 Gb)^{6,7}. Az előzőekben említett tulajdonság előnyt jelent a jövőbeli genomikai kutatások során, továbbá vizsgálataimat nagymértékben segíti az is, hogy a zebradániókon alkalmazott kísérletek protokolljai optimalizálás után működőképesek paradicsomhalakon is (ilyen például a génexpressziós vizsgálatok esetében előszeretettel használt *in situ* hibridizáció).

A mai világban a számítógépek, a bioinformatika és a neurobiológiai képalkotó módszerek fejlődésének köszönhetően a központi idegrendszerről egyre nagyobb felbontású képek állnak a kutatók rendelkezésére. Különféle *in silico* módszerek alkalmazásával ezen képekből az elmúlt években számos agyi atlaszt hoztak létre a kutatók⁸.

Ezek az atlaszok megannyi faj agyi struktúráját vizualizálják, például a házi egérét⁹ (*Mus musculus*), a patkányét¹⁰ (*Rattus norvegicus*), a rézusmajomét¹¹ (*Macaca mulatta*) és persze az emberét¹² is (*Homo sapiens*). Mindezek mellett számtalan agyi atlaszt hoztak létre a csontoshalak (*Osteichthyes*) vizsgálatára is. Ez nem véletlen, hiszen ezen állatok a gerinces fajok csaknem felét teszik ki, továbbá hatalmas biodiverzitás jellemzi a csoportot és a rokon fajok között megjelenő nagy mértékű variabilitás igencsak kedvező az evolúciobiológát kutatók számára¹³. Emellett egyre több faj genomját szekvenálják meg, ezzel is segítve a csontoshalakkal foglalkozó genetikusok és fejlődésbiológiát kutató szakemberek munkáját. Végül, nem elhanyagolható gazdasági és mezőgazdasági szerepük miatt is érdemes részletesen tanulmányozni ezeket a fajokat¹⁴.

Mindezen okoknak köszönhetően manapság egyre több tudományterületen alkalmaznak csontoshal fajokat modellállatként. A már említett zebradánió mellett a medakát (*Oryzias latipes*) is előszeretettel kutatják a fejlődésbiológiával foglalkozó laborokban, hiszen viszonylag könnyen létrehozhatóak új, mutáns vonalak. A gömbhalakkal (*Takifugu rubripes*) a genetikusok foglalkoznak, mivel kisméretű, kompakt genomjuk működése számos kérdést vet fel. A bölcsőszájúhal-félék (*Cichlidae*) és a guppik (*Poecilia reticulata*) pedig fontos modellállatai több, az evolúcióval, illetve a környezet és viselkedés kapcsolatának vizsgálatával foglalkozó kutatásnak¹⁵. Ezen kutatások során kiváló vizualizációs eszköznek bizonyult az agyi atlasz, mely segítségével anatómiai, illetve génexpressziós információkhoz juthatunk egyes élőlényekkel idegrendszerével kapcsolatban.

Ilyen jellegű adatbázis már létrejött többek között a zebradánió esetében is (1. ábra)¹⁶. Ennek keretében sikeresen feltérképezték az állat neuronhálózatát és ezen túl az agy struktúrájának és funkciójának kapcsolatát is vizsgálták. Ehhez hasonló módszerrel hasonlították össze a barlangi vak lazacok (*Astyanax mexicanus*) több alpopulációját és mutatták ki, hogy a különböző agyterületek az egymástól izolált csoportokban konvergensen, azaz, hasonlóképpen változtak a környezethez való adaptáció érdekében¹⁷. Ezen kísérletek jól mutatják, hogy agyi atlaszok segítségével sokkal egyszerűbb a viselkedésbiológia és a genetika tudományterületeinek a kapcsolatát tanulmányozni, továbbá az előbb felsorolt tudományterületek egyidejű vizsgálatát is könnyíti.



1. ábra. **Agyspecifikus génexpressziós adatok zebradánióban.** A képen 50 különböző génre elvégzett fluoreszcens in situ hibridizáció eredményei láthatóak standard agyra regisztrálva¹⁸.

Egy-egy új faj agyi atlasza mélyebb betekintést nyújthat a gerincesek idegrendszerének általános működésébe, de segítségükkel új szemszögből vizsgálhatjuk magát az evolúciót is, hiszen az atlaszok megkönnyítik a közeli és távoli rokon fajok közötti összehasonlító elemzéseket.

A kínai paradicsomhal, annak ellenére, hogy egy viszonylag egyszerű felépítésű gerinces állat, számos bonyolult genetikailag kódolt viselkedésmintázatot mutat, így az agyi atlasz a későbbiekben segítségünkre lehet a magatartásformákért felelős gének vizsgálatában és megértésében.

Célkitűzések

Kutatómunkám fő célkitűzése, hogy létrehozzam az első digitális paradicsomhal agyi atlaszt, melynek segítségével a jövőben tágabb keretek között vizsgálhatjuk az állatok idegrendszerének evolúciós, neurobiológiai és viselkedésgenetikai vonatkozásait.

Ennek megvalósítására első lépésként létre kell hoznunk egy agy-templátot, amely lényegében egy koordináta mezőként szolgál majd a későbbi, például génexpressziós adatok pozícionáláshoz¹⁹. Mindehhez először is optimalizáltuk zebradániókon már működő immunfluoreszcens festés protokollját paradicsomhalakon. Ennek során az extracelluláris szignál-regulált kináz (ERK) fehérje idegi aktiváció hatására lezajló gyors foszforilációját használtuk ki, hiszen így a foszforilált ERK (pERK) és a teljes ERK (tERK) aránya jól mutatja, hogy az agy melyik területei mutatnak aktivitást adott viselkedés során, vagy bizonyos környezeti hatásokra²⁰. A tERK fluoreszcens jelölésével egyben az agy struktúráját is vizualizálhatjuk. Munkám során csak 5 napos (days post fertilization – dpf) paradicsomhal lárvákat használtam, mivel ezeknek az állatoknak már komplex idegrendszere és viselkedése van, ugyanakkor a hatályos állatvédelmi szabályok alapján, önálló táplálkozás hiányában még külön kísérleti engedély nélkül vizsgálhatóak.

A vizsgálatok elvégzéséhez (illetve bármilyen későbbi, ellenanyagjelölésen alapuló kísérlethez) azonban először a zebradánió lárvák esetében használt immunjelöléses protokollok optimalizációja szükséges, ami így az egyik fő célkitűzésem is lett.

Szintén a céljaim közt szerepel, hogy adott gének génexpressziós mintázatát vizsgáljam. Ehhez optimalizálni szerettem volna a gén transzkripciójának detektálására alkalmas *in situ* hibridizációs protokollokat, amelyek lehetővé tennék egyes gének átíródásának detektálását paradicsomhal lárvák esetében is.

Ehhez három gén került kiválasztásra, amelyek mind fontos szerepet játszanak az idegrendszerben zajló jelátviteli folyamatokban, ezek pedig a következők: a *kolin-acetiltransferáz a*, a *kortikotropin-releasing hormon b* és a *5-hidroxitriptamine (szerotonin) receptor 3a*. Ezen géneket a központi idegrendszeri specificitásuk és az idegrendszer működésében való esszenciális szerepük miatt választottuk. A gének részletesebb bemutatására az Eredmények fejezetben kerül majd sor.

Az általam korábban említett optimalizált immun-jelölési protokollok felhasználásával célom, hogy összehasonlítsam az egyedül, illetve közösségben nevelt paradicsomhalak agyi aktivitását. A zebradániók esetében korábbi kutatások kimutatták, hogy a szociális izolációban nevelt egyedek viselkedésében drámai változások figyelhetők meg²¹, ami együtt jár azzal,

hogy az egyedül nevelkedett egyedek agyában nem ugyanazon a gének fejeződnek ki, mint a csoportban nevelkedett társaik esetében²², illetve a pERK/tERK arány alapján mutatott agyi aktivitás is eltér²³. Ugyanakkor, a hiperszociális, rajokban élő zebradánióval szemben a kínai paradicsomhalak szociális struktúrája eltérő: ezek a halak nem rajokba verődve élnek, gyakran magányosak, csoportban pedig komplex hierarchiákat alakítanak ki¹. Ezért szeretném megnézni, hogy (lárvális) méreteiben hasonló, de eltérő szociális viselkedési mintázatokat mutató paradicsomahalakon eltérő agyi aktivitást figyelhetünk-e meg az izoláció nyomán.

Anyagok és módszerek

Embriók begyűjtése és tartása

A paradicsomhalak ívásuk során az embrióikat a hímek által készített habfészekbe rakják, melyet esetünkben az akváriumokba helyezett szivacsok vízzel érintkező részére építenek. Az ikrákat embrió médiumot (5 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl₂, 0.33 mM MgSO₄, 10-5% metilén kék) tartalmazó üveg Petri-csészébe gyűjtöttük műanyag szűrő segítségével és ezután 28,5°C-os inkubátorban neveltük őket maximum 5 napig. Ezek alól kivételek voltak az izoláltan tartott paradicsomhalak, ugyanis őket korai stádiumtól kezdve 24-lyukú műanyag plate-en neveltünk.

Fixálás

Különböző korú (1-5 dpf) paradicsomhal lárvákat paraformaldehid (4% paraformaldehid PBS-ben oldva) oldat alkalmazásával fixáltunk. Ezeket műanyag fedelű üvegcsében, 4°C-on tároltuk, 24 órán keresztül. A következőkben leírt immunfluoreszcens jelölés esetében a fixálás után nem használtunk 100%-os metanolt, azonban a klasszikus *in situ* hibridizáció kivitelezése előtt a lárvákat 20 percig szobahőn dehidratáltuk, majd használat előtt -20°C-os hűtőbe tettük őket egy éjszakára.

Immunfluoreszcens eljárás

Ahogy azt már az előzőekben is említettem, az agy struktúrájának és az idegrendszer aktív területeinek vizualizálásához teljes, illetve foszforilált extracelluláris regulált kináz antitest jelölést alkalmaztunk. Ehhez a kísérlethez 5 dpf paradicsomhal lárvákat használtunk, melyeken a STAR Protocols 5 dpf zebrafish lárvákra optimalizált immunjelölés protokollját alkalmaztuk²⁰. Munkánk során elsődlegesen az előbb említett technikát kellett paradicsomhal lárvákra adaptálni. Ennek során néhány változtatást alkalmaztunk, többek között kihagytuk a dehidratációs lépést, mivel az a halak agyi struktúráit nagyban ronsolta. Emellett a permeabilizálásra alkalmazott Tripszin-EDTA (ThermoFisher Scientific, 15400054) arányán is változtattunk, kétszeres koncentrációval dolgoztunk, megnövelve így az antitestek bejutási lehetőségét a szövetekbe. Továbbá, a tisztább jel érdekében dupla mennyiségű mosást alkalmaztunk az elsődleges, majd később a másodlagos antitestet tartalmazó oldatban való inkubálás után, csökkentve ezzel az immunjelölés során kialakuló zavaró, felesleges háttérrel. A tERK esetében az immunjelölésekhez az egérben készült elsődleges ellenanyagot (Cell Signaling Technology, #4696) 1:500, a kecskében készült anti-egér-AlexaFluor568 másodlagos ellenanyagot pedig (ThermoFisher Scientific, A11004) 1:300 arányban használtuk.

Amikor tERK és pERK jelölést egyszerre végeztünk, az elsődleges ellenanyagokat 1:600 arányban (pERK elsődleges ellenanyaga: Cell Signaling Technology, #4370S), másodlagos ellenanyagokat (pERK másodlagos ellenanyaga: anti-nyúl-AlexaFluor488: ThermoFisher Scientific, A11008) pedig 1:390 arányban alkalmaztunk.

Mikroszkópia

A mikroszkópos vizsgálatok előkészítése során az antitesttel jelölt lárvákat alacsony olvadáspontú agarózba (low melting point agarose - LMP) ágyaztam be. Ennek során először szilikagél segítségével egy fedőlemezre erősítettem az erre a célra kialakított gyűrűt. Ez után a gyűrű által bezárt területre folyékony 300 µl 2% alacsony olvadáspontú agarózt cseppentettem, majd pedig pozicionáltam a vizsgálni kívánt lárvákat fénymikroszkóp segítségével. Az agaróz megszilárdulását követően foszfát pufferelt oldat TritonX-el, azaz PBTr-t (1400 µl TritonX, 48,5 ml PBS) csepegtettem az agarózra és a gyűrű szabadon maradt, felső részét tárgylemezzel fedtem le.

Az így elkészült preparátumokról Carl Zeiss szemi-konfokális mikroszkóppal készítettünk felvételeket különböző optikai síkokban a tERK esetében 568 nm-es, pERK esetében pedig 488 nm-es hullámhossz mellett.

In silico módszerek

ImageJ

A tERK/pERK immunjelölés eredményeit a Fiji programcsomag segítségével dolgoztuk fel első lépésben²⁴. Ennek során a tERK/pERK immunjelölt paradicsomhalakat két csatornán fotóztuk, melyeket a „Split channels” funkcióval választottunk szét. Ezen csatornák különböző fókuszú optikai síkokban készült képeit „Z-project” funkció segítségével vontuk össze. A használt másodlagos ellenanyagoknak megfelelően állítottuk be a csatornák színeit, majd a „Merge channels” parancs segítségével összevontuk az előbb említett csatornákat.

Python és ANTs

A továbbiakban a képeket Python programozási nyelven dolgoztuk fel és a kód könnyebb átláthatósága, valamint az elemzési folyamat reprodukálhatósága érdekében Jupyter Notebook-ot használtunk. Az általunk tERK festéssel készített képekből először egy agy-templátot hoztunk létre az Advanced Normalisation Tools (ANTs)²⁵ eszköztárban megtalálható funkciók (*ants.build_template*) segítségével. A továbbiakban ezt a templátot használtuk, hogy az egyes kontroll, illetve szociális izolációban nevelt egyedek esetében a tERK képet hozzáigazítsuk (*ants.registration*), majd azonos paraméterekkel a pERK festésről készült képet is regisztráltuk (*ants.apply_transforms*). Mivel kutatásomban csak az agy működésére koncentráltam, egy

maszkolási lépést alkalmaztam, amivel a későbbiekben vizsgálatainkat csak az agyra szűkíthettük. Minden állat esetében a Numpy programcsomag²⁶ segítségével kiszámítottuk a pERK/tERK arányt, majd mind a kontroll, mind az izolált egyedek esetében meghatároztuk az arányok átlagát az adott kondícióra. Ezeknek az átlagoknak az összevetése mutathatja meg, hogy milyen agyi területek aktiválódnak csak az izolált, illetve csak a szociálisan nevelt egyedekben.

Agyspecifikus génexpresszió vizsgálata klasszikus *in situ* hibridizációval

RNS izolálás

Az RNS izolálást témavezetőm, Dr. Varga Máté végezte, mely során különböző stádiumú lárvákból TRIzol reagens (Zymo Research, R2050-1-50) segítségével történt a teljes RNS kivonása, a gyártó protokollja alapján.

cDNS szintézis

A polimerizációs láncreakciók (PCR) során a templátként szolgáló cDNS-t olyan kevert RNS minták segítségével szintetizáltuk, melyek különböző stádiumú (9-12 órás, 15-17 órás, 28 órás és 2 dpf) paradicsomhal lárvákból származó teljes RNS arányos összemérésével készültek. A reverz transzkripciót a SuperScript™ IV VILOTM Master Mix Kit-tel (ThermoFisher Scientific, 11756050), a gyártó által közzétett protokoll alapján végeztem el.

Primertervezés

A primerek tervezése a Benchling (<http://benchling.com>) felületén történt, melyet Szabó Nóra témavezetőm végzett. Munkánk fókuszában három agyspecifikus expressziót mutató gén állt, ezek a következők: *chata* (*choline O-acetyltransferase a*), *crhb* (*corticotropin releasing hormone b*) és a *htr3a* (*5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3A*).

Gén	Primer	Szekvencia (5'-3')
<i>chata</i>	Mo_chata-F	TGGCCCTACCGGTGAACTCCAG
	Mo_chata-R	AACCCGGCCTTCTTGGAACGG
<i>crhb</i>	Mo_crhb-F	AGTTGCCTTCTTACCGCGCCAC
	Mo_crhb-R	CAGCTGTTCCGCCCTGGACATC
<i>htr3a</i>	Mo_htr3a-F	GCGACGGCCATTGTTCTACACG
	Mo_htr3a-R	GCCCAGTGTGATGCTGTAGGCC

1. táblázat A PCR-hoz tervezett primerek szekvenciái.

PCR

A PCR reakcióhoz a témavezetőm által tervezett primereket és az előzőekben említett, általam szintetizált cDNS-t használtam. A DreamTaq DNS Polimerázzal (5 U/μL, ThermoFisher Scientific, MAN0012036) és a hozzátartozó pufferrel, a gyártó által közzétett protokoll szerint állítottam össze a reakciót. Az annealációs hőmérsékletet és az elongációs időt a primerek

olvadáshője és fragmensek hossza alapján állítottam be. A megfelelő DNS fragmentum meglétét 0,9%-os agaróz gél segítségével ellenőriztük.

Gén	<i>chata</i>	<i>crhb</i>	<i>htr3a</i>
Annealing hő	57°C	57°C	59°C
Elongáció	1 perc	1 perc	1 perc

2. táblázat Az egyes vizsgált gének PCR paraméterei.

PCR tisztítás gélből

A megfelelő méretű fragmenseket szike segítségével kivágtam az agaróz gélből és Eppendorf csőbe tettem. Ezt követően kitisztítottam az adott DNS szakaszt (Molecular Biology Kit, BS654) gyártó protokollja alapján.

DNS fragmentum ligálása vektorba

A DNS fragmentumokat pGEM-T vektorba (Promega, A3600) ligáltuk a gyártó protokollját követve.

Transzformálás, molekuláris klónozás és szekvenálás

A ligátumokat kompetens DH5α *Escherichia coli* (ThermoFisher Scientific, 18265017) sejtekbe transzformáltuk, majd pedig ampicillint tartalmazó LB táptalajra szélesztettük. Kék-fehér szelekció után, steril fogpiszkáló segítségével átoltottunk belőle baktériumokat kupakkal rendelkező, kémcsőben lévő folyékony tápoldatba, melynek összetétele egyezett a korábban használt táptalajjal. Ezen kémcsöveket egy éjszakán át 37°C fokos rázatóban inkubáltuk. Ezután a GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, K0503) segítségével a gyártó protokollja alapján dolgozva megfelelő koncentrációban kinyertük az érdekelt géneket hordozó plazmidokat, majd Sanger szekvenálás segítségével meggyőződünk annak pontos bázissorendjéről.

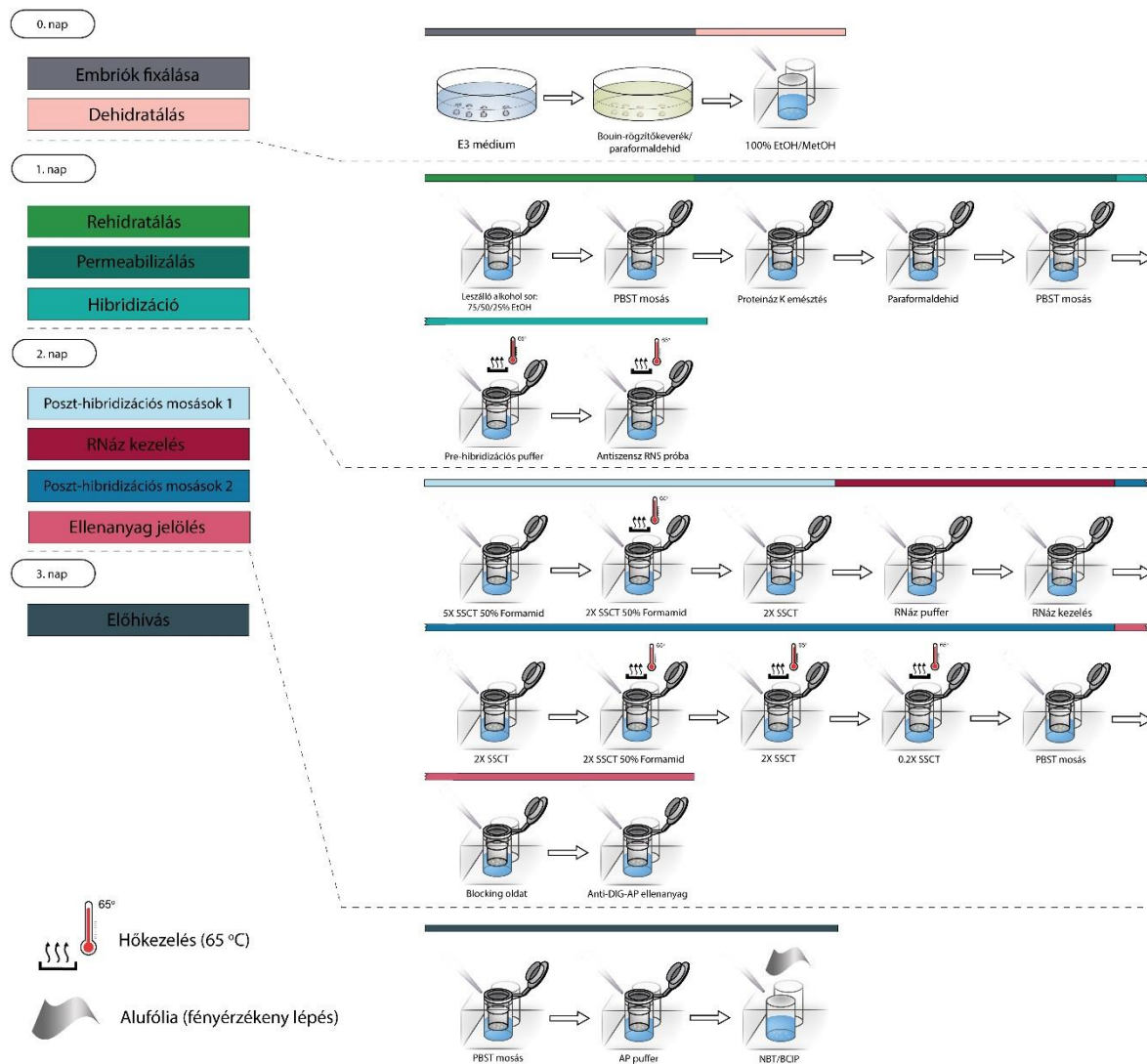
Antiszensz, in situ hibridizációs próba készítése

A megfelelő szekvenciát hordozó plazmidokat orientációnak megfelelően restriktációs endonukleázzal linearizáltuk, mely két órát vett igénybe 37°C-on, majd fenol-kloroform (ThermoFisher Scientific, 15593031) alapú tisztítást alkalmaztunk. Ez után RNS-polimeráz (ThermoFisher Scientific, SP6 - EP0131, T7 - EP011SKB008) segítségével megszintetizáltuk a digoxigeninnel jelölt antiszensz próbáinkat, mely szintén 2 óráig tartott és 37°C-on inkubáltuk őket. Ennek elvégzése után még egy tisztítási lépés következett.

In situ hibridizációs festés

A klasszikus *in situ* hibridizációs festést a Thisse labor protokollja alapján végeztük²⁷ (2. ábra), azzal a különbséggel, hogy a kísérletet 24 lyukú plate-en végeztük általunk gyártott szűrők segítségével. Továbbá hosszabb permeabilizálási időintervallumot alkalmaztunk, ugyanis a paradicsommal lárvákön átlagosan több ideig kell Proteináz-K (ThermoFisher Scientific,

25530049) kezelést alkalmazni, mint zebradánió – ez nagy valószínűséggel a két faj szöveti átjárhatóságának különbségeiből adódik. Az expressziós mintázatokat Ximea™ MQ022CG-CM kamerával rögzítettük.



2. ábra A műanyag lemezen végzett *in situ* hibridizáció folyamatábrája. Az ábra elkészítéséért köszönet Czimer Dávidnak.

Eredmények

In situ hibridizáció

Anatómiai sajátosságainak köszönhetően (vagyis a szikanyagban elhelyezkedő nagyméretű olajcsepp miatt) a paradicsomhal lárvák, ellentétben a zebradánió lárvákkal, a folyadék-víz felszínén lebegnek. Ez a korábbi protokollok részleges megváltoztatását igényelte⁷: az *in situ* hibridizációs próbákban történő inkubációt műanyag lemezekre és általunk készített szűrők segítségével végeztük. Emellett a zebradániókhoz használt protokolltól eltérően, hasonlóan az optimalizált immunjelöléses protokollunkhoz (lásd alább), több ideig emésztettük a paradicsomhalakat Proteináz-K-val.

Kolin-acetiltranszferáz a (chata)

A *kolin-acetiltranszferáz (chat)*, a központi és perifériás idegrendszer kolinerg neuronjaiban található enzim, mely az acetilkolin bioszintéziséért felelős²⁸. Az általunk vizsgált *kolin-acetiltranszferáz a (chata)* egy preszinaptikusan expresszálandó kolinerg gén, mely a fejlődés során a gerincvelő motorneuronjaiban, kraniális ganglionokban és a retina területén jelenik meg zebradánióban²⁹. Ehhez hasonló mintázatot tapasztaltunk a paradicsomhalak esetében is. Az 1, 2 és 4 dpf állatokban (3. ábra, A-F) specifikus festődést láthatunk az agyban és a gerincvelőben, míg a retina területén 4 dpf korban válik erőteljessé a *chata* expressziója (3. ábra, C és F).



3. ábra. A *chata* expressziója 1, 2 és 4 dpf paradicsomhalakon. A mintázatok dorzális (A, B, C) és laterális (D, E, F) nézetből láthatóak a képeken. A *chata* 1 dpf kortól kifejeződik a kraniális ganglionokban, illetve a gerincvelő motorneuronjaiban, a retinába területén pedig egyre erősödő expresszió tapasztalható az idő előrehaladtával.

Kortikotropin-releasing hormon b (crhb)

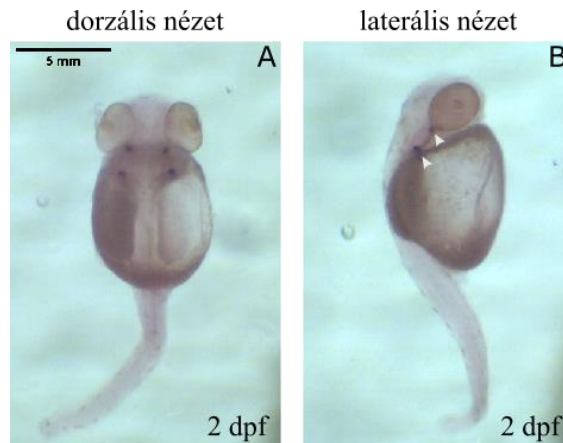
A kortikotropin releasing hormon (CRH) egy neuropeptid, mely szerepet játszik a hipotalamo-hipofízis-mellékvesekéreg tengely által közvetített stresszválaszban. A csontoshalakban a genomduplikáció eredményeként a *crha* és a *crhb* gének kódolják a szóban forgó faktort, azonban a *crhb* tekinthető a feltételezett funkcionális ortológusnak a humán *CRH* génnel. Expressziója zebradánióban számos agyi területen detektálható különböző stádiumú lárvákban, mint például a szubpalliumban, a preoptikus régióban, az utóagyban és a hipotalamuszban³⁰. A paradicsomhalakon végzett *in situ* hibridizáció eredményeként feltételezhető, hogy 1 és 2 dpf állatok esetében a szaglógumó, az előagy és a köztiagy mutat festődést (4. ábra, A és B)³¹, azonban 2 és 3 dpf korban a hipofízis területén is látható expresszió (4. ábra, B és C). A zebradánió esetében nem találtunk erről szóló adatot.



4. ábra. A *crhb* expressziója 1, 2 és 3 dpf paradicsomhal lárvákon. Az 1 dpf halakon az előagy és a köztiagy területén látható a gén kifejeződése (A), a 2 dpf halakon ezen felül a hipofízis területén (B), 3 napos dpf pedig a hipofízisben erőteljes a festődés (C).

5-hidroxitriptamine (szerotonin) receptor 3a (htr3a)

Az emberben előforduló 5-HT₃ receptorok alapvetően a központi, illetve a perifériás idegrendszerben található ligandum-kapcsolt ion-csatornák, melyek fontos szerepet töltenek be sokféle, szerotonin által regulált folyamatban. Az emberben található receptort két alegység alkotja, melyet a *HTR3A* és *HTR3B* gének kódolnak. Az 5-HT₃ receptorokat számos emberi betegséghez hozzákapsolták, mint például a pszichózis, szorongás, evési zavarok és alkoholizmus, azonban a zebadánióban előforduló *htr3a* génről és annak expressziós mintázatáról alig áll rendelkezésünkre információ³². A paradicsomhalak esetében 2 dpf korban láthatunk expressziót, valószínűsíthetően a középagy, illetve a hátsóagy területén fejeződik ki a *htr3a* (5. ábra, A és B).

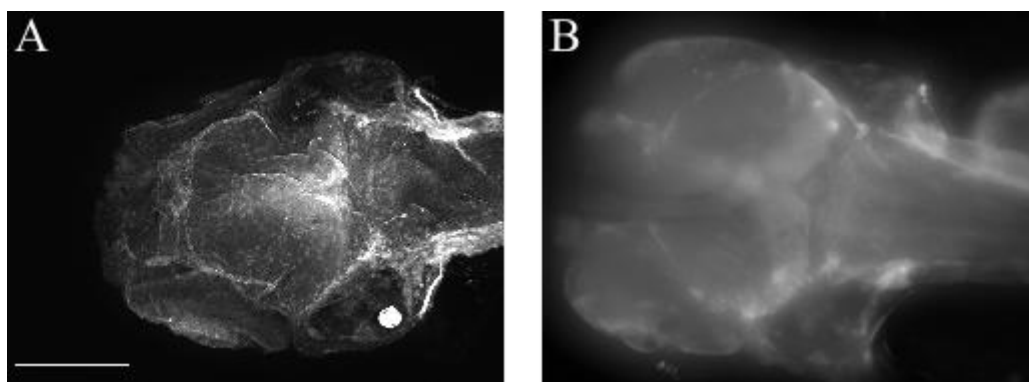


5. ábra. A *htr3a* expressziója 2 dpf paradicsomhal esetében. A *htr3a* expressziója a középagy és hátsóagy területén látható, ezt mutatja a dorzális (A), illetve laterális (B) nézetből készült kép a paradicsomhal lárvákról.

Immunfluoreszcens eljárás

Az immunfluoreszcens eljárás kezdetén először az 5 dpf zebradániókra írt STAR Protocols-ban megadott lépések szerint dolgoztam²⁰. Ekkor még csak a tERK jelölést alkalmaztam, ugyanis szerettem volna optimalizálni a kísérleteinket 5 dpf paradicsomhal lárvákra és ez egyszerűbbnek bizonyult teljes agy festése esetében, mint az idegrendszer aktív területeinek jelölésében, abból eredően, hogy az agy anatómiai felépítését jobban ismerjük, míg az agyi aktivitás mintázata kevésbé ismert és egyértelmű, főleg paradicsomhalak esetében.

Az első próbálkozás elején láthatóvá vált, hogy a metanol alkalmazása a fixálás után eltorzítja az agyi struktúrákat, így a továbbiakban nem alkalmaztam ezt a dehidratálási lépést (6. ábra, A). Ezt követően az eredményemen látszódott a tERK immunfluoreszcens jelölés agy-specificitása, de túl nagy volt a háttér és nem rajzolódtak ki élesen az agyi struktúrák (6. ábra, B). Ez valószínűleg azért történt, mert nem frissen fixált lárvákat használtunk, hanem olyanokat, amelyek több időt álltak PFA-ban.



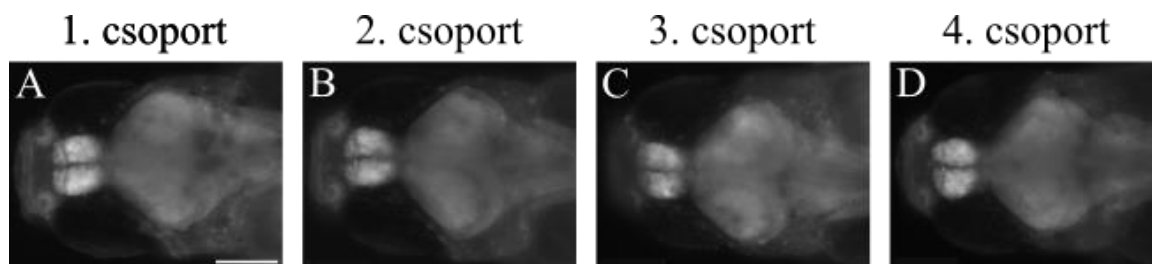
6. ábra. A tERK jelölés metanollal és metanol nélkül 5 dpf paradicsomhalon. A metanol használata eltorzítja az agyi struktúrákat (A). A fixálási időnek is van szerepe az immunjelölés sikerességében, ugyanis a több éjszakán át PFA-ban fixált halakon nem teljesen specifikus a tERK jelölés (B). (Méretarány: 200 μ m. Bal oldalon.)

A következőkben már olyan lárvákkal dolgoztunk, melyeket csak egy éjszakán át tároltunk PFA-ban és nem alkalmaztunk metanolt rajtuk. A tisztább és specifikusabb jel érdekében négy csoportra osztottuk a fixált állatokat. Ebben az emésztésre használt oldat koncentrációján, illetve a mosások számán változtattunk.

Csoport száma	Tripszin-EDTA koncentráció	Mosások száma
1	protokoll szerint	protokoll szerint
2	protokoll szerint	dupla mennyiség
3	dupla koncentráció	protokoll szerint
4	dupla koncentráció	dupla mennyiség

3. táblázat. Az optimalizálás részét képező paraméterek táblázata.

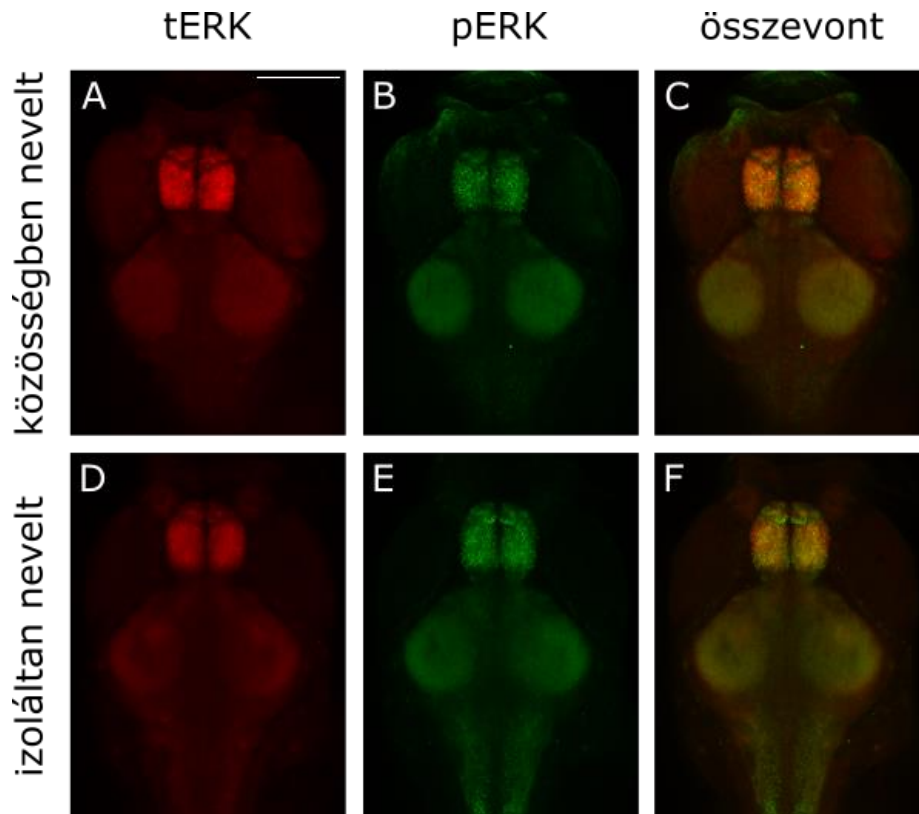
Az első csoport (protokoll szerint történő emésztés és mosás) esetében az agy struktúrájához köthető festődést tapasztaltunk, azonban nem teljesen specifikus a jel, ugyanis egyes idegrendszeri területek nem különülnek el egymástól (például a középagy és hátsóagy határvonalai nem rajzolódnak ki) (7. ábra, A). A második csoport (protokoll szerint történő emésztés, dupla mennyiségű mosás) esetében a háttér csökkenését láhattuk (7. ábra, B). A harmadik csoport (dupla koncentrációjú emésztés és protokoll szerint történő mosás) eredményeit kiértékelve elmondható, hogy a jel specifikusabb, itt már az eddigiekhez képest elkülönültebben jelennek meg a fentiekben említett agyi struktúrák. Azonban a protokoll szerinti mosások miatt ezen a képen nagy háttér látható (7. ábra C). A negyedik csoport (dupla koncentrációjú emésztés és dupla mennyiségű mosás) esetében azt tapasztaltuk, hogy a jel specifikusabb, mint amit az első két csoport eredményeinél láhattunk, illetve, hogy a háttér a dupla mosások hatására kisebb, mint amit az egyes és hármas csoport immunjelölése után kaptunk (7. ábra, D). Így a továbbiakban a négyes csoporton alkalmazott protokollt használtuk, nem csak a tERK, hanem a pERK kimutatására is (8. ábra).



7. ábra. A tERK immunjelölés optimalizálása 5 dpf paradicsomhalra. Első csoport, protokoll szerinti emésztés és mosás (A), második csoport, protokoll szerinti emésztés és dupla mennyiségű mosás (B), harmadik csoport, dupla koncentrációjú emésztés és protokoll szerinti mosás (C), negyedik csoport, dupla koncentrációjú emésztés és dupla mennyiségű mosás (D). (Méretarány: 200 μ m. Anterior a bal oldalon.)

Közösségben és izoláltan tartott paradicsomhalak tERK/pERK immunjelölése

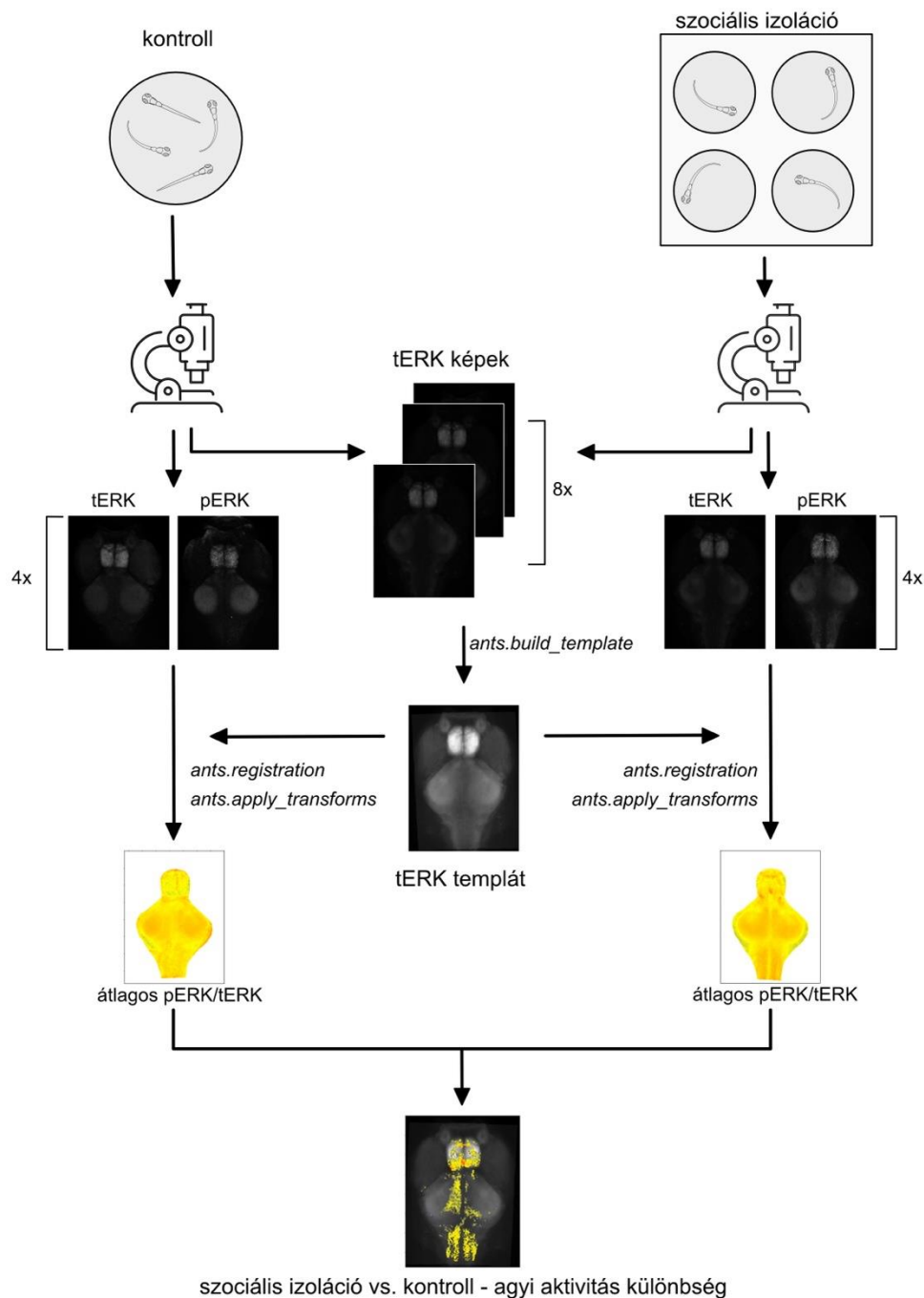
A tERK/pERK festéseket mind a közösségben és izoláltan tartott paradicsomhalak esetében is elvégeztük az előzőekben említett optimalizált protokoll alapján. Ezeknek a festéseknek a reprezentatív eredményét a 8. ábra mutatja.



8. ábra. **Izoláltan és közösségben nevelt paradicsomhalak tERK/pERK jelölése.** A közösségben nevelt 5 dpf hal agya tERK jelöléssel (A), közösségben nevelt 5 dpf hal agya pERK jelöléssel (B), közösségben nevelt 5 dpf hal agya tERK és pERK jelöléssel (C), izoláltan nevelt 5 dpf hal agya tERK jelöléssel (D), izoláltan nevelt 5 dpf hal agya pERK jelöléssel (E), izoláltan nevelt 5 dpf hal agya tERK és pERK jelöléssel (F) (Méretarány: 200 μ m. Anterior fent.)

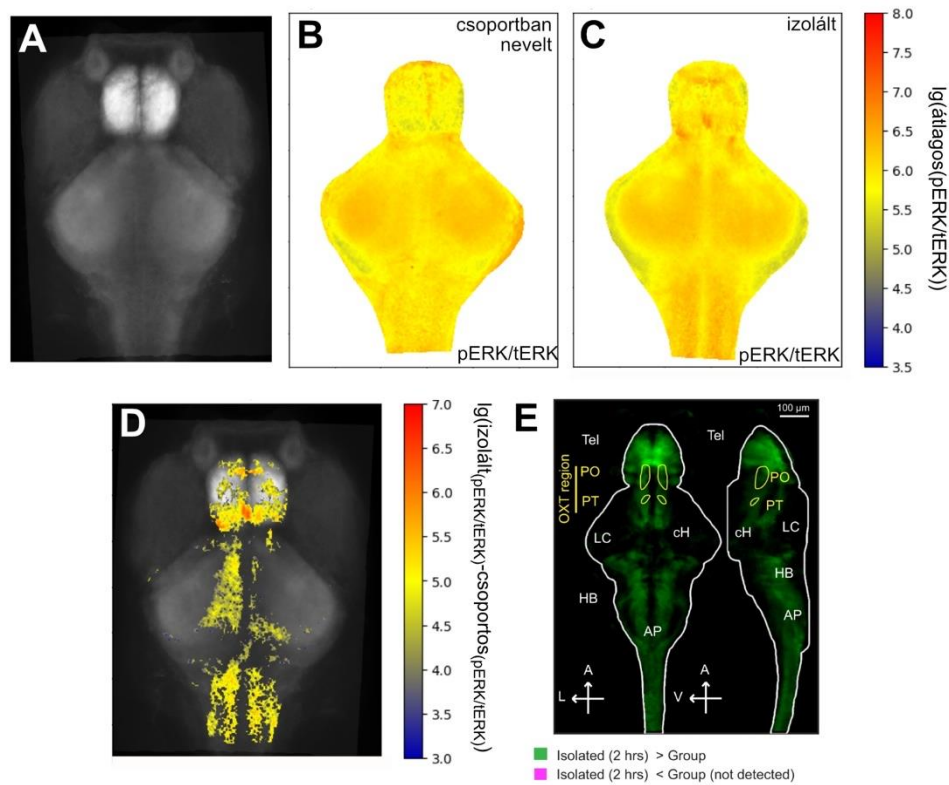
Agy-templát készítése

Ahhoz, hogy az izoláltan és közösségben nevelt állatok agyi aktivitása között különbségeket kvantitatívan vizualizálhassuk, előbb arra volt szükség, hogy az összes eredményt egy „referenciaagyra” vetítsük (9. ábra). Egy ilyen „paradicsomhal agy-templát” készítéséhez (10. ábra A) a tERK immunfluoreszcens festési eljárással készült képeinket használtuk fel. Ezt követően az egyes egyedek tERK, illetve pERK immunfluoreszcens jelöléssel készített képeit a már elkészített templátra „helyezve” kiszámíthattuk mind a csoportban, mind az izoláltan nevelt egyedekre jellemző átlagos pERK/tERK arányt, amelyet hőtésképen ábrázoltunk (9. ábra és 10. ábra B és C).



9. ábra: **Izolált és csoportban nevelt paradicsomhalak agyi aktivitása közötti különbség vizualizációjának folyamatábrája.** A részletek az „Anyag és módszer” fejezetben olvashatók. (A hallárvák képét Gil Costa készítette³³.)

Az így kiszámított átlagos pERK/tERK arányokat kivontuk egymásból és eredményeink alapján az izolált állatok agyában tapasztaltunk megnövekedett aktivitást (10. ábra D). Ez az elsőre meglepő eredmény összecseng zebradánióban végzett hasonló kísérletekkel, amelyek mind az akut, mind a krónikus izoláció esetében hasonló eredményekre jutottak (10. ábra E)²².



10. ábra: Izolált és csoportosan nevelt paradicsomhalak agyi aktivitása közötti különbség. (A) A tERK festések alapján létrehozott paradicsomhal agy „templát”. (B) A csoportban nevelt 5 dpf halak (n=4) agyi aktivitása hőterképen ábrázolva. (C) Izoláltan, egyedül nevelt 5 dpf paradicsomhal lárvák (n=4) agyi aktivitása hőterképen ábrázolva. (D) Az 5 dpf egyedül nevelt paradicsomhalak megnövekedett agyi aktivitása, a csoportosan nevelt halak aktivitásához képest. (Anterior fent.) (E) Agyi aktivitásbeli különbségek 7 dpf zebradániók agyában kétórás izolációt követően²³.

Diszkusszió

A referencia agyi atlaszok az utóbbi évtizedekben az idegtudományok pótolhatatlan eszközeivé váltak, amelyek segítségével nem csak az adott faj génexpresszióját tanulmányozhatjuk behatóbban, de segítséget nyújthatnak komplex, genetikailag kódolt viselkedésformák jobb megértésében is, valamint, más fajok atlaszával összevetve, fontos referenciapontok az idegrendszer és a viselkedés evolúciójának tanulmányozása során is.

Az ELTE Genetikai Tanszékén működő kutatócsoportunk egy jelenleg is zajló, nemzetközi szinten is úttörő munka keretében a paradicsomhalak viselkedésgenetikai modellé való fejlesztését végzi³⁴, amihez számos, más fajokban már rutinszerűen használt protokoll optimalizálása szükséges. Kutatómunkám során az agyi génexpresszió vizualizálására alkalmas *in situ* hibridizációs, illetve ellenanyagfestéses protokollokat állítottam be, valamint, további célom volt, hogy megteremtsem az első paradicsomhal agyi atlasz alapjait.

Munkánk során 5 dpf paradicsomhalak immunfluoreszcens jelölését követően szemikonfokális mikroszkóp segítségével nagy felbontású képeket készítettünk az eredményekről, amelyeket a későbbiekben *in silico* módszerek alkalmazásával dolgoztuk fel. A képeket elsődlegesen Fiji²⁴ segítségével szerkesztettünk, majd pedig az ANTs²⁵ programcsomag használatával végeztük el a képek regisztrációját és normalizációját. Annak érdekében, hogy a különféle génexpressziós mintázatokat vizualizálhassuk, optimalizáltuk 1-5 dpf paradicsomhalakra a zebradániókon már elterjedt klasszikus *in situ* hibridizációs próbákat, amelyek segítségével agyi-expressziót mutató géneket sikeresen vizualizáltuk, illetve elkezdtük a fluoreszcens hibridizációs láncreakció (HCR) zebradániókra optimalizált protokolljának optimalizálását is.

Ezekkel a módszerekkel sikeresen létrehoztuk a paradicsomhal agyi atlasz alapjául szolgáló agy-templátot és az általunk készített hőtérképek segítségével sikeresen vizualizáltuk a közösségben, illetve az izoláltan nevelt halak agyi aktivitását. Ezt a kettőt összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy az izoláltan nevelt paradicsomhalak agyi aktivitása általánosan is megemelkedett, hasonlóan az akut és krónikus izolációnak kitett zebradániókhoz²².

További vizsgálatok szükségesek annak a felderítésére, hogy pontosan mi okozza ezt az aktivitás-emelkedést. Zebradániókban végzett kísérletek arra engednek következtetni, hogy a szociális izolációban nevelt halak jellegzetes „szorongásos” agyi aktivitást mutatnak, ugyanakkor, csoportunk még nem publikált eredményei alapján, a paradicsomhal lárvák sokkal kevésbé érzékenyek a szociális izolációra, későbbi viselkedésüket kevésbé befolyásolja egy ilyen periódus.

Annak pontosabb megértésére, hogy milyen sejtek/sejtcsoportok esetében figyelhető a szociálisan izolált paradicsomhalak agyában aktivitás növekedés, szintén nagy segítségünkre lesz az általam készített agy-templát, amely referenciaként fog későbbi munkánk során működni, amin „térképezni” tudjuk majd a génexpressziós mintázatokat is.

Szerzői hozzájárulás

Alulírott Tarcsa Virág nyilatkozom, hogy a 37. OTDK-ra benyújtott Digitális atlasz létrehozása kínai paradicsomhal (*Macropodus opercularis*) agyvizsgálatának céljából című pályamunkámban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt:

Részfeladat	A részvétel mértéke
Agyspecifikus génexpresszió vizsgálata klasszikus <i>in situ</i> hibridizációs próbákkal.	5
Immunfluoreszcens eljárás optimalizálása és kivitelezése.	5
Csoportosan és szociális izolációban nevelt állatok agyi aktivitásának vizsgálata pERK, tERK festésekkel.	4
Agyi referencia-templát létrehozása ANTs programcsomaggal.	1
<i>In situ</i> hibridizációs próbák optimalizálása és kivitelezése.	3

Kelt: Budapest, 2024.07.26.

Kétszerzős pályamunka esetén:

____Tarcsa Virág____

Pályamunkát benyújtó hallgató (név)
aláírása

Társszerző (név)
aláírása

A nyilatkozatban foglaltak helyességét megerősítem:

____Dr. Varga Máté____

Eötvös Lóránd Tudomány Egyetem
Természettudományi Kar
Genetika Tanszék
Témavezető (név, munkahely)
aláírása

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Varga Máténak, hogy lehetővé tette számomra a laboratóriumában való munkát, valamint végtelen türelmét és a sok segítséget, amelyet nyújtott munkám során. Támogatásának mértékéhez egyedül Szabó Nóráé fogható, akinek hálás vagyok, hogy bevezetett a paradicsomhalakkal kapcsolatos laboratóriumi munka részleteibe és utat mutatott vizsgálataink során. További köszönet illeti Szabó Katát, akinek segítségére a kezdetektől fogva mindig számíthattam. Köszönöm továbbá a Halgenetikai Kutatócsoport minden tagjának munkám során nyújtott segítségét.

Irodalomjegyzék

- ¹Csányi, V. „Viselkedés, környezet, gének: etológiai tanulmányok” Székfoglaló (1997. január 21.).
- ² V. Altbäcker és V. Csányi, „Élő ragadozó az ingajárati akváriumban”, *Pszichológia* 2, 1987, 211–19
- ³Csányi és mtsai., „An Etho-pharmacological Analysis of Morphine Effects in Fish (*Macropodus opercularis*)”, *Behav. Proc.*, sz. 9 (1984a): 315–21
- ⁴ Vilmos Csányi és R. Gerlai, „Open-Field Behavior and the Behavior-Genetic Analysis of the Paradise Fish (*Macropodus opercularis*)” *J. Comp. Psych.*, sz. 102 (1988): 226–36
- ⁵ George Streisinger és mtsai., „Production of Clones of Homozygous Diploid Zebra Fish (*Brachydanio Rerio*)”, *Nature* 291, sz. 5813 (1981. május): 293–96
- ⁶ Anita Rácz és mtsai., „Housing, Husbandry and Welfare of a “Classic” Fish Model, the Paradise Fish (*Macropodus opercularis*)”, *Animals* 11, sz. 3 (2021. március 11.): 786
- ⁷ Erika Fodor és mtsai., „The Reference Genome of the Paradise Fish (*Macropodus opercularis*)”, *bioRxiv* 2023.08.10.552018; doi: <https://doi.org/10.1101/2023.08.10.552018>.
- ⁸ P.E. Roland és K. Zilles, „Brain Atlases - a New Research Tool”, *Trends in Neurosciences* 17, sz. 11 (1994. január): 458–67, [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(94\)90131-7](https://doi.org/10.1016/0166-2236(94)90131-7).
- ⁹ Allan R. Jones, Caroline C. Overly, és Susan M. Sunkin, „The Allen Brain Atlas: 5 Years and Beyond”, *Nature Reviews Neuroscience* 10, sz. 11 (2009. november): 821–28, <https://doi.org/10.1038/nrn2722>.
- ¹⁰ Heidi Kleven és mtsai., „Waxholm Space Atlas of the Rat Brain: A 3D Atlas Supporting Data Analysis and Integration”, *Nature Methods* 20, sz. 11 (2023. november): 1822–29, <https://doi.org/10.1038/s41592-023-02034-3>.
- ¹¹ Jeffrey M. Moirano és mtsai., „Rhesus Macaque Brain Atlas Regions Aligned to an MRI Template”, *Neuroinformatics* 17, sz. 2 (2019. április): 295–306, <https://doi.org/10.1007/s12021-018-9400-2>.
- ¹² Elaine H. Shen, Caroline C. Overly, és Allan R. Jones, „The Allen Human Brain Atlas”, *Trends in Neurosciences* 35, sz. 12 (2012. december): 711–14, <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.09.005>.
- ¹³ José M. Simões és mtsai., „A Three-Dimensional Stereotaxic MRI Brain Atlas of the Cichlid Fish *Oreochromis Mossambicus*”, szerk. Harold A. Burgess, *PLoS ONE* 7, sz. 9 (2012. szeptember 11.): e44086, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044086>.

- ¹⁴ Axel Meyer, „Phylogenetic Relationships and Evolutionary Processes in East African Cichlid Fishes”, *Trends in Ecology & Evolution* 8, sz. 8 (1993. augusztus): 279–84, [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(93\)90255-N](https://doi.org/10.1016/0169-5347(93)90255-N).
- ¹⁵ J-N Volff, „Genome Evolution and Biodiversity in Teleost Fish”, *Heredity* 94, sz. 3 (2005. március): 280–94, <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800635>.
- ¹⁶ Michael Kunst és mtsai., „A Cellular-Resolution Atlas of the Larval Zebrafish Brain”, *Neuron* 103, sz. 1 (2019. július): 21–38.e5
- ¹⁷ James B. Jaggard és mtsai., „Cavefish Brain Atlases Reveal Functional and Anatomical Convergence across Independently Evolved Populations”, *Science Advances* 6, sz. 38 (2020. szeptember 18.): eaba3126.
- ¹⁸ Inbal Shainer és mtsai., „A Single-Cell Resolution Gene Expression Atlas of the Larval Zebrafish Brain”, *Science Advances* 9, sz. 8 (2023. február 24.): eade9909, <https://doi.org/10.1126/sciadv.ade9909>.
- ¹⁹ Alan C. Evans és mtsai., „Brain Templates and Atlases”, *NeuroImage* 62, sz. 2 (2012. augusztus): 911–22, <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2012.01.024>.
- ²⁰ Laura Corradi és mtsai., „Using pERK Immunostaining to Quantify Neuronal Activity Induced by Stress in Zebrafish Larvae”, *STAR Protocols* 3, sz. 4 (2022. december): 101731, <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2022.101731>.
- ²¹ Zoltán K. Varga és mtsai., „Conserved Serotonergic Background of Experience-Dependent Behavioral Responsiveness in Zebrafish (*Danio rerio*)”, *The Journal of Neuroscience* 40, sz. 23 (2020. június 3.): 4551–64, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2178-19.2020>.
- ²² Hande Tunbak és mtsai., „Whole-Brain Mapping of Socially Isolated Zebrafish Reveals That Lonely Fish Are Not Loners”, *eLife* 9 (2020. május 5.): e55863, <https://doi.org/10.7554/eLife.55863>.
- ²³ Caroline L. Wee és mtsai., „Social Isolation Modulates Appetite and Avoidance Behavior via a Common Oxytocinergic Circuit in Larval Zebrafish”, *Nature Communications* 13, sz. 1 (2022. május 11.): 2573, <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29765-9>.
- ²⁴ Johannes Schindelin és mtsai., „Fiji: An Open-Source Platform for Biological-Image Analysis”, *Nature Methods* 9, sz. 7 (2012. július): 676–82, <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.
- ²⁵ Brian Avants, Nicholas J. Tustison, és Gang Song, „Advanced Normalization Tools: V1.0”, *The Insight Journal*, 2009. július 29., <https://doi.org/10.54294/uvnhin>.

- ²⁶ Charles R. Harris és mtsai., „Array Programming with NumPy”, *Nature* 585, sz. 7825 (2020. szeptember 17.): 357–62, <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2649-2>.
- ²⁷ Christine Thisse és Bernard Thisse, „High-Resolution *In Situ* Hybridization to Whole-Mount Zebrafish Embryos”, *Nature Protocols* 3, sz. 1 (2008. január): 59–69, <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.514>.
- ²⁸ Yoshio Oda, „Choline Acetyltransferase: The Structure, Distribution and Pathologic Changes in the Central Nervous System”, *Pathology International* 49, sz. 11 (1999. november): 921–37, <https://doi.org/10.1046/j.1440-1827.1999.00977.x>.
- ²⁹ Mohamad Rima és mtsai., „Dynamic Regulation of the Cholinergic System in the Spinal Central Nervous System”, *Scientific Reports* 10, sz. 1 (2020. szeptember 18.): 15338, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72524-3>.
- ³⁰ Helen Eachus és mtsai., „Zebrafish as a Model to Investigate the CRH Axis and Interactions with DISC1”, *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research* 26 (2022. október): 100383, <https://doi.org/10.1016/j.coemr.2022.100383>.
- ³¹ Gayathri Chandrasekar, Gilbert Lauter, és Giselbert Hauptmann, „Distribution of Corticotropin-Releasing Hormone in the Developing Zebrafish Brain”, *The Journal of Comparative Neurology* 505, sz. 4 (2007. december 1.): 337–51, <https://doi.org/10.1002/cne.21496>.
- ³² Jonas Melke és mtsai., „A Polymorphism in the Serotonin Receptor 3A (HTR3A) Gene and Its Association With Harm Avoidance in Women”, *Archives of General Psychiatry* 60, sz. 10 (2003. október 1.): 1017, <https://doi.org/10.1001/archpsyc.60.10.1017>.
- ³³ Gil Costa, Zebrafish Larvae – Top View, *Zenodo* (2020. július 1.), <https://doi.org/10.5281/ZENODO.3926623>.
- ³⁴ Nóra Szabó és mtsai., „The Paradise Fish, an Advanced Animal Model for Behavioral Genetics and Evolutionary Developmental Biology”, *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 2023. október 11., [jez.b.23223](https://doi.org/10.1002/jez.b.23223), <https://doi.org/10.1002/jez.b.23223>.