

## Beszámoló

### Bevezetés:

Az agy egyik kulcsfontosságú struktúrája a bazális amygdala (BA), mely fontos szerepet tölt be az emberi érzelmek és viselkedések szabályozásában. Más agyterületekkel összehangolt működése révén alapvető szerepet játszik az érzelmi ingerek felismerésében, melynek megfelelően elősegíti a fenyegetésre vagy jutalomra mutatott válaszok kialakítását. A mai napig nem teljesen tisztázott, hogy az amygdalán belül miként zajlik a negatív vagy pozitív értékkel bíró információk neuronális kódolása, illetve a magasabbrendű prefrontális kérgi területek működését hogyan szabályozzák az amygdalából érkező információk.

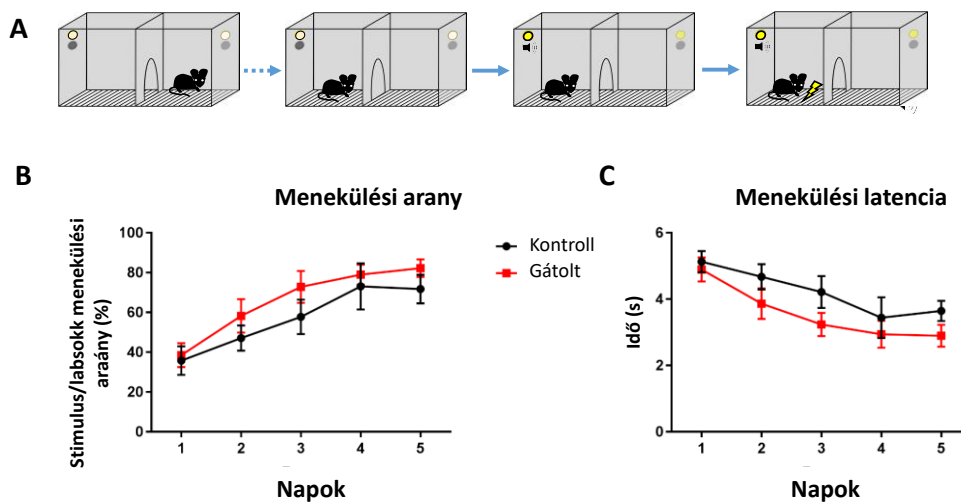
A BA-n belüli információk neuronális kódolásában feltehetően fontos szerepet töltenek be a be-es kimenő kapcsolataik, illetve genetikai, neurokémiai markereik alapján definiált idegsejtek populációs aktivitása. Habár a BA-ban megtalálható gátló interneuronok funkcionális diverzitása jól ismert, az amygdala serkentő fő sejtjeinek heterogenitására eddig főként morfológiai megfigyelések szolgáltattak alapot. A transzgenikus egereken alapuló technikák széleskörű elterjedése mára már lehetővé teszi, hogy genetikai alapon azonosított idegsejtcsoportokat szelektíven vizsgálhassunk az egyes agyterületeken.

A támogatott időszak során Dr. Hájos Norbert bloomingtoni laboratóriumában a BA-ban lokalizálódó arhgef-6 transzkripciós faktort kifejező idegsejtek szerepét vizsgáltam. Megfigyeléseink szerint az arhgef-6 kifejeződése a BA-n belül egy anteriorabban elhelyezkedő sejt típusra korlátozódik, melyek kimenete nem fed át a posteriorabban elhelyezkedő arhgef-6 negatív BA idegsejtjeivel, tehát feltehetően funkcionális diverzitás is megfigyelhető a két sejt populáció között. Anterior BA legfőbb kimeneti közé tartozik a dorzmedialis striatum (DMS) és medialis prefrontális kéreg (mPFC). Ezen agypályák funkcionális szerep még nem tisztázott, de az már bizonyított, hogy fontos szerepük van az emocionális feldolgozásban. Hipotézisünk szerint a fenti pályák döntő szerepet játszanak a kockázatos vagy kétes körülmények között hozott döntési folyamatok modulációjában.

### Eredmények:

A BA kiterjedt reciprok kapcsolatban áll a mediális prefrontális kéreggel (mPFC), amely alapvető szerepet játszik a kulcsingerek és a fenyegetések érzékelésében, illetve az ezekhez társuló memória nyomok kialakításában, így alapvető szerepet játszik a viselkedési válaszok szervezésében. Bloomingtonban való kitérkezésemkor bekapcsolódtam egy kísérletsorozatba, amely hogy BA-DMS pálya szerepét vizsgálta aktív elkerülési paradigma során interszekcionális virális módszerrel arhgef-6 egerekben. Mivel a megérkezésemről

kezdvé még 1.5 hónapig nem folytathattam vírus beadásokat a különböző online képzések és állatházi engedélyek megszerzéséig és állatkísérletes képzések elvégzéséig, így a fenti BA-DMS pálya kísérleti kiértékelésével foglalkoztam. Az aktív elkerülés paradigma során az állatok meg kell tanulják, hogy egy bizonyos stimulus prezentációjakor a kísérleti apparátus egyik kompartmentjéből a másikba kell átmenjenek, azért, hogy elkerüljék az ártalmas lábsokkot (1. ábra A). Egy TELC (tetanus light chain) nevezetű virális eljárás révén a DMS-be vetítő BA axonok preszinaptikus vezikula felszabadulását gátoltuk. Az analízis felfedte azt, hogy nem volt szignifikáns különbség az egyes teszt napok során a stimulusra adott menekülési arány (1. ábra B) és menekülési latenciában (1. ábra C) a gátolt és a kontroll csoportok között.

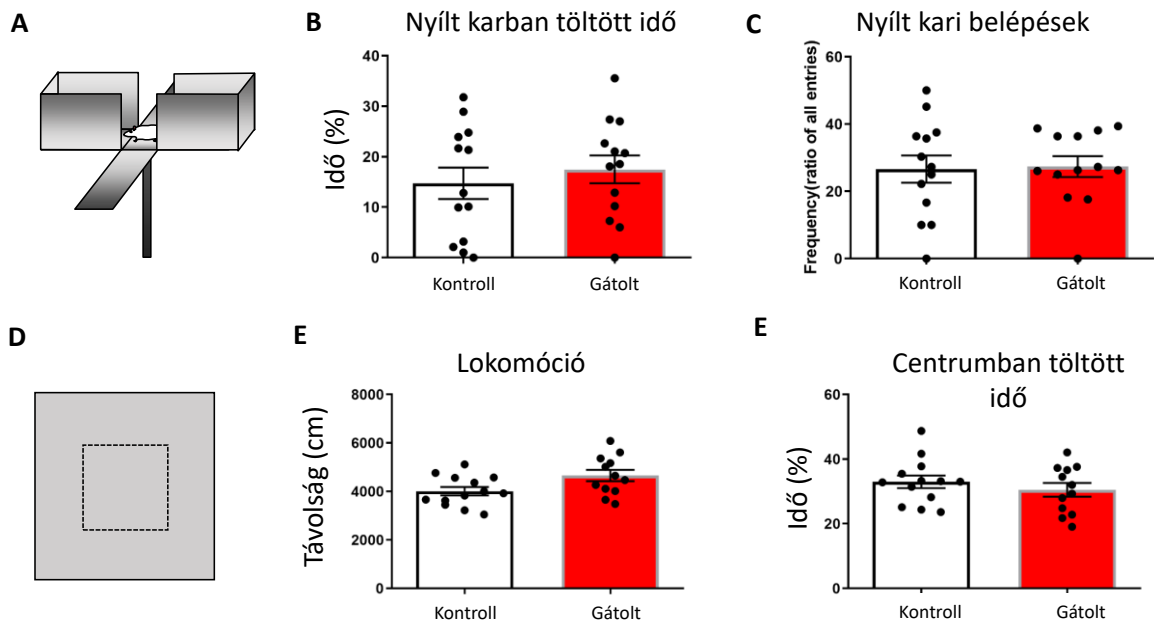


1. ábra BA-DMS pálya gátlása nem befolyásolja az aktív elkerülést.

A fenti negatív eredmény egy döntési pontot jelentettek a kutatási tervben folytatott kísérletek kivitelezésében. Ugyanis az aktív elkerülési paradigmában kapott eredmények megkérdőjelezték a tervezetben megnevezett BA-DMS pálya optogenetika gátlására irányuló kísérletek kivitelezését. Ezért Dr. Hájos Norberttel konzultálva a kísérletei itt két további irányba ágaztak szét. Az első során arhgef-6 egerekben a BA-mPFC pálya TELC mediálta gátlásának a hatását vizsgáltam szorongásszerű viselkedésben, illetve a veleszületett félelmi reakciók kifejezésében. A másik irány az eredeti terveknek megfelelően a BA-mPFC pályára fókuszált a kockázatos vagy kétes körülmények között hozott döntési folyamatok vizsgálatában.

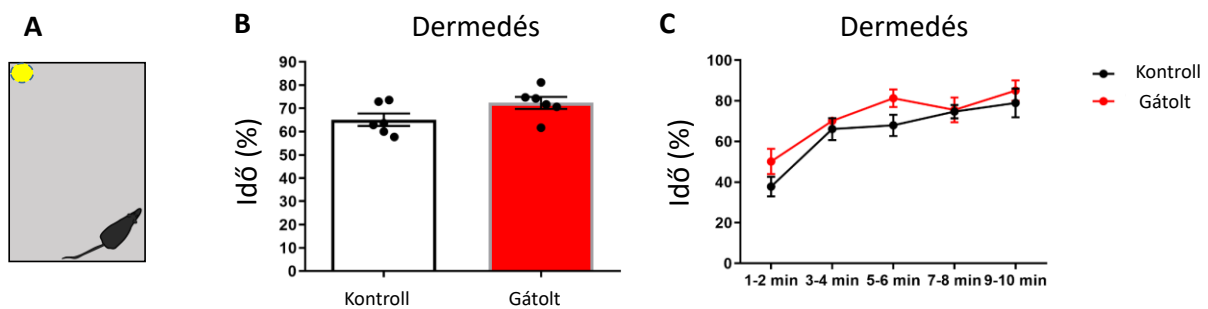
Eredményeim szerint a BA-mPFC pálya idegsejtjeinek TELC mediálta gátlása nem befolyásolta az egerek szorongásszerű viselkedését sem az emelt keresztpalló tesztben (2. ábra A, B, C), sem a nyílt tér tesztben (2. ábra D, E, F). A BA gátlása viszont szignifikánsan csökkentette az állatok emelt keresztpallón megfigyelhető kockázatfelmerő viselkedésével

töltött időt. Ezek fényében úgy tűnik, hogy az mPFC-be vetítő anterior BA neuron populáció gátlása nem döntő a szorongásszerű magatartás modulációjában, de implikált a környezeti kihívásokra adott válaszok integrálásban.



2. ábra A BA-mPFC pálya gátlása nem befolyásolja a szorongásszerű magatartást.

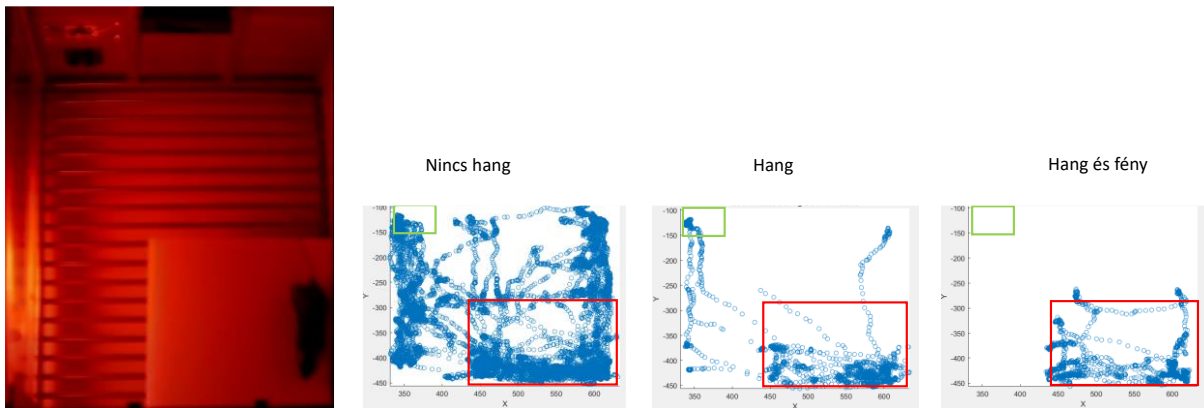
A ragadozószag elkerülés tesztben egy tesztdoboz egyik sarkába 2-methyl-tiazolint (1 ul, szintetikus rókaszag) cseppentettünk kupakba helyezett szűrőpapírral. BA szemben a ragadozószag elkerülés tesztben nem figyeltünk meg szignifikáns különbséget a rókaszagra mutatott félelmi válasz (dermedéssel töltött idő), illetve a rókaszag elkerülése utaló paraméterekben (szag zónában, illetve elkerülési zónában töltött idő, belépesi frekvencia) a gátolt és a kontroll csoportok között.



3. ábra A BA-mPFC pálya gátlása nem befolyásolja a veleszületett félelmi reakciót.

A bloomingtoni kutatásaim másik fő iránya a kockázatos vagy kétes körülmények között hozott döntési folyamatok neurobiológiai hátterére fókuszált. Az mPFC-ben lokalizáló parvalbumin tartalmú interneuronok (PV) döntő szerepet játszanak a félelmi válaszok szabályozásában és a bloomingtoni labor anatómiai előeredményei szerint sűrű inputot kapnak

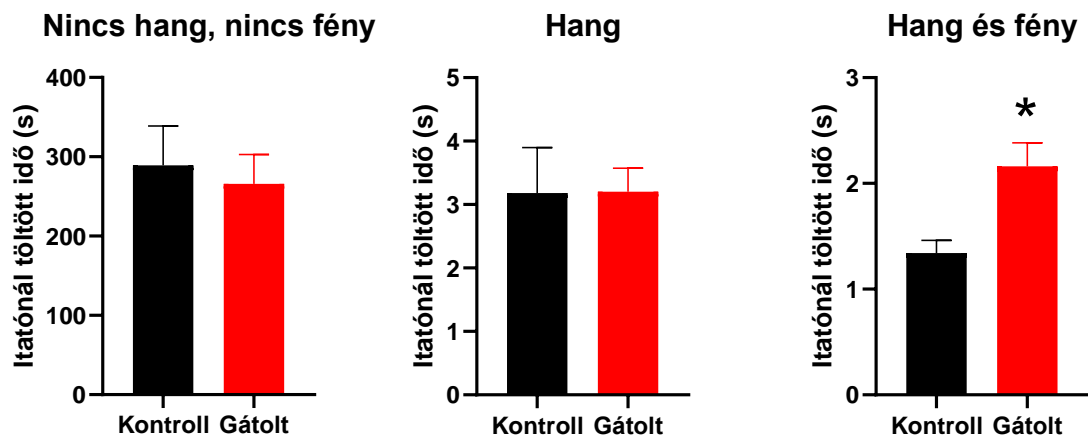
a BA-ból. Az már tudott, hogy az averzív stimulushoz kötött félelmi válaszokban a ledermedést modulálják, de az nem feltérképezett, hogy a szelektíven a BA-ból beidegzést kapó PV neuronpopuláció miként járul hozzá a kockázatos vagy kétes körülmények között adott viselkedési válaszok szervezéséhez. A kísérletek során bilaterális vírus injektálások révén fejeztem ki az interszekcionális víruskonstrukciókat PV-Cre egerek BA-jában (pEF1a-DIO-FLPo-WPRE-hGHpA) és mPFC-jében (AAV-hsyn-fDIO-hm4d(gi)-mcherry vagy pAAV-Ef1a-fDIO EYFP). Ez a kísérleti elrendezés lehetővé tette a BA által innervált mPFC PV sejtek kemogenetikai gátlását. A kísérleteket a megérkezésem után csak 3 hónappal tudtam elkezdni, mivel a megközelítés-elkerülés konfliktus doboz összeszerelése (4. ábra) tovább tartott a tervezettnél, mert az egyes komponensek több hetes késéssel érkeztek meg.



4. ábra Megközelítés-elkerülés viselkedési konfliktus doboz. Bal oldalt pillanatkép látható egy nyers videofelvételből, míg jobb oldalt a különböző döntést helyzetekhez tartozó mozgási aktivitás szoftveres detekciója.

Az összeszerelt teszt dobozt lehetővé tette a komplex fény és hangingerekhez kötött tanulás és döntéshozatal vizsgálatát. Az egerek citromsavas vizet kaptak a tartó dobozuk itatójából, ami növelte a motivációjukat a teszt dobozban való vízivásra. A teszt során egy hangjelzés első 10 másodpercében az egérnek döntést kellett hoznia, hogy több vizet szerez és ezzel megkockáztatja, hogy a következő 10 másodpercben elektromos lábsokkot kap (kockázatos választás) vagy kimenekül egy platformra ezzel elkerülve az elektromos lábsokkot (biztonságos választás). Ebben a paradigmában a hang prezentációjától számolt első 10 másodperc számít a megfontolási/döntési fázisnak, amikor is egy motivációs konfliktus során az állatnak választani kellett aközött, hogy csökkenti a szomját egy kellemetlen inger kockáztatásával vagy pedig a biztonságos platformra menekül. A betanítás periódusa alatt a szomjaztatott egerek megtanulták, hogy juthatnak vízhez egy itató nyílásból, majd hogy hogyan kerüljék el a lábsokkot a platformra menekülés révén. A kondicionálás hoz egy 20 másodperces hang jelet alkalmaztam, amely együtt végződött egy lámpa felvillanásával, amely az itató nyílásnál villant fel. Az eredmények értékelésekkor a döntési időablak alatti (hangtól számított

első 10 másodperc), kockázatos választások alatti és biztonságos választások alatti időintervallumokat analizáltam (4. ábra jobb oldal). Eredményeim szerint a BA-ból beidegzett mPFC PV neuronok gátlása szelektíven megnövelte az itatónál töltött időt a leginkább kockázatosnak számító periódusban a kontroll csoporthoz képest (5. ábra). Az elkerülési frekvenciákban nem mutatkozott szignifikáns különbség egyik tanulmányozott időintervallumban sem. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a BA az mPFC PV neuronokon keresztül befolyással bír a kockázatos döntések elősegítésében.



5. ábra A BA által beidegzett mPFC PV neuronok gátlása növeli a kockázatos viselkedési válaszokkal töltött időt.

A bloomingotni munka során lehetőségem volt beletanulni az *in vitro* elektrofiziológiai mérések kivitelezésében. Megtanultam a mérőoldatok és preparátum előkészítést, és a sejtre való patchelést (gigaseal) és az alapvető elméleti tudnivalókat. A tanulási folyamat meglehetősen hosszúra nyúlt. Sajnos a rendelkezésre álló időbe már nem fért bele a tervezett *in vitro* kísérletek elvégzése.

#### Összegzés:

Bloomingotni kutatómunkám fókuszában az anterior BA neuronjainak és a BA-DMS, illetve BA-mPFC pályák vizsgálata állt különböző viselkedési paradigmákban. A BA-DMS pálya gátlásának nem volt hatása az aktív elkerülés viselkedési paradigmában. A BA-mPFC pálya gátlása nem befolyásolta a szorongásszerű és a veleszületett félelmi reakciók megjelenését. Eredményeim rávilágítottak, hogy azok az mPFC-ben található PV tartalmú neuronoknak a gátlása, amelyek a BA-ból kapnak szelektív beidegzést megnövelik a kockázatos viselkedési válaszok időtartamát. A fentiek mellett alapfokú jártasságot szereztem az *in vitro* elektrofiziológiai módszer alkalmazásában.