

A colliculus superior multiszenzoros jelfeldolgozása

A dolgozatot készítette:

Bakacsi Anna Virág

biológus mesterszakos hallgató (II. évf.)

Eötvös Loránd Tudományegyetem,

Természettudományi Kar,

Biológiai Intézet



Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet,

Hálózat és Viselkedés Neurobiológiai Kutatócsoport



Témavezető:

Dr. Mátyás Ferenc

kutatócsoport vezető

Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet,

Hálózat és Viselkedés Neurobiológiai Kutatócsoport

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
Összefoglaló	3
Rövidítésjegyzék	4
Bevezetés	5
Multiszenzoros jelfeldolgozás	5
Az SC multiszenzoros jelfeldolgozása	5
Az SC félelmi kondicionálásban betöltött szerepe	7
Célkitűzések	9
Anyagok és módszerek	10
Kísérleti modell állatok	10
Sztereotaxiás műtétek	10
In vivo elektrofiziológiai elvezetések	11
Perfúzió	13
Metszet előkészítés	13
Elvezetési adatok elemzése	13
Eredmények	14
Az SC mély rétegi glutamaterg sejtjeinek sajátosságai	14
A PIL sejtekre érkező információ	21
Diskusszió	22
Irodalomjegyzék	23
Köszönetnyilvánítás	25
Függelék	26

Összefoglaló

Agyunk egyik fő feladata a multiszenzoros környezetben felismerni az egyén számára fontos ingereket, azokat integrálni, és megfelelő válaszreakciót kialakítani rájuk. Mivel ez a folyamat az élőlény túlélése szempontjából elengedhetetlen, a lehető legrövidebb idő alatt kell bekövetkeznie. Az affektív ingerek feldolgozásának egyik korai állomása a *colliculus superior* (SC), mely ismert helyszíne a multiszenzoros jelintegrációnak; azonban az utóbbi években más, kognitív folyamatokkal, például a veleszületett félelmi viselkedések kiváltásával is kapcsolatba hozták. Ezek az irodalmi adatok azonban megosztóak a *colliculus* pontos szerepével kapcsolatban. Dolgozatomban optogenetikai és elektrofiziológiai eszközök segítségével az SC potenciális szerepét vizsgálom egy széles körben használt asszociációs félelmi tanulás során. Extracelluláris soksejt aktivitás elvezetéseimmel bemutatom, hogy az SC glutamáterg sejtjei képesek lehetnek a félelmi tanuláshoz szükséges ingerek gyors (néhány 10-20 ms-on belüli) feldolgozására, ezek integrációjára és az így összekapcsolt információcsomag talamuszba történő gyors továbbítására. Ezen kívül feltérképezem, hogy az ehhez szükséges (valószínűleg agytörzsi) bemenetek honnan erednek. Mindezzel dolgozatom hozzájárul az SC jeltársító sajátságának, különös tekintettel a félelmi asszociációs tanulás során betöltött szerepének pontosabb megismeréséhez.

Rövidítésjegyzék

AAV	adeno-asszociált vírus
AMY	amigdala
B32	32 csatornás, szilícium alapú elektróda
<i>Cb</i>	kisagy
CeA	centrális amigdala
CR	calretinin
CTX	kortex/agykéreg
HPC	hippokampusz
HTH	hipotalamusz
<i>IC</i>	<i>colliculus inferior</i>
ISI	inter stimulus intervallum
LA	laterális amigdala
OF	optikai szál
PB	foszfát puffer
PBG	parabigeminális nukleusz
PIL	poszterior intralamináris talamikus nukleusz
<i>SAI</i>	<i>stratum album intermedium</i>
<i>SAP</i>	<i>stratum album profundum</i>
SC	<i>culliculus superior</i> /felső ikertest
<i>SGI</i>	<i>stratum griseum intermedium</i>
<i>SGP</i>	<i>stratum griseum profundum</i>
<i>SGS</i>	<i>stratum griseum superficiale</i>
SO	<i>stratum opticum</i>
TH	talamusz
vGluT2	2-es típusú veziikuláris glutamát transzportert kifejező sejt (=glutamáterg)

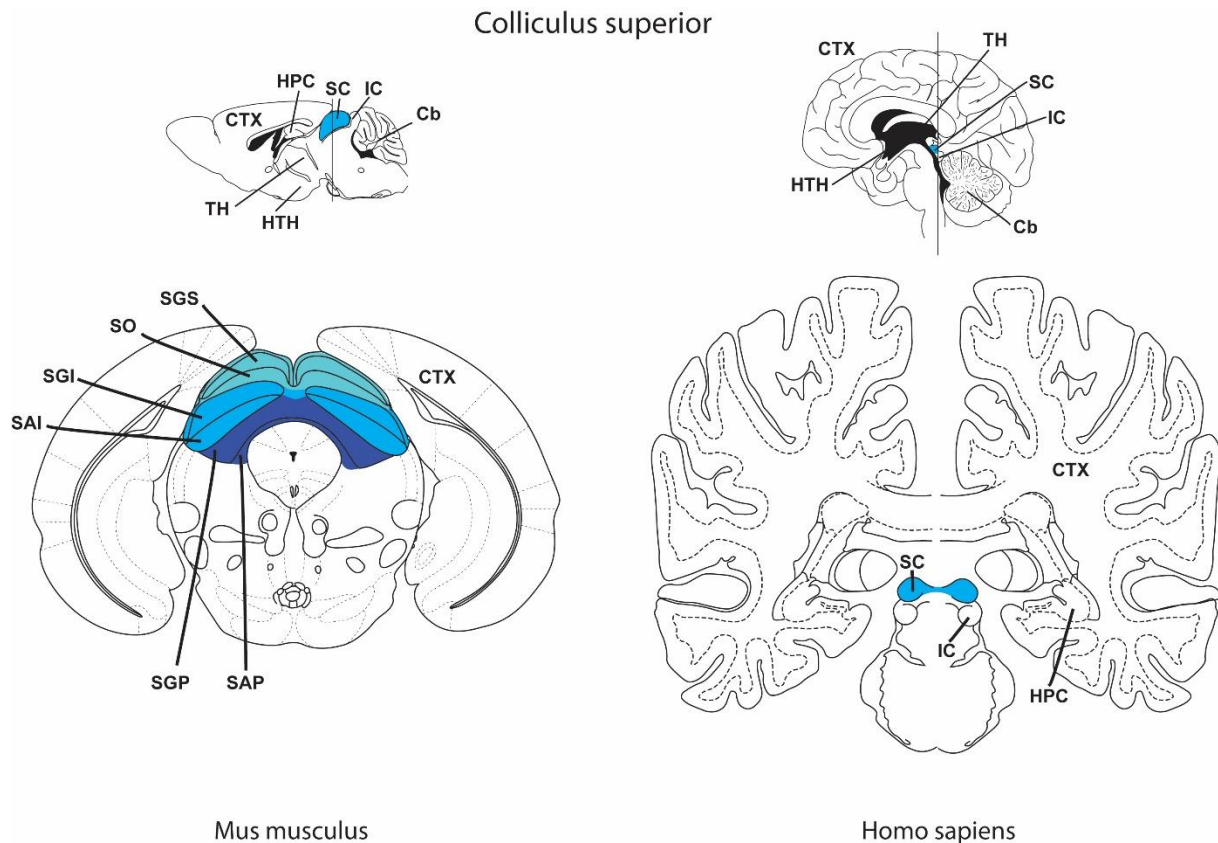
Bevezetés

Multiszenzoros jelfeldolgozás

Agyunk egyik fő feladata a multiszenzoros környezetben felismerni az egyén számára fontos ingereket, azokat integrálni, és megfelelő válaszreakciót kialakítani rájuk. Ezek az integráló folyamatok a szenzoros feldolgozás fontos részét képezik és jelen lehetnek minden olyan élőlényben, amely egynél több érzékszervvel képes a környezete észlelésére. Mivel ez a folyamat az élőlény túlélése szempontjából elengedhetetlen, így mindennek a lehető legrövidebb idő alatt kell bekövetkeznie. Korábban a jelenséget automatikus és különálló folyamatnak hitték, azonban az utóbbi évtizedekben egyre több kutatás mutat rá arra, hogy a multiszenzoros jelintegráció egy összetett, sok tényezőn alapuló folyamat és a jelfeldolgozás különböző szintjein is megjelenhet (Stein, 2012; Talsma et al., 2010). Felismerték, hogy a folyamat modulálható a figyelmi állapot függvényében, és a különböző modalitások is hatással lehetnek egymásra, erősíthetik vagy gyengíthetik is egymást (Choi et al., 2018; Talsma et al., 2010).

Az SC multiszenzoros jelfeldolgozása

A multiszenzoros jelintegráció egyik igen kutatott helyszíne – az agykéreg alatti területek közül – a *colliculus superior* (SC) vagy magyarul a felső ikertest. A már 2020-as dolgozatomban és BSc. szakdolgozatomban is részletesen bemutatott SC egy evolúciósan konzervált struktúra, mely minden emlős agyában megtalálható (Suzuki et al., 2019). A többi gerinces élőlény agyában pedig egy az SC-hez hasonló felépítésű és funkciójú terület van jelen, azonban ezeknél a fajoknál a struktúrát a „*colliculus superior*” helyett a „*tectum opticum*” névvel illetik (Suzuki et al., 2019).



1. ábra: Az SC anatómiai elhelyezkedése egér (*mus musculus*) és humán (*homo sapiens*) agyban; Ding et al., 2016 illetve Paxinos & Franklin, 2001 atlaszok alapján készült ábrák a BSc. szakdolgozatomból kiemelve; Rövidítések: CTX - cortex, TH – thalamus, HTH – hypothalamus, HPC – hippocampus, SC – colliculus superior, IC – colliculus inferior, Cb – cerebellum, SGS – stratum griseum superficiale, SO – stratum opticum, SGI – stratum griseum intermedium, SAI – stratum album intermedium, SGP – stratum griseum profundum, SAP – stratum album profundum

Maga az SC egy rétegekre bontható magpár (**1. ábra**), mely az emlős középagy boltozatos tetejét, a tectum-ot képezi. A rétegek mind humán, mind pedig rágcsálókban függőlegesen egymáson fekvé helyezkednek el és mindkét fajban nagyjából hetet különíthetünk el belőlük (May, 2006) (**1. ábra**). Ezek a rétegek nemcsak sejttípus, de funkció szerint is elkülöníthetőek egymástól. Általánosan elfogadott felosztási mód a rétegeket a dorzo-ventrális helyzetük alapján megkülönböztetni. Az így keletkező felső, közbső, illetve alsó rétegek közül a felső réteg szállítja a látással kapcsolatos ingereket, itt futnak a vizuális pálya rostjai. Az alsóbb rétegek funkciója kevésbé inger specifikus, ezek sejtjeire már nem csak vizuális információ

érkezhet, hanem más modalitásból származó, például auditoros vagy szomatoszenzoros inger is (Cang et al., 2018).

Az irodalmi adatok alapján az SC egy a külvilágról alkotott sokdimenziós térkép alapján épül fel, ahol az azonos forrásból származó, például audiovizuális ingerek egyazon idegsejteken konvergálhatnak. Az itt lévő idegsejtek receptív mezején kívül eső ingerek gátlást váltanak ki azokban, ezáltal elkerülve az össze nem tartozó ingerek konvergenciáját, vagyis a helytelen ingertársítást (Alex Meredith & Stein, 1986; Stein et al., 2014). A dorzo-ventrális felosztás alapján a felső réteg tartalmazza az úgynevezett „wide field” vagyis széles receptív mezővel rendelkező idegsejteket, amelyek funkcióját a gyorsan mozgó préda detektálásával hozták kapcsolatba (Hoy et al., 2019). A mélyebb rétegek olyan „narrow field” vagyis szűk receptív mezőjű sejteket tartalmaznak, amelyek képesek befolyásolni a vizuális információ alapjánuló motoros kimeneteket (Hoy et al., 2019). Ezek a sejtek irányíthatják a szemek orientációját főemlősökben, de kisebb emlősökben, például rágcsálókban, akár a fej vagy az egész test helyzetére is befolyással lehetnek (Gandhi & Katnani, 2011).

A jelintegráción és a vizuális ingerek feldolgozásán kívül az SC szerepét megemlíti még magasabb mentális folyamatokkal, például döntéshozatallal (Crapse et al., 2018) vagy egyes félelmi viselkedések kivitelezésével kapcsolatban is (Barsy et al., 2020).

Az SC félelmi kondicionálásban betöltött szerepe

Az utóbbi években sokasodó irodalmi adatok arra is rámutattak, hogy a struktúra szerepe nem csak jelátkapcsolásra vagy azok integrációjára korlátozódik, hanem magasabb rendű folyamatok végrehajtásában is közre játszhat (Isa et al., 2022). Ilyenek például a bizonyos félelmi viselkedésformák kiváltása.

A félelmi asszociációs tanulás során bekövetkező asszociáció is egy fajta jelintegráció, mely a feltétlen és feltételes ingerek társítása révén alakít ki emléknymokat.

Az SC-t egyre több tudományos munkában hozzák összefüggésbe a félelmi reakciókkal, mely során több, SC-t érintő idegpályát is azonosítottak. Ilyen például a colliculus superior – poszerior intralamináris talamikus mag – laterális amigdala (SC-PIL-LA) pálya (Barsy et al., 2020), illetve a colliculus superior – parabigeminális nukleusz – centrális amigdala (SC-PBG-CeA) pálya (Isa et al., 2022). A 2020-as intézeti BTDK konferencián, majd 2021-es OTDK konferencián bemutatott dolgozatomban az előbb említett SC-PIL-LA pályán belül az SC-PIL kapcsolatát vizsgáltam viriális és immunhisztokémiai módszerekkel. Akkor arra a

megállapításra jutottam, hogy az SC mélyebb rétegei sűrűbb axonhálózattal látják el a PIL calretinin (CR) pozitív, amigdalába vetítő sejtjeit. Ezek a talamikus sejtek szerepet játszanak a félelmi kondicionálás során a feltétlen és feltételes ingerek asszociációjában (Barsy et al., 2020). A dolgozatomban azt is bemutattam, hogy a PIL CR+ sejtjeit behálózó SC idegsejtek lehetnek 2-es típusú veziikuláris glutamát transzportert (vGluT2) vagyis (serkentő) glutamáterg, illetve veziikuláris GABA transzportert (vGAT) kifejező, vagyis (gátló) GABAerg típusúak is.

Az elmúlt években publikált, az SC félelmi viselkedésben betöltött szerepét vizsgáló tanulmányokban azonban nem egyértelmű, hogy a félelmi reakcióért felelős pálya az SC mely funkcionálisan is elkülöníthető területéről származik. Egyes adatok szerint az SC felső rétege, annak is parvalbumin pozitív sejtjei biztosítják a félelmi pálya bemeneteinek nagy részét (Kim et al., 2020), mások szerint a mélyebb rétegek felelősek a félelmi viselkedésformák (egér modellben freezing és menekülés) kiváltásáért (Barsy et al., 2020). Egy frissen megjelent tanulmány azt is bemutatta, hogy akár mindkét réteg sejtjei képesek lehetnek a félelmi viselkedésformák megnyilvánulását okozni (Cai et al., 2022). Ez utóbbi cikk alapján a felsőbb rétegek aktiválása az állat ledermedését eredményezi, a mélyebb rétegek aktivációja pedig menekülési viselkedést vált ki az állatban. Továbbá fontos megemlíteni még, hogy a legtöbb SC-n átkapcsoló félelmi pályát a vizuális félelmi reakciókkal hozták kapcsolatba a colliculus közvetlen retinális beidegzéséből adódóan (Isa et al., 2022; Kim et al., 2020), annak ellenére, hogy az SC sejtek (főképp a mélyebb rétegekben) multimodális beidegzésűek, ahogy ezt már korábban tárgyaltam.

Célkitűzések

Dolgozatomban az SC sokszínűsége, illetve a róla szóló irodalmi adatok megosztottsága miatt fontosnak találtam, hogy tovább vizsgáljam az SC sejtek, illetve az SC-PIL pálya által szállított információk modalitását. Elsődleges célkitűzésem volt, hogy megfigyeljem az SC milyen módon képes modulálni a rajta átkapcsoló (vizuális, auditoros és szomatoszenzoros-fájdalmi) ingereket. Az SC működésének összetettségéből adódóan további problémát jelent, hogy az SC sejtei nemcsak a retina és az agytörzsi magok által kapnak szenzoros információkat, hanem rendelkeznek agykérgi visszacsatolással is (Gale & Murphy, 2014; May, 2006). Ez abban bonyolítja az SC vizsgálatát, hogy a kísérletek során valamilyen módon képesnek kell lennem elkülöníteni ezt a két külön pályáról (a perifériáról és az agykéregből) érkező aktivitást és meghatározni, hogy melyik lehet képes információt közvetíteni a PIL CR+ sejteire az asszociációs félelmi tanulás során.

Mindezen kérdések megválaszolásának érdekében legfőbb célom volt:

- Megvizsgálni az SC glutamáterg sejteinek különböző modalitásokra, továbbá azok szimultán jelenlétére adott választ és megállapítani, hogy képes lehet-e a colliculus mélyebb rétege a rá beérkező szenzoros információkat nem csak átkapcsolni, hanem integrálni is.
- Meghatározni az SC szenzoros bemeneteinek eredetét (agykérgi vagy agytörzsi) hiszen az irodalomban a legtöbb jelintegráló és moduláló funkciót a colliculus agykérgi visszacsatolásának tulajdonítanak.
- Ebből következőleg pedig megvizsgálni, hogy az SC sejtek milyen információtartalommal képesek ellátni a gyors asszociációs félelmi tanulásban résztvevő PIL sejteket, és meghatározni, hogy az ide érkező információ feldolgozottságának mértékét.

Anyagok és módszerek

Kísérleti modell állatok

A korábbi TDK dolgozatomhoz hasonlóan, a jelen dolgozatomhoz szükséges kísérletek során is az állatok kezelése az érvényes magyar állatvédelmi törvényekben (40/2013. (II. 14.) kormányrendeletben) foglaltaknak megfelelően történt a Pest Megyei Kormányhivatal által kiadott engedély alapján (PEI/001/2290-11/2015 és PE/EA/574-7/2021). Az állatok tartása standard körülmények között, nemenként elkülönítve, 2x12 órás napi ritmusban (12 óra világos/12 óra sötét) zajlott. A táplálék és folyadék folyamatos hozzáférhetősége folyamatosan biztosítva volt az állatok számára.

Minden beavatkozást érzéstelenítés előzött meg. A műtétek, illetve mérések során pedig ügyeltem az állatok állandó testhőmérsékletének fenntartására, illetve gondoskodtam az állatok műtét utáni fájdalomcsillapításáról is.

A kísérleteket 2-3 hónapos hím vGluT2-Cre transzgenikus egereken (*Mus musculus*) végeztem.

Sztereotaxiás műtétek

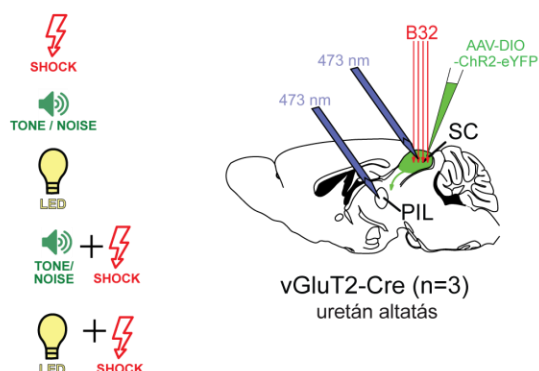
Az állatokat izoflurános elbódítás után ketamin (75 mg/kg) – xylazil (5 mg/kg) keverékkel altattuk el, majd fejüket sztereotaxiás készülékben rögzítettük. Ezek után a fejbőrt felvágva kimértük a célterület helyét, amely felett lyukat fűrtünk a koponyán és üveg pipetta (átmérő: 20-30 μ m) segítségével 3 mélységben 3*50nl AAV5-EF1a-DIO-hChR2(H134R)-eYFP-WPRE-hGH Cre-dependens fluoreszcens channelrhodopsin 2-t kifejező adeno-asszociált vírust (AAV) injektáltunk az adott agyi területre. A beadási koordinátákat a 2001-es kiadású Franklin-Paxinos egéragy atlasz alapján határoztuk meg, amelyek a Bregmától számítva a következők voltak:

- AP: -3,5 mm
- ML: 0,7 mm
- DV: -1,2 -1,4 -1,6 mm

In vivo elektrofiziológiai elvezetések

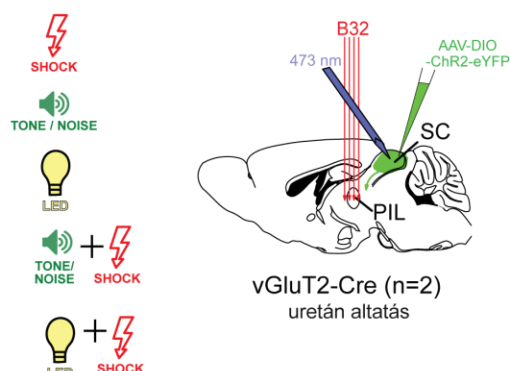
A 1. kísérleti felállítás:

SC elvezetés, SC és PIL optogenetikai ingerléssel, különböző modalitások jelenlétében



B 2. kísérleti felállítás:

PIL elvezetés, SC optogenetikai ingerléssel, különböző modalitások jelenlétében



2. ábra – a kísérleti felállások; az ábrán a tervezett kísérletek összefoglalása látszik, ahol az egyes állatoknak leadott stimulusok (sokk, kétféle hang, vizuális inger, illetve ezek különféle párosításai) láthatóak, továbbá az egyes elvezetési és ingerlési pontok; Rövidítések: SC – colliculus superior, PIL – poszterior intralamináris talamikus nukleusz, B32 – 32 csatornás Buzsáki szilícium elektróda, 473 nm – 473 nm hullámhosszú fényt emittáló optikai szál

A kísérleti állatokon a megfelelő (kb. 4 hét) expressziós idő elteltével in vivo elektrofiziológiai elvezetéseket végeztem. Az egerek altatása uretánnal (1,4 g/kg) történt. Ezt követően a fejbőrt felvágtam és a megfelelő területen ablakot nyitottam a koponyán. A kísérlet típusától függően optikai szál (OF) vagy egy 32 csatornás szilícium alapú elektródát (Buzsáki, B32) vezettem le a megfelelő agyi területekre. A koordináták a Bregmához viszonyítva az **1. táblázat**-ban olvashatóak.

Típus (agyterület)	Elektróda (SC)	Elektróda (PIL)	OF (SC)	OF (PIL)
Kar dőlési szöge:	0°	0°	20° - az AP síkban	20° - az ML síkban
AP:	-3,7 mm	-3,1 mm	-2,6 mm	-3,0 mm
ML:	0,7 mm	1,6 mm	0,7 mm	2,9 mm
DV:	-1,5 mm	-3,0 mm	-1,27 mm	-3,0 mm

1. táblázat – kísérleti koordináták; a táblázatban az egyes oszlopok az elektrofiziológiai mérések során használt karok dőlésszögét, továbbá az elvezetések és optikai ingerlések pontos koordinátáit tartalmazzák agyterületenkénti és kísérlettípus szerinti bontásban.

Az elektróda referenciájaként egy az ablakkal ellentétes oldalon koponyába rögzített csavar szolgált. Az optikai szálakhoz csatlakoztatott, 473 nm hullámhosszú fényt kibocsátására

képes lézereket minden kísérletet megelőzően egységesen 16mW-os erősségűre állítottam. Ezek segítségével a sejtek vagy axonterminálisok optogenetikai aktiválására 5 ms hosszúságú fényimpulzusokat küldtem az adott agyi területre.

A mérések elemzése során akkor számítottam egy sejtet optogenetikailag aktiválhatónak (vagyis 2-es típusú vezikuláris glutamátot termelő - vGluT2 sejtípusnak) hogyha az adott fénystimulusra 5 ms-os látencián belül volt képes aktiválódni. A terminálisok ingerlése esetében ezt a küszöbértéket 8 ms-ra toltam ki.

Az elvezetési koordináták utólagos validálása érdekében az elektródát közvetlenül a méréseket megelőzően acetonban feloldott, fluoreszcens DiI-ba mártottam. Ez megjelölte az elvezetések pontos helyét. Így a minta feldolgozása után mikroszkóposan meghatározhatóvá vált annak pontos pozíciója. Az elektródával rosszul bemért vagy rossz helyre injektált állatok elvezetéseit kizártam az adatelemzésből.

A kísérleti állat lábának sokkolásához használt Supertech készüléket az állatok bal hátsó lábára rögzítettem. Ez sokkoláskor egy 100 ms hosszúságú, 1 mA erősségű áramot adott le. A stimulusokból összesen 10 db követte egymást, 60 s-os *inter stimulus intervallum* (ISI)-kkel.

A kétféle hang stimulus minden kísérletet megelőzően 70-75 dB-es erősségre lett állítva. Ezek egységesen 1s hosszúságúak voltak. A hangforrást az állattal szemben, nagyjából 30 cm-re helyeztem el. A "tone" esetében egy 7,5 kHz-es tiszta hangot adtam le, a "noise" esetében egy Gauss-i eloszlást mutató fehér zaj került lejátszásra. Mindkettőből egyenként 20-20 darabot játszottam le, 30 s-os ISI-kkel.

A vizuális stimulust képező fehér fényű LED az állatok bal előlő látóterébe lett helyezve és 1s hosszan villant fel. Ebből is szintén 20 darabot játszottam le, 30s-os ISI-vel.

A párosított jelek esetében az egyes stimulusok beállításain nem változtattam, azzal a kivétellel, hogy a sokkal párosított stimulusokból egyszerre legfeljebb 10 darabot játszottam le 60 s hosszúságú ISI-vel, úgy, hogy a sokk a másik stimulusnak vagy stimulusoknak az utolsó 100 ms-ában jelenjen meg.

Az egyes stimulus blokkok között 5 perces üres intervallumokat tartottam.

Az optogenetikai ingerlések, az elektromos stimulus és a kétféle hang stimulus analóg módon, míg a LED digitálisan volt vezérelve egy Matlab script illetve egy külső A/D kártya (National

Instruments, USB-6353) által. A leadott stimulusokkal parallel módon az adatgyűjtő egység is megkapta azok információit, így latenciális eltérés nélkül tudta a program regisztrálni azokat.

Az extracelluláris elvezetési adatok amplifikálva, majd digitalizálva lettek elmentve.

Perfúzió

Az elektrofiziológiai méréseket követően az állatokon transzkardiális perfúziót hajtottam végre. Fiziológias sóoldattal történő 2 perces átmosás után 200ml 0,1 M-os foszfát puffer (PB) oldatban oldott, 4%-os paraformaldehidet áramoltattam át az állatokon. Nagyjából 20 perc elteltével a fixált agyakat óvatosan kiemeltem, majd egy éjszaka utófixációt követően háromszor 0,1 M PB-vel mostam át azokat.

Metszet előkészítés

A már fixált egéragyakat rezgőkéses vibratómmal 0,1 M PB-ben, 2%-os agar-agar-ba ágyazva 50µm vastag koronális szeletekre metszettem. A metszeteket a befotózásukig Na-azidos foszfát puffer oldatban, 4°C-on tároltam.

Elvezetési adatok elemzése

Az elvezetett extracelluláris soksejt aktivitási adatokat először zajmentesítettem, majd egy Matlab program segítségével kiszűrtem belőle az 500 Hz-et meghaladó spike-okat. Ezt követően egy principál komponens analízisen alapuló, automata klaszterező program (KlustaKwik) ezeket csoportokba rendezte. A csoportokat manuálisan felülvizsgáltam és az egymástól jól elkülöníthető, izolált csoportokat alkotó akciós potenciálokat egy-egy egyedi idegsejthez rendeltem. Ha ezek a sejtek egymással szimmetrikus cross-correlogrammot alkottak vagy teljes mértékben átfedett az akciós potenciáljuk alakja, akkor azokat kihagytam az elemzéséből, ezzel elkerülve egyazon sejt többszöri elemzését. Az így meghatározott és elkülönített sejtek alkotják a dolgozatomban bemutatott idegsejteket és képezik a további statisztikai elemzések alapját.

A statisztikai elemzéseket a Statistica 13 (Statsoft) programmal, illetve Matlab programok segítségével végeztem.

A dolgozatomban megjelenő ábrákat szintén Matlab, Adobe Illustrator vagy Microsoft Excel segítségével készítettem.

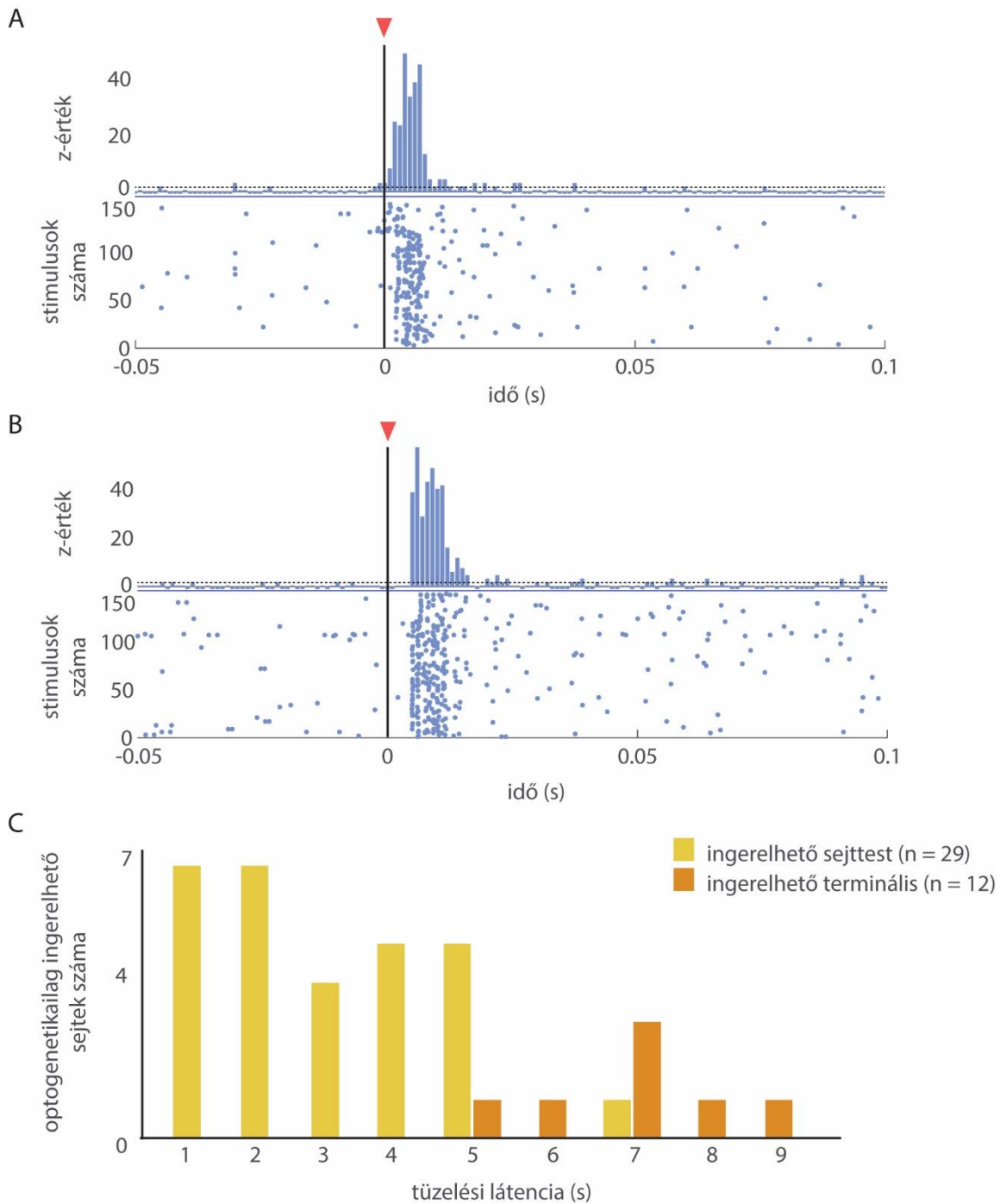
Eredmények

A feltett kérdések megválaszolásának érdekében vGluT2-Cre transzgén állatok ($n = 6$) *superior colliculus*-ába fluoreszcens channelrhodopsin 2-t kifejező cre-dependens adeno asszociált vírust injektáltunk. A vírus expressziós idejének letelével *in vivo* elektrofiziológiai elvezetések végeztem az állatokból különböző, a **2. ábrán** bemutatott kísérleti felállásokban.

Az SC mély rétegi glutamáterg sejtjeinek sajátosságai

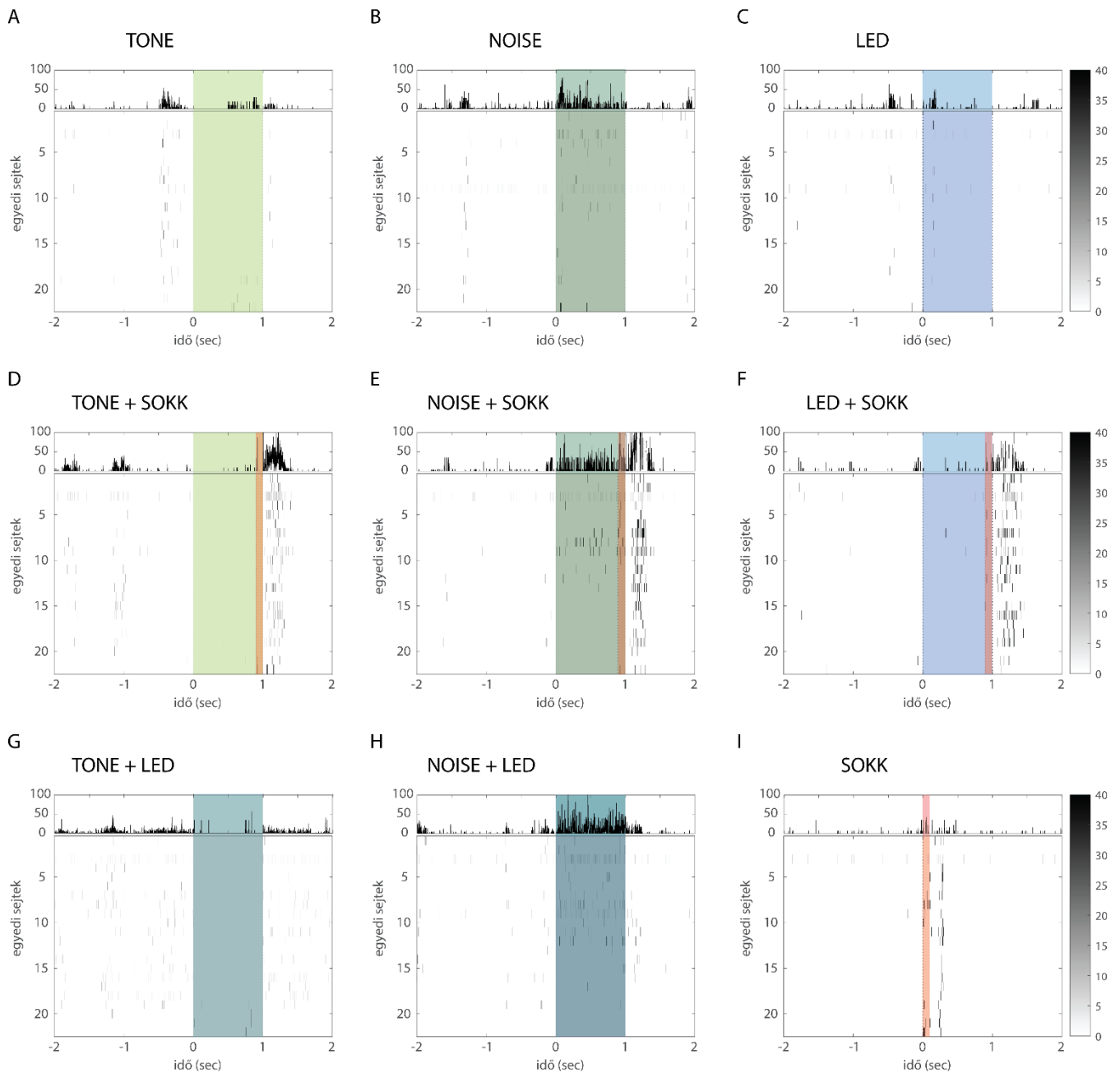
Az első kísérleti felállásban különböző ingerek leadását megelőzően, illetve a kísérletek legvégén is az SC-ben található sejttesteket ortodróm, illetve a PIL-be futó terminálisokat antidróm módon ingereltem az SC területére illetve a PIL-be helyezett optikai szálak segítségével. Ez által az adatok kielemezésekor képes voltam elkülöníteni a 2-es típusú vezikuláris glutamát transzportert kifejező sejteket (vGluT2). Ezekben a vGluT2 pozitív idegsejtekben, ahogy a **3. A és B ábra** is mutatja a rövid fényimpulzusok akciós potenciálok váltottak ki igen kis, 1-4ms-os látenciával. Az axonterminálisok (**3. ábra, B**) illetve a sejttestek (**3. ábra, A**) ingerlései között átlagosan 4,5 ms látenciakülönbség volt megfigyelhető (**3. ábra, C**). Az elvezetett sejtek ($n=33$) 78 %-a ($n = 26$) tartozott az optogenetikailag ingerelhető, glutamáterg sejttypusok közé, míg 21 %-ukat ($n = 7$) a nem ingerelhető, feltehetően GABAerg, gátló sejttypusba soroltam. Egyetlen sejt esetében fordult elő hogy a szomatikus ingerlésre csak kevésbé (nem szignifikánsan), azonban a PIL-be futó axonterminálisok antidróm ingerlésére már szignifikánsan megnövekedett tüzelési aktivitást mutatott. Ezt a sejtet kizártam a további elemzésekből.

Ezen felül az SC glutamáterg sejtjeinek optogenetikai ingerlése során a sejtek nagy százalékánál megfigyelhető volt egy nagyobb látenciájú, és kisebb z -értékkel bíró sejtválasz jelenléte is. Ezek feltételezhetően a colliculus megannyi visszacsatolásából érkező aktivációk a glutamáterg sejtek ingerlésre válaszolva.



3. ábra – optogenetikai ingerlés; ugyan azon SC sejt az **A** ábrán szomatikusan, a **B** ábrán pedig az axonterminálisától, rövid fényimpulzusokkal kiváltott aktivációja látható, a felső sorban a z-értékük szerepel az idő függvényében, míg az alsó sorban az adott stimulusra megjelenő tüzelési mintázatuk látható. A piros nyílhegy az 5 ms hosszúságú fényimpulzus elejét jelzi. A **C** ábrán az optogenetikailag ingerelhető összes sejt tüzelési latenciája látható, sárgával mutatva az SC-ben található, sejttestük által ingerelhető glutamaterg idegsejteket, míg a narancssárga szín a PIL-be futó, axonterminálisuk által ingerelhető glutamaterg SC sejteket jelöli.

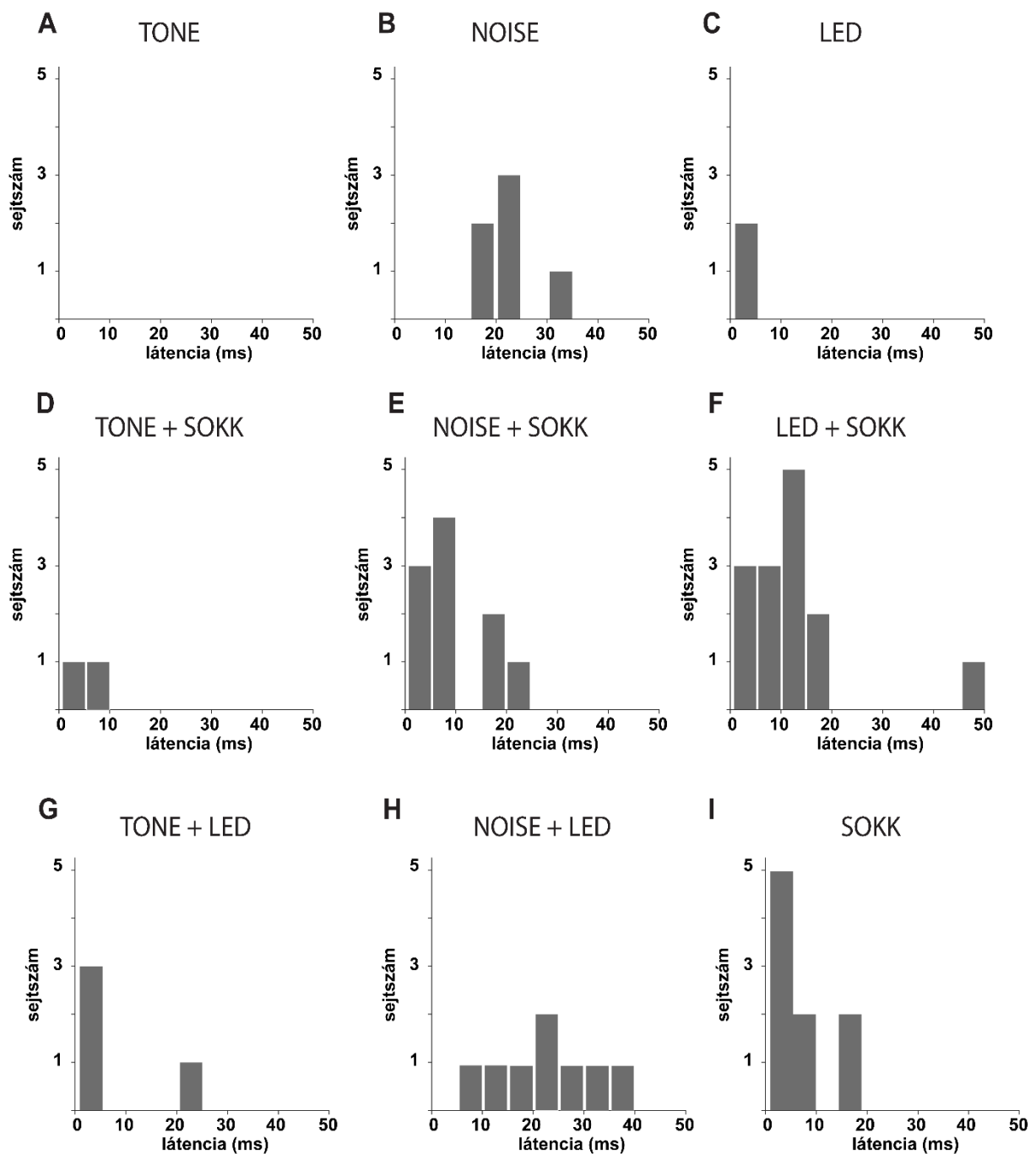
Az optogenetikai ingerlést követően különféle modalitásokkal – kétféle hangstimulussal, egy vizuális illetve egy fájdalomi ingerrel – stimuláltam az állatokat, illetve ezen modalitások különböző kombinációjával, miközben egy szilikon elektróda segítségével extracelluláris elvezetést végeztem azok mély rétegi SC sejtjeiből (**2. ábra, A**). A kísérletek során leadott stimulusokra a sejtek különféle mintázatban (**4. ábra, A-I**) és különféle látenciákkal (**5. ábra, A-I**) aktiválódtak. A legtöbb beazonosított idegsejt egy-egy modalitásra nem, vagy csak kevésbé változtatott tüzelésén (**4. ábra, A-D**), míg a több modalitás szimultán jelenlétére populációs szinten megnövelték tüzelésüket (**4. ábra, E-I**). Ez alól egyetlen kivételt képezett a „tone”, egy tiszta 7,5kHz-es frekvenciájú hangstimulus. Ennek lejátszásakor az elvezetett sejtek tüzelési frekvenciájában jelentős gátlás volt megfigyelhető, amely kitartott egészen az 1s-os hangstimulus végéig (**4. ábra, A**), továbbá az ezzel a stimulussal párosított egyéb modalitások során is a tüzelési frekvencia csökkenése következett be a „tone” hosszának idejére (**4. ábra, G, I**). Hogyha azonban a tiszta hang helyett a gauss-i eloszlást mutató fehér zajt, „noise”-t játszottam le az állatoknak, akkor sejtjeik alap tüzelési frekvenciája már a stimulus alatt megnövekedett (**4. ábra, B**) és az ezzel a stimulussal párosított ingerek során is növekedés volt tapasztalható az elvezetett idegsejtek tüzelési aktivitásában (**4. ábra, E, H**).



4. ábra – tüzelési mintázatok; A leadott stimulusokra ($n = 9$) bekövetkező sejtaktivitás változásokat tüntettem fel (osztályméret = 1 ms). A felső sor az elvezetett sejtpopuláció összesített z-értékét mutatja alatta pedig a populációba tartozó egyedi sejtek tüzelési aktivitása látható. A sejtek sorrendje az egyes ábrák között megegyezik. Az x tengely a stimulus megjelenése (0 s) előtti és utáni 2 s-ot mutatja. A z-értékek skálája a jobb oldalon található. A színezett háttér pedig az egyes stimulusok kezdetét és végét jelöli.

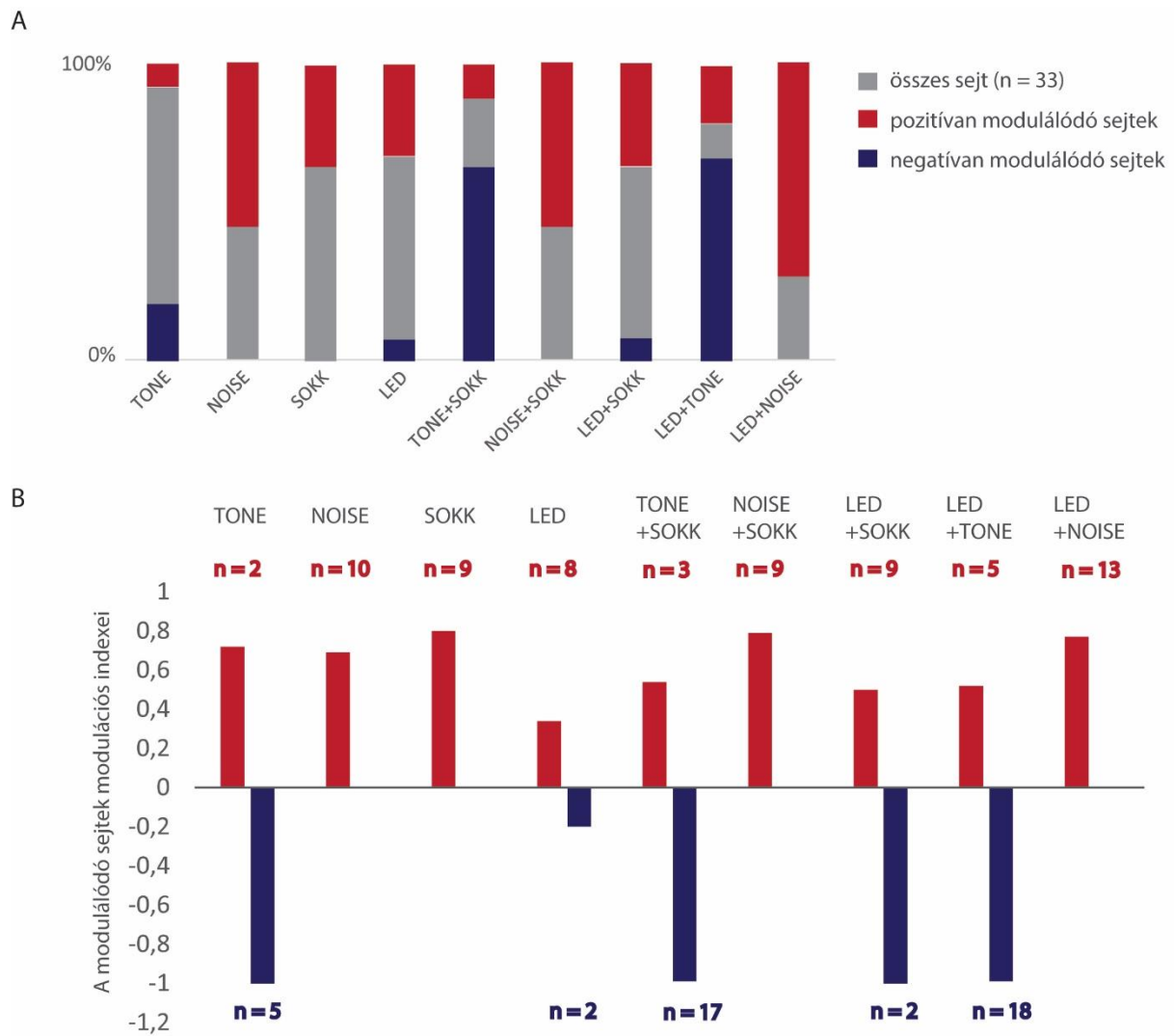
Az SC agytörzsi felszálló és agykérgi eredetű leszálló pályák állomását is képezi, így tisztán nem jelenthető ki hogy egy gyors és agytörzsi eredetű információról van-e szó a látenciák megvizsgálása nélkül. Az egyes stimulusokra adott sejtválaszok látenciái (5. ábra) nagyban eltértek egymástól. A leggyorsabb, ahogy az 5. ábra I részében is látható a sokk stimulusra

adott válasz volt (átlagosan 8 ms) és az ezzel a stimulussal párosított ingerek latenciája is lecsökkent. Ezek az ingerek átlagosan 18 ms-os latenciával érték el a talamusz sejtjeit a mérések során. A szakirodalomban általánosan elfogadott az az elképzelés mely szerint az 50 ms alatti latenciájú sejtválaszok agytörzsi, míg az 50 ms feletti agykérgi eredettel rendelkeznek. Ezek alapján pedig kijelenthetjük, hogy az itt átkapcsoló gyors, lábsokk ingerre vagy az azzal párosított modalitásokra adott információ agytörzsi eredettel rendelkezik és ez halad tovább a talamuszon keresztül a magasabb információ-feldolgozó szintek felé.



5. ábra – tüzelési látenciák; Az ábrán az adott stimulusok leadását követő első szignifikáns sejtaktivitások időpontját tüntettem fel (osztályméret = 5 ms). Az y tengely a sejtszámot, az x tengely pedig a látenciát jelöli ms-ban.

A sejtek tüzelési frekvenciájában bekövetkező változásokat az egyes beazonosított sejtekhez rendelt modulációs index-el jellemeztem. Ez alapján pozitívan és negatívan modulálódó sejteket különböztettem meg egymástól. Átlagosan elmondható hogy a sejtek nagyobb része a stimulusok alatt pozitívan, míg kisebb százalékuk negatívan modulálódik (**6. ábra, A**). A modalitások közül a leginkább a párosított led és noise inger váltott ki pozitív modulációt (**6. ábra, A, B**), míg a legerősebb negatív modulációs indexértéket a led-el vagy lábsokkal párosított tone hangstimulus váltotta ki (**6. ábra A, B**). A kis sejtek kis százaléku gátlódásának ellenére a negatív moduláció mértéke volt a legnagyobb, a modulációs indexek átlaga közel -1-es modulációs értéket adott (**6. ábra, B**). Vagyis hiába általánosabban kevesebb a stimulusra kiváltott gátlódás, mégis az sokkal erősebben képes befolyásolni a sejtek tüzelési mintázatát.



6. ábra – a mért sejtek modulációjának mértéke; Az ábra **A** részén százalékos arányban olvasható le az összes elvezetett sejt közül szignifikánsak modulálódóak százalékos aránya. A pozitívan modulálódó sejtek piros, míg a negatív modulációs indexűek kék színnel jelöltek. Az ábra **B** részén az egyes modulálódó sejtek száma és modulációs indexük mértéke olvasható, pozitív, illetve negatív modulációt mutató sejtekre osztva.

Vagyis elmondható, hogy a mély rétegi glutamáterg SC sejtek valóban képesek lehetnek többféle modalitásra (beleértve a félelmi tanulás során megjelenő hang és fájdalom ingereket is) aktiválódni igen kis látenciával.

A PIL sejtekre érkező információ

Ezt követően a PIL sejtjeire érkező információ tartalmát vizsgáltam a **2. B ábrán** bemutatott kísérleti felállásban. A fluoreszcens channelrhodopsin 2-t kifejező vírust szintén a vGluT2-Cre állatok *superior colliculus*-ába injektáltuk, azonban az extracelluláris soksejt aktivitás elvezetéseket az SC helyett a PIL-ből végeztem, az optogenetikai ingerléssel pedig az erre a területre axonterminálisokat küldő glutamáterg colliculáris sejttypusokat azonosítottam. Az így elvezetett és beazonosított egyedei sejteket szintén a korábbi kísérletnél használt stimulusokkal és azok különféle kombinációjával ingereltem. A PIL sejtek válaszkészsége meglepő hasonlóságot mutatott ezekre az ingerekre. Jellemző volt rájuk, hogy az egyenként előforduló modalitásokra nem vagy csak kevésbé változtattak alapvető tüzelési frekvenciájukon (**Függelék - 1. ábra**), azonban a különböző modalitások szimultán jelenlétét megnövekedett tüzelési aktivitás kísérte. Ez jól megfigyelhető a **Függelék 1. ábra** első oszlopában szereplő példasejt tüzelésén is (**Függelék - 1. ábra A-D**). Az összes ingerelhető sejt látenciája (**Függelék - 1. ábra, A-D második oszlop**) szintén a sokk stimulus esetében volt a legrövidebb, de az ezzel párosított ingerek átlagos látenciája sem haladta meg az 50ms-ot.

Mindezek alapján feltételezhető hogy a PIL sejtjeit beidegző glutamáterg SC sejtek képesek a rájuk érkező uni- és multimodális információkat is hasonló hatékonysággal továbbítani a talamusz területére.

Diszkusszió

Összességében elmondható hogy az SC mély rétegének glutamáterg sejtjei többféle modalitásra is képesek változtatni tüzelési mintázatukon, vagyis ezek a sejtek valóban multimodálisak, továbbá az itt átkapcsoló ingerek nem csak reléződnék, hanem befolyásolhatják is a sejtek tüzelési mintázatát. Érdekes megfigyelés, hogy a kiváltott moduláció nem csak serkenteni, hanem gátolni is képes a sejtek tüzelését az adott stimulus típusától függően.

A tiszta hangra való gátlódás adaptív indokokkal is magyarázható, hiszen nagyon kevés olyan hang fordul elő a természetben, amely 100%-os tisztaságú lenne, ehelyett az állatok a különböző frekvenciákkal vannak körbevéve. Ez az SC sejtek változatos frekvenciájú „white noise”-ra kiváltott erős serkentődésére is magyarázatként szolgálhat. Ugyanakkor a tiszta 7,5 kHz-es hangot széles körben használják a különböző félelmi kondicionálási feladatok során, mely a későbbiekre nézve elgondolkodtató lehet. Erre megoldásként szolgálhat egy 2020-ban megjelent tanulmány, amelyben az egereket egy kevert, először tiszta hangból álló, majd noise-ba átsapó hangstimulussal kondicionáltak félelmi viselkedésre. Az állatok az elsőként jövő, tiszta „tone” hangra ledermedtek, majd a „white noise” megjelenésekor menekülésbe kezdtek (Hersman et al., 2020). A szerzők szerint itt nem a hang stimulusok sorrendjének memorizálásától függött a menekülés kiváltódása, hanem hogy a „white noise” sokkal feltűnőbb és erősebb stimulusként szolgál az egerek számára ezzel elősegítve annak sikeres fájdalommal történő társítását.

Az általam alkalmazott ingerek közül a leggyorsabb sejtaktivációt egyértelműen a sokk stimulus által lehetett elérni mind az SC glutamáterg sejtjeiben, mind pedig a talamikus sejtjeiben. Mindez megmagyarázhatja az SC sejtjeinek aktiválódását az egyes félelmi tanulási folyamatokban, hiszen ezeket legtöbbször az állatokon alkalmazott lábsokkal érik el.

A talamikus elevezetések pedig megerősítik, hogy az SC-PIL pálya képes lehet a ráérkező gyors, fájdalmi ingerek információját az SC glutamáterg sejtjeinek szintjén más, térben és időben egybeeső modalitásokkal integrálni és a talamusz sejtjeire továbbítani igen kis látenciával, elősegítve ezzel a korai jelfeldolgozást és a gyors viselkedésbeli válaszreakció kiváltását.

Irodalomjegyzék

- Alex Meredith, M., & Stein, B. E. (1986). Spatial factors determine the activity of multisensory neurons in cat superior colliculus. *Brain Research*, 365(2), 350–354. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(86\)91648-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(86)91648-3)
- Barsy, B., Kocsis, K., Magyar, A., Babiczky, Á., Szabó, M., Veres, J. M., Hillier, D., Ulbert, I., Yizhar, O., & Mátyás, F. (2020). Associative and plastic thalamic signaling to the lateral amygdala controls fear behavior. *Nature Neuroscience*, 23(5), 625–637. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-0620-z>
- Cai, X., Li, L., Liu, W., Du, N., Zhao, Y., Han, Y., Liu, C., Yin, Y., Fu, X., Sheng, D., Yin, L., Wang, L., Wei, P., & Sheng, X. (2022). A dual-channel optogenetic stimulator selectively modulates distinct defensive behaviors. *IScience*, 25(1), 103681. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103681>
- Cang, J., Savier, E., Barchini, J., & Liu, X. (2018). Visual function, organization, and development of the mouse superior colliculus. *Annual Review of Vision Science*, 4(May), 239–262. <https://doi.org/10.1146/annurev-vision-091517-034142>
- Choi, I., Lee, J. Y., & Lee, S. H. (2018). Bottom-up and top-down modulation of multisensory integration. *Current Opinion in Neurobiology*, 52, 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.05.002>
- Crapse, T. B., Lau, H., & Basso, M. A. (2018). A Role for the Superior Colliculus in Decision Criteria. *Neuron*, 97(1), 181–194.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.12.006>
- Ding, S. L., Royall, J. J., Sunkin, S. M., Ng, L., Facer, B. A. C., Lesnar, P., Guillozet-Bongaarts, A., McMurray, B., Szafer, A., Dolbeare, T. A., Stevens, A., Tirrell, L., Benner, T., Caldejon, S., Dalley, R. A., Dee, N., Lau, C., Nyhus, J., Reding, M., ... Lein, E. S. (2016). Comprehensive cellular-resolution atlas of the adult human brain. *Journal of Comparative Neurology*, 524(16), 3127–3481. <https://doi.org/10.1002/cne.24080>
- Gale, S. D., & Murphy, G. J. (2014). Distinct representation and distribution of visual information by specific cell types in mouse superficial superior colliculus. *Journal of Neuroscience*, 34(40), 13458–13471. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2768-14.2014>
- Gandhi, N. J., & Katnani, H. A. (2011). Motor functions of the superior colliculus. *Annual Review of Neuroscience*, 34, 205–231. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113728>
- Hersman, S., Allen, D., Hashimoto, M., Brito, S., & Anthony, T. E. (2020). Stimulus salience determines defensive behaviors elicited by aversively conditioned serial compound auditory stimuli. *ELife*, 9, 1–26. <https://doi.org/10.7554/eLife.53803>
- Hoy, J. L., Bishop, H. I., & Niell, C. M. (2019). Defined Cell Types in Superior Colliculus Make Distinct Contributions to Prey Capture Behavior in the Mouse. *Current Biology*, 29(23), 4130–4138.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.10.017>
- Isa, K., Tokuoka, K., Ikeda, S., Karimi, S., Kobayashi, K., Sooksawate, T., & Isa, T. (2022). Amygdala Underlies the Environment Dependency of Defense Responses Induced via Superior Colliculus. *Frontiers in Neural Circuits*, 15(January), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fncir.2021.768647>
- Kim, T., Shen, N., Hsiang, J. C., Johnson, K. P., & Kerschensteiner, D. (2020). Dendritic and

- parallel processing of visual threats in the retina control defensive responses. *Science Advances*, 6(47), 1–11. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abc9920>
- May, P. J. (2006). The mammalian superior colliculus: Laminar structure and connections. *Progress in Brain Research*, 151, 321–378. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(05\)51011-2](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(05)51011-2)
- Paxinos, G., & Franklin, K. B. J. (2001). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* (Issue 1. k.). Academic Press. <https://books.google.hu/books?id=tZdjQgAACAAJ>
- Stein, B. E. (2012). *The new handbook of multisensory processing*. Mit Press.
- Stein, B. E., Stanford, T. R., & Rowland, B. A. (2014). Development of multisensory integration from the perspective of the individual neuron. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(8), 520–535. <https://doi.org/10.1038/nrn3742>
- Suzuki, D. G., Pérez-Fernández, J., Wibble, T., Kardamakis, A. A., & Grillner, S. (2019). The role of the optic tectum for visually evoked orienting and evasive movements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(30), 15272–15281. <https://doi.org/10.1073/pnas.1907962116>
- Talsma, D., Senkowski, D., Soto-Faraco, S., & Woldorff, M. G. (2010). The multifaceted interplay between attention and multisensory integration. *Trends in Cognitive Sciences*, 14(9), 400–410. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2010.06.008>

Köszönetnyilvánítás

Köszönet illeti mindenekelőtt témavezetőmet, Dr. Mátyás Ferencet, a dolgozat elkészítésében nyújtott rengeteg segítségéért, szakmai iránymutatásáért és tanácsaiért.

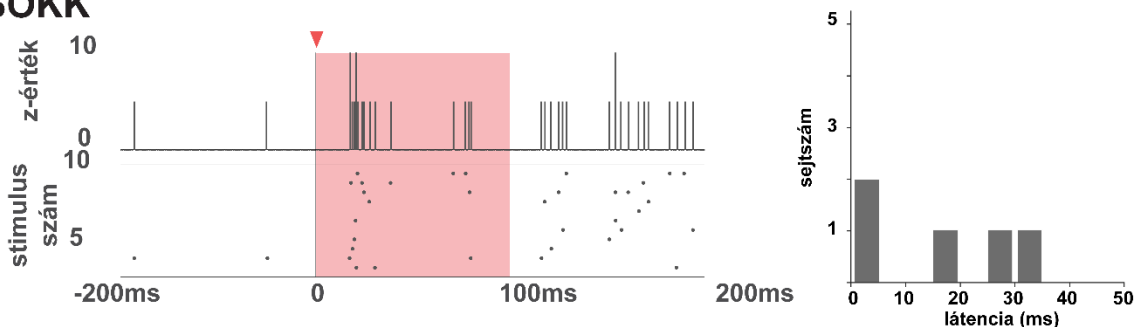
Kiemelt köszönettel tartozom az elektrofiziológiai osztagnak, Horváth-Magyar Alettának, Dr. Borbély Sándornak és Berki Péternek, akik a dolgozatom írása során minden felmerülő kérdésemre és problémámra sajátjukként tekintettek és önzetlen segítséget nyújtottak azok megoldásában.

Továbbá köszönet illeti a Hálózat és Viselkedés Neurobiológiai Kutatócsoport összes tagját a szakmai támogatásukért és segítségnyújtásukért.

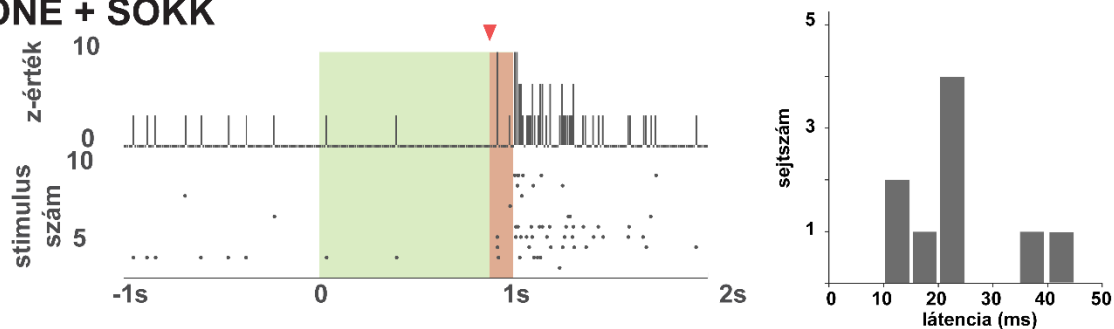
A dolgozat a Kulturális és Innovációs Minisztérium ÚNKP-22-2 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatásával készült.

Függelék

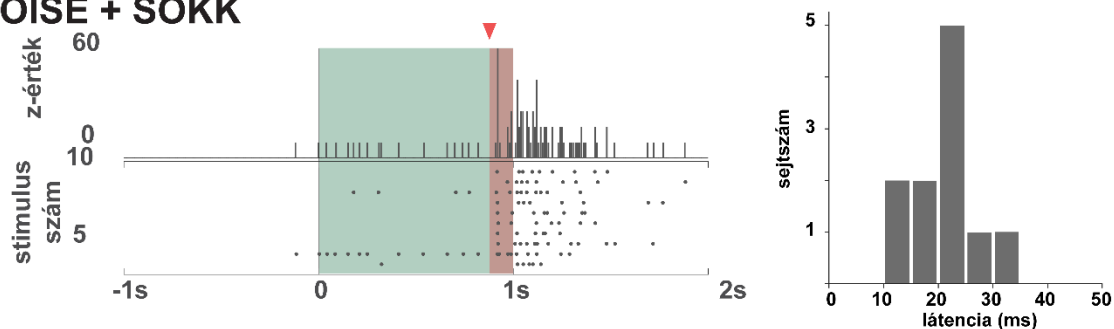
A SOKK



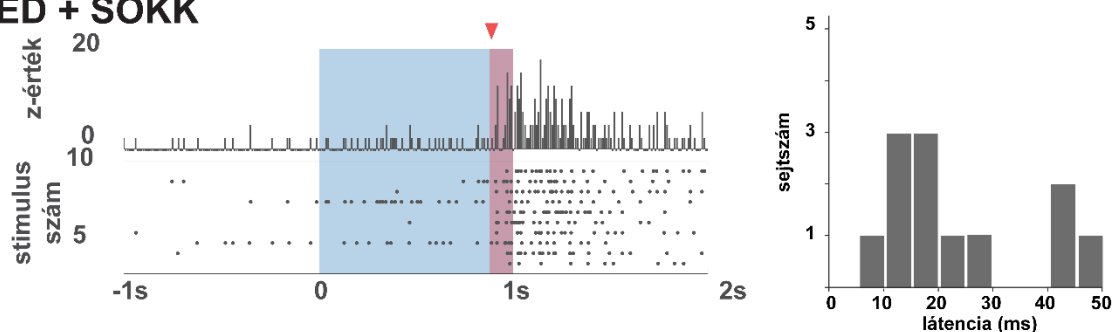
B TONE + SOKK



C NOISE + SOKK



D LED + SOKK



1. ábra – a thalamikus sejtek tüzelési mintázata; Az ábrán egy thalamikus példasejt aktivációja látható soronként különböző stimulusokra válaszul. A második oszlopban az adott stimulushoz tartozó, de már populációs szintű latenciák olvashatóak. Az x tengely az időt jelzi a stimulus megjelenése (0 s) előtti és utáni időszakban. Az y skála alsó sora a sejt tüzelési mintázatát, míg a felső sora azok kumulált z-értékét mutatja. A színezett háttér az egyes stimulusok kezdetét és végét jelöli.