

A mediális prefrontális kéreg projekciós neuronjainak szerepe patkányok szociális viselkedésében

36. OTDK
Biológia Szekció

Darai Luca

Biológus MSc, Idegtudomány és Humánbiológia specializáció, 1. év

Témavezetők:

Dr. Keller Dávid

PhD hallgató

Neuromorfológiai Laboratórium, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet,
Semmelweis Egyetem

Dr. Dobolyi Árpád, PhD, az MTA Doktora

Egyetemi tanár

Élettani és Neurobiológiai Tanszék,
Eötvös Loránd Tudományegyetem



ELTE
EÖTVÖS LORÁND
TUDOMÁNYEGYETEM

TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR, BIOLÓGIAI INTÉZET

Budapest, 2023

Tartalomjegyzék

ÖSSZEFOGLALÓ	3
RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK	4
1 BEVEZETÉS.....	5
1.1 A MEDIÁLIS PREFRONTÁLIS KÉREG (mPFC) RÁGCSÁLÓKBAN.....	5
1.2 AZ MPFC PROJEKCIÓS NEURONJAI ÉS CÉLTERÜLETEIK	6
1.3 A SZOCIÁLIS VISELKEDÉS ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREI RÁGCSÁLÓKBAN.....	7
1.3.1 VISELKEDÉSTESZTEK.....	7
1.4 KEMOGENETIKA	8
2 CÉLKITŰZÉSEK.....	10
3 ANYAG- ÉS MÓDSZERTAN	11
3.1 ÁLLATOK	11
3.2 MŰTÉTEK	11
3.2.1 DUPLA VIRÁLIS INJEKCIÓK	11
3.2.2 CaMKII PROMÓTERT TARTALMAZÓ VÍRUS INJEKCIÓJA	12
3.3 VISELKEDÉSI TESZTEK	12
3.3.1 KLOZAPIN-N-OXID (CNO) INJEKCIÓ	12
3.3.2 HÁROM KAMRÁS ISMERTSÉGI TESZT.....	12
3.3.3 DIREKT SZOCIÁLIS INTERAKCIÓ VIZSGÁLATA	13
3.3.4 EMELT KERESZTPALLÓ TESZT	13
3.4 HISZTOLÓGIA	14
3.4.1 PERFÚZIÓ	14
3.4.2 METSZETKÉSZÍTÉS.....	14
3.4.3 IMMUNFESTÉS	14
3.4.4 DUPLA FLUORESZCENS IMMUNJELÖLÉS.....	15
3.4.5 NEURONÁLIS AKTIVITÁS MÉRÉSE c-Fos TECHNIKÁVAL	15
4 EREDMÉNYEK.....	16
5 DISZKUSSZIÓ	24
SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS.....	27
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	28
IRODALOMJEGYZÉK	29

ÖSSZEFOGLALÓ

A mediális prefrontális kéreg (mPFC) projekciós neuronjai többféle szubkortikális területre vetülnek. Kutatásunkban kétféle projekciós neuront vizsgáltunk projekciós mintázatuk és szociális viselkedésben játszott szerepük szempontjából.

Virális géntranszferrel designer receptorokat fejeztünk ki a mPFC mediális preoptikus területre (MPOA) vetülő neuronjaiban, valamint a prelimbikus és infralimbikus mPFC kalcium/kalmodulin-függő fehérje kináz II (CaMKII) tartalmú neuronjaiban. A preoptikus régióba vetülő infralimbikus neuronok más szubkortikális területekre is vetülnek, és serkentésük esetén csökkent a szociabilitás a három kamrás tesztben, de nem változott az állatok direkt interakciója. A CaMKII neuronok erős vetületet adtak a parateniális, mediodorzális és submedius thalamikus magokba, de nem vetültek a hypothalamusba, így a preoptikus területre sem. Az mPFC CaMKII tartalmú sejtjeinek serkentése során csökkent a fajtárssal töltött idő a három kamrás tesztben és szociális interakciók több elemének időtartama a szociális együttlét során.

Az mPFC általunk vizsgált projekciós neuronjainak kemogenetikai manipulációja hatással volt a szociális viselkedésre, ami az adott neuronok szerepére utal a szociális viselkedések szabályozásában. A két eltérő helyre vetülő mPFC neurontípus manipulációjának hatásai különböztek, ami alapján a szociális viselkedéseket eltérő módon szabályozzák, illetve azok eltérő aspektusainak szabályozásában vesznek részt.

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

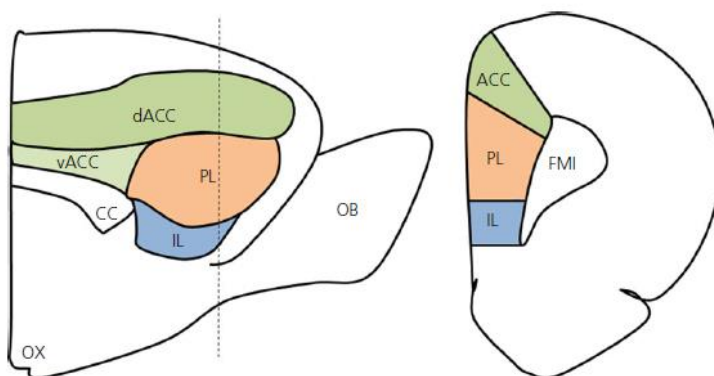
ACC	(Anterior cingular cortex) – Anterior cinguláris kéreg
Acc	(Nucleus accumbens) – Accumbens mag
BLA	(Basolateral amygdala) – Bazolaterális amygdala
CaMKII	(Calmodulin dependent protein kinase II) - Kalmodulin-függő protein-kináz II
CNO	(Clozapine-n-oxid) – Klozapin-n-oxid
CT	(Corthicothalamic cell) – Kortiko-thalamikus sejt
DAB	(2,2'-Diamino-benzidine) – 2,2'-Diamino-benzidin
DREADD	(Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs) – Designer receptor
EPM	(Elevated plus maze) – Emelt keresztpalló teszt
IL	(Infralimbic cortex) – Infralimbikus kéreg
IT	(Infratencephalic cell) – Intratencephalicus sejt
LS	(Lateral septum) – Laterális szeptum
MD	(Mediodorsal thalamic nucleus) – Mediodorzális thalamikus mag
MeA	(Medial amygdaloid nucleus) – Mediális amygdala mag
mPFC	(Medial prefrontal cortex) – Mediális prefrontális kéreg
MPOA	(Medial preoptic area of the hypothalamus) – Mediális preoptikus terület
PL	(Prelimbic cortex) – Prelimbikus kéreg
PN	(Pyramidal neuron) - Piramissejt
PT	(Paratenial nucleus) – Parateniális mag
PVN	(Paraventricular hypothalamic nucleus) – Paraventriculáris hypothalamikus mag
Sub	(Submedius thalamic nucleus) – Thalamus submedius magja
vHPC	(Ventral hippocampus) - Ventrális hippocampus
VM	(Ventromedial thalamic nucleus) – Ventromediális thalamikus mag
VMH	(Ventromedial hypothalamic nucleus) – Ventromediális hypothalamikus mag
VP	(Ventral pallidum) – Ventrális pallidum

1 BEVEZETÉS

1.1 A MEDIÁLIS PREFRONTÁLIS KÉREG (mPFC) RÁGCSÁLÓKBAN

A prefrontális kéreg (PFC) a magasabb agyi funkciók szerveződésében játszik szerepet, mint például a kogníció, a motiváció vagy az érzelmek kialakítása. A PFC rendellenes működése mentális betegségeknek lehet okozója, többek között a skizofrénia, autizmus spektrum zavar, különböző függőségek vagy depresszió (Arnsten és Rubia, 2012).

A mediális prefrontális kéreg (mPFC) rágcsálókban a következő részekből áll: az anterior cinguláris (ACC), a prelimbikus (PL) és infralimbikus (IL) kéreg, valamint az IL alatt elhelyezkedő dorzális pedunculáris kéreg (1. ábra). A terület sokféle projekciós neuronnal és interneuronnal rendelkezik, emellett különböző agyterületről számos bemenet érkezik ide (Zhang és mtsai, 2016)



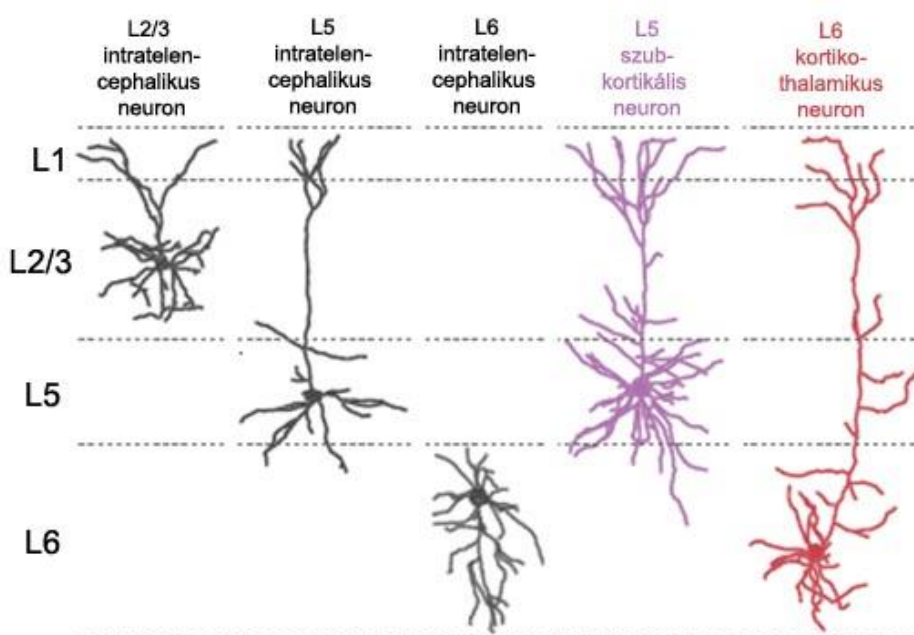
1. ábra: A mediális prefrontális kéreg részeit bemutató rajz. A: szagittális sík, B: coronális sík. Rövidítések jelentése: ACC – anterior cinguláris kéreg, PL – prelimbikus kéreg, IL – infralimbikus kéreg, OB – szaglólagyma, FMI – forceps minor, cc – corpus callosum, dACC – dorzális ACC, vACC – ventrális ACC, ox – chiasma opticum, pontozott vonal a szagittális nézetben – a B panelen látható coronális sík helye. Eredeti ábra forrása: (McKlveen és mtsai, 2015)

Az mPFC, mint az agykéreg többi része, szintén rétegekből áll (Harris és Shepherd, 2015), viszont a legtöbb agykérgi terület lamináris nézete és a rágcsálók mPFC-je között vannak jelentős különbségek is. Az mPFC agranuláris, vagyis nem tartalmaz szemcses sejteket. Szintén hiányzik a kanonikus thalamo-recipiens L4 réteg, a thalamikus

bemenet a többi rétegbe érkezik. Az összes interneuron típus megtalálható az mPFC-ben (Harris és Shepherd, 2015), ugyanakkor az interneuronok altípusai az mPFC-ben más agyterületektől eltérő mennyiségben fordulnak elő, például kevesebb parvalbumin-pozitív és több szomatosztatin-pozitív sejt található meg (Kim és mtsai, 2017). Az mPFC több agyterületről származó bemenetet dolgoz fel, például más kérgi területek, a mediodorzális (MD) és a ventromediális (VM) thalamikus magok (Collins és mtsai, 2018), a bazolaterális amygdala (Burgos-Robles és mtsai, 2017), a ventrális hippocampus (Spellman és mtsai, 2015) és a claustrum bemeneteit. Ezeknek az afferenseknek fontos funkcionális szerepe van a kognitív és érzelmi viselkedés kialakításában (Honjoh és mtsai, 2018; Liu és Carter, 2018).

1.2 AZ MPFC PROJEKCIÓS NEURONJAI ÉS CÉLTERÜLETEIK

Az mPFC projekciós neuronjai célterületeik alapján feloszthatók úgy, mint intratelencephalicus (IT), piramidális (PN) és kortiko-thalamikus (CT) neuronok (Harris és Shepherd, 2015) (2. ábra). Az mPFC-ben az IT sejtek a 2/3, 5. és 6. rétegben találhatók (L2/3, L5 és L6 sejtek). Minden réteg vetül az ellenoldali kortexbe, a bazolaterális amygdalába, a striatumba, és a claustrumba. Az L5 és L6 rétegekben található IT sejtek morfológiája, fiziológiája és projekciós mintázata (mely utóbbi az L2/3 IT sejtekéhez hasonló) lényegesen eltér az ott található PN és CT sejtektől (Anastasiades és mtsai, 2018).



2. ábra: Az mPFC projekciós neuronjainak morfológiája (Anastasiades és Carter, 2021).

Az L5 rétegben fordulnak elő csak a PN sejtek, melyek nagy méretű dendritfával jellemezhetők (Anastasiades és mtsai, 2018). Az mPFC-ben található PN sejtek különböző szubkortikális agyi régiókat céloznak meg, ideértve az ipsilaterális striatumot, a thalamust (driver bemenetek), több hypothalamikus magot, a periaqueductális szürkeállományt, a hidat és számos neuromodulátor központot (Collins és mtsai, 2018)(Gabbott és mtsai, 2005).

CT sejtek kisebb mennyiségben az L5 rétegben is jelen vannak, de többségük elsősorban helyezkedik el az L6 réteg IT sejtjeivel keveredve (Anastasiades és mtsai, 2018). Ezen sejteket az IT sejtektől megkülönbözteti a nem adaptálódó tüzelésük és a sajátos morfológiájuk, például az L6 rétegből csak a CT sejtek apikális dendritjei terjednek ki az L1-be (Collins és mtsai, 2018). Az L5 és L6 rétegek CT projekciós neuronjai több thalamikus magot vesznek célba, így a MD és a VM thalamikus magokat, melyeket modulátoros bemenettel látnak el. A sejtek egy része elágazó projekciókat küld az MD és a VM felé, ami nem jellemző más kortikális területekre (Collins és mtsai, 2018; Wimmer és mtsai, 2015).

1.3 A SZOCIÁLIS VISELKEDÉS ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREI RÁGCSÁLÓKBAN

A szociális viselkedés alapja, hogy az egyedek csoportot alkossanak, amik lehetnek átmenetiek és állandók. Az állatfajok többségének egyedei életük során, legalább a szaporodási időszakban felkeresik valamely fajtársukat utódnemzés céljából, ami már társas, azaz szociális tevékenységnek tekinthető (Csányi, 2002). A rágcsálók szociális viselkedése ennél összetettebb, és bár az emberét nem éri el, mégis, a szociális viselkedés számos alapmechanizmusa általuk tanulmányozható.

1.3.1 VISELKEDÉSTESZTEK

A viselkedésteszteket két esetben alkalmazzuk, vagy az adott viselkedés megfigyelésére, vagy különböző gyógyszerek hatásának tesztelésére. Ha az adott viselkedést szeretnénk tesztelni, akkor a teszt megtervezésénél elengedhetetlen, hogy a kísérletek szimulálják a természetben is előforduló feladatokat, mivel, ha az állatot olyan helyzetekben vagy ingerekkel tesztelik, melyek nem hasonlítanak a saját ökológiai és szociális környezetükhöz, akkor nem feltétlen kapunk adaptív választ. A viselkedésteszteket úgy kell összeállítani, hogy ne legyen se túl könnyű, se túl nehéz az állatok számára (Schweinfurth,

2020). A következőkben olyan viselkedésteszteket mutatok be, melyek gyakran előfordulnak a szociális viselkedés vizsgálatakor.

Az általános szociabilitás mérésére a legjobban használható módszer a szociális ismertségi teszt vagy a direkt szociális interakció mérése. A specifikus szociális viselkedésekhez, mint például az agresszió, empátia vagy anyai viselkedés léteznek sokkal specifikusabb tesztek is, de ezekre a példákra ebben a fejezetben nem térek ki. A szociális ismertségi teszthez szükség van egy három kamrából álló szociabilitási készülékre, melyben a kamrák kis ajtókkal vannak összekötve, amiket a teszt idejére kinyithatóak, hogy az állat szabadon közlekedhessen a kamrák között. A szélső kamrákban kis ketrecek találhatók, amelyekbe elhelyezhetők a vizsgált egyed számára ismerős és ismeretlen állatok. A teszt kezdetekor az állatot a középső kamrába helyezik el és 10 percig mérik, hogy mely kamrák, mely részein, mennyi időt töltött el a vizsgált állat. A direkt szociális interakció mérése során két állatot egy open-field arénába helyeznek el, ahol szabadon interakcióba léphetnek egymással egy adott időn keresztül. Ennél a tesztnél nagyon sokféle paramétert lehet vizsgálni, például közvetlen fizikai szociális kontaktus, szociális szimatolás, exploráció, verekedés vagy mászás (Keller és mtsai, 2022). Ezeknek a teszteknek a hátránya, hogy egyszerre csak két állat kerül interakcióba, viszont előfordulnak olyan kísérletek is az új technológiáknak köszönhetően (például mikrochip), melyek során egyszerre több állat szociális viselkedését lehet megfigyelni. Fontos kiemelni, hogy a szociális viselkedés során nemcsak magát a szociális viselkedést kell vizsgálni, hanem meg kell figyelni, hogy az állat milyen mértékben szorong vagy mutat-e depressziós magatartást, mert ezek a tényezők mind befolyásolják a szociális viselkedést.

A szorongás egy emocionális állapot, melyet a valós vagy vélt veszély képzete tud kiváltani. Többféleképpen lehet mérni a szorongást az állatokon, például a leggyakoribb módja az emelt keresztpalló teszt (EPM), amely méri, hogy az explorációs igény vagy a nyílt terektől való félelem nagyobb-e az állatban, szorongó állat a zárt részen tölt több időt (Kraeuter és mtsai, 2019).

1.4 KEMOGENETIKA

Az utóbbi időben a technológiai fejlődésnek köszönhetően megváltoztak a viselkedéssel kapcsolatos idegtudományi kutatások. Napjainkban igen közkedvelt megközelítés erre a kemogenetika, melynek alapját képezik a szintetikusan előállított receptorok és a szelektív ligandumok, melyekkel célzott agyi területeket lehet aktiválni vagy

inaktiválni. Ezt DREADD-ként is szokták nevezni, ami a Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs rövidítése. A DREADD receptorokat be lehet vezetni az idegszövetbe különböző géntranszfer stratégiák segítségével, mely lehetővé teszi az átmeneti és megismételhető beavatkozásokat az agy dinamikájában inert exogén ligandumok alkalmazásával, mint például a clozapin-N-oxid (CNO) (Smith és mtsai, 2016). A DREADD-ek endogén G-fehérjéhez kapcsolt receptor-DNS célzott mutagenéziséből származó szintetikus receptorok. Ezek a receptorok expresszáltathatók az idegsejtekben, de hiányzik az endogén ligandumuk, hogy aktiválódni tudjanak, viszont szisztémásan beadott CNO-val lehet őket aktiválni. (Armbruster és mtsai, 2007).

A DREADD intrakraniális bejuttatásához agyműtétre van szükség. Az injektlás során nem önmagában kerül be a DREADD az agyba, az injekció tartalmazza magát a DREADD transzgént, a promótert, egy fluoreszcens riportert és magát a DREADD transzgént hordozó víruskonstrukciót. Ezután amint a DREADD expressziója megvalósul az agyban, a megfertőzött neuronok reverzibilis gátlása vagy aktivációja röviddel a ligandum intraperitoneális beadása után bekövetkezik. Ennek köszönhetően a targetált idegi rendszerek könnyen modulálhatók egy injekció beadásával. Emellett az állat szabadon mozoghat a beadás után, így nem okoz nehézséget a feladatkörnyezet összerakása, mint az optogenetika esetén, ahol a feladatkörnyezetet módosítani kellene, hogy a csatlakozóelemeket el lehessen helyezni. További előny, hogy a DREADD könnyen kombinálható más idegtudományi módszerekkel, például intrakraniális kanülálással vagy elektrofiziológiai felvételekkel (Robinson és mtsai, 2014). A DREADD módszer előnye, hogy egy agyterületet többször is lehet manipulálni, azaz ezek a kísérletek jól ismételhetők (Edeline és mtsai, 2002).

2 CÉLKITŰZÉSEK

Az mPFC-nek szerepe van a szociális viselkedés szabályozásában, ugyanakkor keveset tudunk az egyes sejttípusok szerepéről. Kutatásaim során célom annak a mediális prefrontális neuronális hálózatnak a felderítése, amely meghatározott szociális viselkedések szabályozását végzi. Kutatócsoportunk korábbi eredményei szerint a preoptikus területre érkező felszálló bemenetek növelik a szociális interakciók mértékét (Keller és mtsai, 2022), ezért először az mPFC-ből a preoptikus területre vetülő neuronokat vizsgáltuk. Jelen dolgozatban ezen projekciós neuronokat az mPFC egy másik különböző projekciós neurontípusával, a kortikothalamikus neuronokkal hasonlítottam össze a szociális viselkedések kialakításában játszott szerepe szempontjából. Specifikus célkitűzéseim a következők voltak:

1. Leírtam az mPFC preoptikus területre vetülő neuronjainak, valamint a prelimbikus és infralimbikus kéreg CaMKII tartalmú projekciós neuronjainak a projekciós mintázatát.
2. Meghatároztam, hogy a kétféle mPFC projekciós neurontípus kemogenetikai serkentése hogyan változtatja az állatok szociabilitását, és szociális viselkedését.

3 ANYAG- ÉS MÓDSZERTAN

3.1 ÁLLATOK

A kísérletek során nőstény Wistar patkányokkal dolgoztunk. A Semmelweis Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága és az Eötvös Loránd Tudományegyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága által jóváhagyott kísérleteket végeztünk el a kutatás során (PE/EA/926-7/2021 és PE/EA/568-7/2020). Így a patkányokon történt eljárásokat olyan kísérleti protokollok szerint végeztük, amelyek megfelelnek a Földművelésügyi Minisztérium Állathigiéniai és Élelmiszerellenőrzési Főosztályának (40/2013) irányelveinek, ami összhangban van az EU 2010/63/EU állatkísérletekre vonatkozó törvényével. Összesen 18 felnőtt nőstény patkány (Wistar; Charles Rivers Laboratories, Magyarország) került felhasználásra (10 állat a CaMKII serkentő vírussal végzett kísérlet során, 8 állat a retrográd munka serkentő vírussal végzett vizsgálataihoz).

3.2 MŰTÉTEK

A műtétek megkezdése előtt az állatokat testtömegüknek megfelelő mennyiségű hasüregbe adott ketamin (100 mg/ml) és xilazin (20 mg/ml) keverékével altattuk. A műtét megkezdése előtt előkészítettük az állatokat, a koponyatetőről lenyírtuk a szőrt és fejüket befogtuk stabilan a csontos hallójáratba helyezett rudakkal, a felső metszőfogakhoz helyezett fém beakasztásával és az orrtájékra helyezett fém merevítővel. Ezután szikével ejtettünk egy 2-3 cm hosszú középvonali bemetszést az állat fején, amit ollóval hosszabbítottunk meg és bőrfogókkal kihajtottuk oldalra, ezzel rögzítve a fejbőrt. Kipreparáltuk a bemetszés mentén a koponyát, hogy megfelelően látszódjon a bregma pont. Ezt követően beállítottuk nulla értéknek a bregma pontot a sztereotaxikus eszközön, majd kijelöltük a fúrandó pontokat az ILC és MPOA felett a Paxinos Atlas szerinti koordináták alapján. Ezután ezen pontokon átfúrtuk a koponyacsontot, és felnyitottuk a dura matert.

3.2.1 DUPLA VIRÁLIS INJEKCIÓK

Az MPOA-ba a következő vírust (100 nl) injektáltuk: pAAV-Ef1a-mCherry-IRES-Cre (AAV Retrograde), bilaterálisan az alábbi koordináták szerint: antero-posterior -0,5; medio-dorsalis +/-0,5; dorso-ventralis -6,7 és -7,7 mm. Ez egy retrográdan terjedő vírus, amely mCherry fluoreszcens fehérjét és Cre-rekombinázt expresszál. Három héttel később az mPFC-t vettük célba, melynek koordinátái antero-posterior +2,8; medio-dorsalis +/-0,7;

dorso-ventralis -3,9 és -4,7 mm voltak. A második vírus az alábbi volt: pAAV-hSyn-DIO-HA-hM3D(Gq)-IRES-mCitrine (AAV8) (100 nl/ beadási hely). Ez az anterográdan terjedő vírus mCitrine fluoreszcens fehérjét és egy serkentő DREADD-t Cre-dependens módon expresszáló vírus. A beadás után három hetet vártunk a viselkedésteszttekig, mely idő alatt az állatok felgyógyultak, valamint a vírus fertőzni tudta a sejteket, és kifejeződött a DREADD. A viselkedésteszt megkezdése előtt egy héttel az egyesével tartott állatok mellé behelyeztünk egy másik nőtényt.

3.2.2 CaMKII PROMÓTERT TARTALMAZÓ VÍRUS INJEKCIÓJA

A műtét előkészítése és menete hasonló volt a retrográd kísérlethez, viszont most csak egy, serkentő vírust adtunk be az mPFC területére (100 nl/ beadási hely): pAAV-CaMKIIa-hM4D(Gq)-mCherry. Ez egy anterográdan terjedő vírus, mely tartalmaz egy Ca^{2+} /kalmodulin-függő protein-kináz II (CaMKII) promótert, egy mCherry fluoreszcens fehérjét és a serkentő DREADD-et. A vírus piramissejteketben fejez ki fehérjéket. A műtét után három hetet vártunk, hogy az állatok felgyógyuljanak és a vírus szétterjedjen megfelelően az agyban. A műteti időszakban az állatokat itt is egyesével tartottuk. A viselkedésteszt megkezdése előtt egy héttel az egyesével tartott állatok mellé behelyeztünk egy másik nőtényt.

3.3 VISELKEDÉSI TESZTEK

3.3.1 KLOZAPIN-N-OXID (CNO) INJEKCIÓ

A viselkedési tesztek előtt 1,5 órával az állatokat szeparáltuk a stimulus állattól, majd ezt követően CNO-t vagy kontroll DMSO-t adtunk be intraperitoneálisan. Az első kísérleti napon kontroll injekciót alkalmaztunk (5% DMSO desztillált vízben oldva, 1 ml/kg), másnap CNO-t adtunk be (0,3 mg/kg CNO, 5% DMSO-ban oldva). Ezt két nappal később újabb kontroll injekció követte.

3.3.2 HÁROM KAMRÁS ISMERTSÉGI TESZT

Először a három kamrás tesztet végeztük el. Az első nap a beszoktatás történt, a második napon a kísérlet megkezdése előtt másfél órával minden állat DMSO-t kapott,

ezután az állatot behelyeztük a három kamrás eszköz középső részébe, ami még a kis ajtókkal le volt zárva. Ezután az egyik oldalsó ketrecbe behelyeztük a vizsgált állat számára ismerős állatot, míg a másik oldalsó kamra ketrece üresen maradt. Ezután kinyitottuk a kis ajtókat, és mértük a vizsgált állat mozgását 10 percen át. A harmadik napon a kísérlet megkezdése előtt másfél órával CNO-t adtunk be az állatoknak. A viselkedésteszt menete ugyanaz volt, mint a második napon. Az utolsó napon az állatok DMSO-t kaptak másfél órával a kísérlet kezdete előtt. A viselkedésteszt ugyanúgy zajlott le, mint a második és harmadik napon.

A rögzített videók elemzése a SMART Video Tracking software v3.0 (Panlab Harvard Apparatus) programmal történt.

3.3.3 DIREKT SZOCIÁLIS INTERAKCIÓ VIZSGÁLATA

A direkt szociális interakció mérése során a vizsgált és a stimulus állatot egy 40x80 cm-es open-field arénába helyeztünk el, ahol szabadon interakcióba léphetnek egymással 10 percen keresztül. Ennél a tesztnél többféle paramétert különböztettünk meg, passzív fizikai kontaktust, test szimatolás, anogenitális szimatolást, mászást, ápolást, üldözést és nem szociális viselkedést. Ezeket a viselkedési elemeket rögzítettük a vizsgált és a stimulus állat esetén is. A kísérlet napjainak a felosztása azonos volt a három kamrás ismertségi teszt felosztásával (beszoktatás, DMSO, CNO, DMSO).

A rögzített videókban a direkt társas interakciókat manuálisan, Solomon Coder szoftverrel elemeztük ki.

3.3.4 EMELT KERESZTPALLÓ TESZT

A szorongásszerű viselkedést az emelt keresztpalló teszttel (EPM) vizsgáltuk. Az állatokat egy 60 cm magasan lévő keresztpallóra helyeztük, amely két nyitott és két zárt karból állt. A kísérlet kezdetén az állatokat a keresztpalló közepére helyeztük, majd szabadon mozoghattak mind a négy karban 10 percen keresztül. A nyitott és zárt karokban eltöltött időt mértük. A videókat Solomon Coder szoftverrel elemeztük ki.

3.4 HISZTOLÓGIA

3.4.1 PERFÚZIÓ

A viselkedésteszték után az állatokat szeparáltuk, majd formaldehid oldattal perfundáltuk őket. A perfúzió lényege, hogy a szív balkamráján keresztül egy kanült vezetünk az aortába, majd miután rögzítettük a kanült, a jobb pitvart megnyitottuk és először fiziológiás sóoldattal kimostuk a vért az állatok érrendszeréből, majd 4%-os formaldehidet használtunk fixálóként. Fixálás után az agyakat gondosan eltávolítottuk a koponyából, majd egy napra 4%-os formalinban tároltuk, majd áthelyeztük Na-azidos foszfát pufferbe.

3.4.2 METSZETKÉSZÍTÉS

A metszés előtt egy nappal cukoroldatba helyeztük az agyakat. Fagyasztva metszés során az agyakat 40 µm-es coronalis metszetekre szeleteltük. Ezután a metszeteket 0,1%-os foszfát-pufferrel mostuk át háromszor, majd Na-azidos foszfát pufferbe tároltuk az immunfestésig.

3.4.3 IMMUNFESTÉS

A festés során minden főbb lépés előtt 3-szor átmostuk a metszeteket 0,1%-os foszfát-pufferben (PB). Először H₂O₂ blokkolást végzünk, 15 percen keresztül hagytuk a metszeteket a 3%-os H₂O₂ oldatban, mellyel blokkoljuk az endogén peroxidázokat, majd 3%-os tritonos szérumalbuminba helyeztük a metszeteket 1 órára, ezzel csökkentve az antitestek aspecifikus kötődését. Ezután a metszeteket egy éjszakára ezerszeres hígítású csirkében termelt primer anti-mCherry antitestben inkubáltuk (1:1000x, AB205402). . Másnap PB mosás után következett a szekunder antitest (Jackson ImmunoResearch, 03-065-155), ami ezerszeres hígítású számarban termelt biotinilált anti-chicken IgG volt. Az egyórás inkubáció után 500x-os hígítású avidin-biotin-peroxidáz (ABC, 1:500x; Vector Laboratories, PK-6100) oldatba helyeztük 1 órára a metszeteket. Ezt követte egy PB mosás és egy TRIS mosás. Utolsó lépésünk a hívás volt, melynek során Nikkel-DAB-ban (100 µl DAB, 3 ml TRIS, 2 ml Nikkel-szulfát/5 ml-es üveg és a hívás megkezdéséhez 40 µl 0,3%-os H₂O₂) 6 percen keresztül előhívtuk a metszeteket. Ezután a metszeteket zselatinos

tárgylemezre húztuk fel és 24 órán keresztül hagytuk száradni, majd 3 percre xilolba helyeztük őket és lefedtük fedőlemezzel.

3.4.4 DUPLA FLUORESzcENS IMMUNJELÖLÉS

Az elvégzett duplafestés célja, hogy a megfelelő antitestekkel ki tudjuk mutatni az agysejtekben expresszáldott mCherry-t és mCitrine-t. Mint a Nikkel-DAB festés esetén, itt is minden főbb lépés előtt 3-szor átmostuk a metszeteket 0,1%-os PB-ben. H₂O₂ blokkolást végeztünk, majd 3%-os tritonos szérumalbuminba helyeztük a metszeteket 1 órára, majd a metszeteket egy éjszakára ezerszeres hígítású kecskében termelt (mCitrine specifikus) GFP primer antitestben (AB5450) inkubáltuk. Másnap mosás után következett a szekunder antitest, ami számarban termelt biotinilált anti-kecske IgG volt. Az egyórás inkubáció után 500x-os hígítású avidin-biotin-peroxidáz (ABC, 1:500x; Vector Laboratories, PK-6100) oldatba helyeztük 1 órára a metszeteket. Ezután a PB mosást TRIS mosás követte és 5000x-es hígítású FITC-tyramiddal előhívtuk a metszeteket 6 percen keresztül. Hívás után a kettős jelölés céljából a metszeteket egy napra 1:1000x-es hígítású csirkéből származó anti-mCherry antitestben (AB205402) inkubáltuk, majd másnap PB mosás után 1 órára számarban termelt Alexa 594 anti-csírke IgG szekunder antitestbe (1:500; Jackson Immuno Research, 703-585-155) helyeztük.

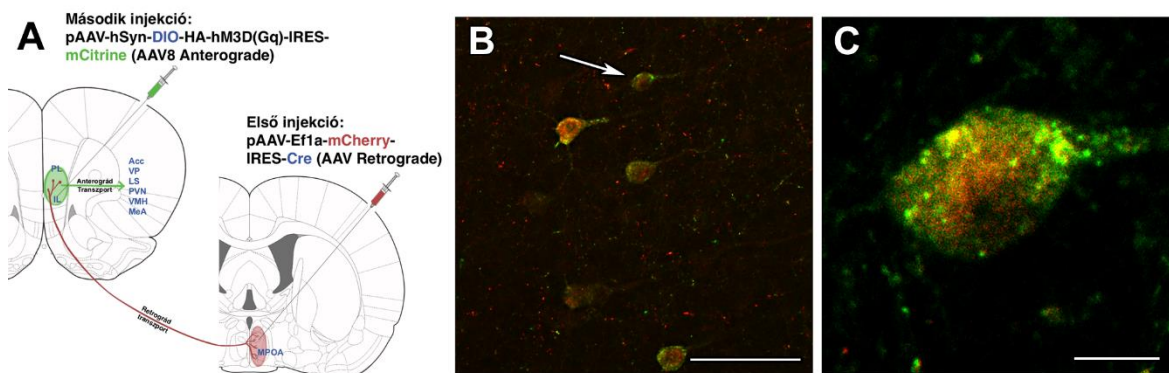
3.4.5 NEURONÁLIS AKTIVITÁS MÉRÉSE c-Fos TECHNIKÁVAL

A kísérlet során a kettesével együtt tartott nőstény patkányokat a perfúzió megkezdése előtt 24 órával izoláltuk a bazális c-Fos jel csökkentése érdekében. A perfúzió megkezdése előtt másfél órával CNO (0,3 mg/kg) injekciót intraperitoneálisan adtunk be, a kontroll csoport pedig DMSO-t kapott.

A c-Fos vizualizálását a fent leírt dupla immunjelölés szerint végeztük el, az immunjelölés során 3000-szeres nyúlban termeltetett primer c-Fos antiszérummal (Santa Cruz, SC-166940) dolgoztunk és a c-Fos jelet FITC-tyramiddal hívtuk elő.

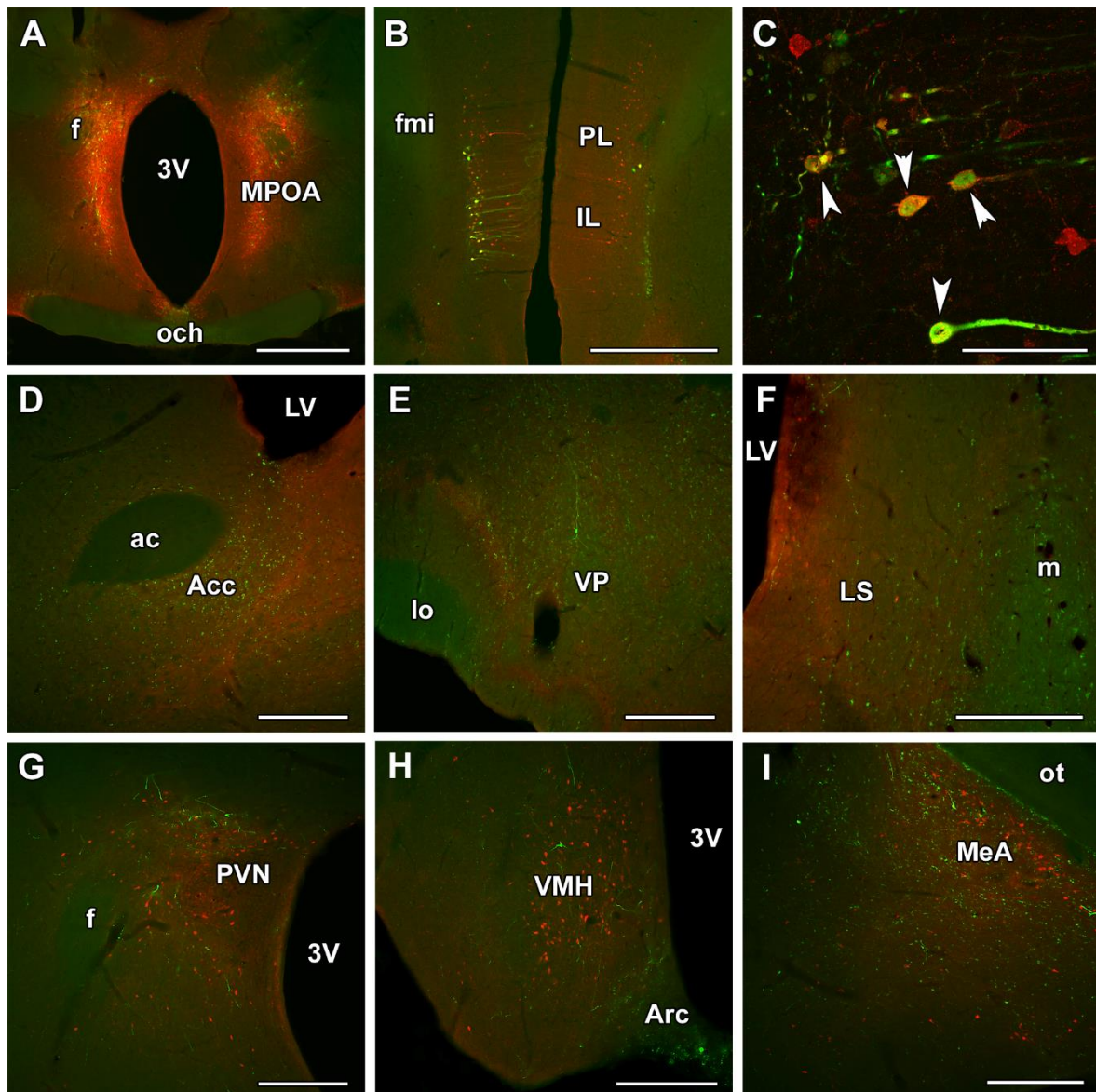
4 EREDMÉNYEK

Az mPFC-ből az MPOA-ba vetülő neuronok aktivitásának a hatásását dupla virális injekcióval vizsgáltuk (3A. ábra). CNO hatására c-Fos jelölés jelent meg a második vírussal fertőzött sejtekben (3B, C). Ezáltal azonosítani tudtuk azokat a sejteket, melyeket kemogenetikailag serkentettünk a viselkedésteszt során.



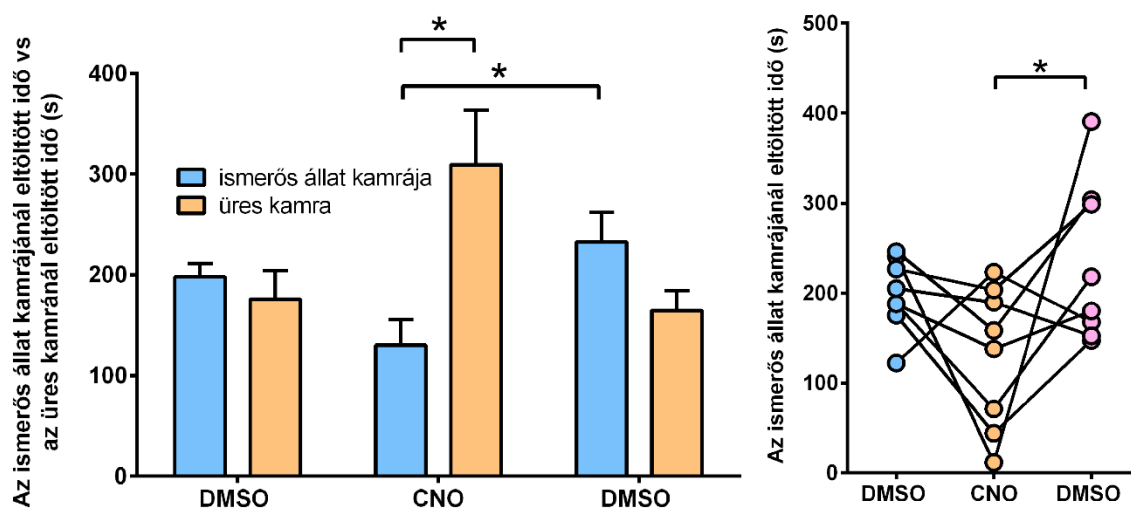
3. ábra – A: Az MPOA-ba vetülő mPFC neuronok serkentéséhez kapcsolódó vírusbeadás, A: Az első vírus injekció az MPOA-ba történt, ami Cre rekombinázt és mCherry (piros) fluoreszcens fehérjét fejezett ki az MPOA-ba vetülő neuronokban. A második vírust az PL/IL területére adtuk be, ami megfertőzte a környező neuronokat, Cre-dependens módon DREADD-et és mCitrine (zöld) fluoreszcens fehérjét fejezett ki. Az mCitrine anterográd terjedésével a neuronok alábbi vetületei láthatóvá váltak. B: Konfokális mikroszkóppal fotózott CNO indukált c-Fos jelölés (piros) az IL területén, a vírussal fertőzött neuronokat zöld szín jelzi (mCitrine). C: A B panelen nyíllal jelölt sejt nagy nagyítással. Látható, hogy a c-Fos csak a sejttestben jelenik meg. Léptékek: 100 μ m (B), 10 μ m (C).

Az első vírus az MPOA-ban terjedt szét és fertőzött (4A. ábra). A második vírus csak a Cre-dependens sejtekben tudott kifejeződni (4B. és C ábra), viszont anterográd további vetületeket adott számos agyterületre (4. ábra D-I). Az mCitrine anterográd terjedésével a mPFC MPOA-ba vetül neuronjainak a következő további vetületei váltak láthatóvá: accumbens mag (Acc), ventrális pallidum (VP), laterális szeptum (LS), paraventrikuláris hypothalamikus mag (PVN), ventromediális hypothalamikus mag (VMH) és mediális amygdala (MeA).

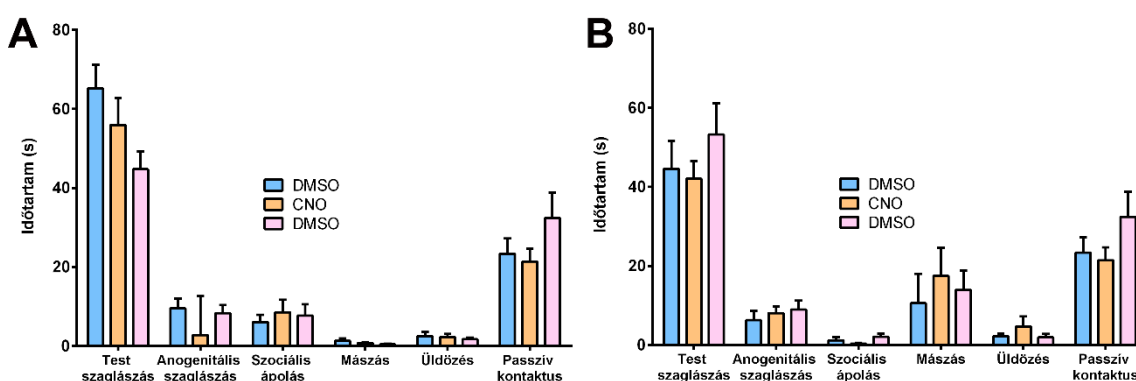


4. ábra - A mediális preoptikus területre (MPOA) vetülő mPFC neuronok projekciós mintázata. Az mPFC-be vetülő neuronok piros (mCherry), míg az mPFC-ből induló rostok zöld színnel (mCitrine) jelennek meg a dupla fluoreszcens immunfestés után. A: A retrográdan jelölő vírus MPOA-ba történt beadási helye. B: Az IL és PL kéregben levő, az MPOA-be vetülő (piros) és az mCitrine-t (zöld) is kifejező neuronok helyzete az L5-ben. A sárgaként megjelenő neuronokban mind a retrográd, mind a Cre-dependens vírus megjelent. Ezen neuronokban tehát kifejeződik a DREADD receptor is. C: Az mPFC neuronjai nagy nagyítású konfokális képen. Nyílhegyek jelzik a duplán jelölődő neuronokat. D-I képek mutatják be az mPFC MPOA-be vetülő neuronjainak további vetületeit, melyek az Acc, VP, LS, PVN, VMH, MeA területére vetülnek. Ezen területek közül az utóbbi 3 tartalmaz olyan neuronokat is (piros sejttest), melyek vetülnek közvetlenül az MPOA-ba. Léptékek: 1 mm (A,B,D-I), 100 μ m (C).

Az mPFC-ből a preoptikus és egyéb szubkortikális területre vetülő neuronok stimulálásának hatására csökkent az állatok szociabilitása a statisztikai számítások szerint (5. ábra; RMANOVA; $F=4,105$; $p=0,0395$). Ezután Holm-Sidak's posthoc tesztet végeztünk, melynek során megállapítottuk, hogy a CNO és a második DMSO oszlopok között történt szignifikáns változás, 130 ± 26 -ról 232 ± 29 mp-re nőtt az ismerős állat kamrájánál töltött idő. Ezen állatok direkt szociális interakciója nem változott meg a serkentés hatására (6. ábra).

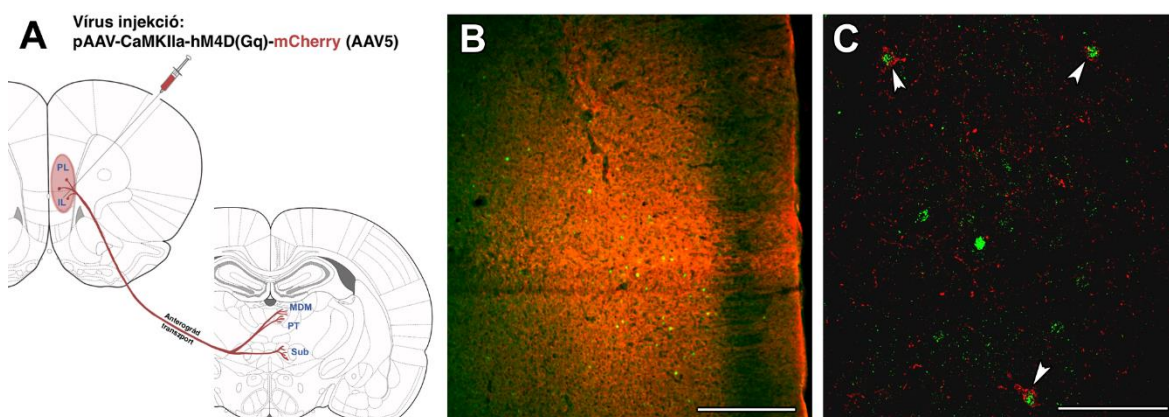


5. ábra – Az MPOA-ba vetülő mPFC neuronok serkentésének hatása a három kamrás testben mutatott viselkedésre. A: Az ismerős állat kamrájánál és az üres kamránál eltöltött idő összehasonlítása DMSO kontroll és CNO injekciók beadásának hatására. B: Az ismerős állat kamrájánál eltöltött idő vizsgált állatonként kontroll DMSO és CNO injekciók hatására. *: $p<0,05$, **: $p<0,01$.



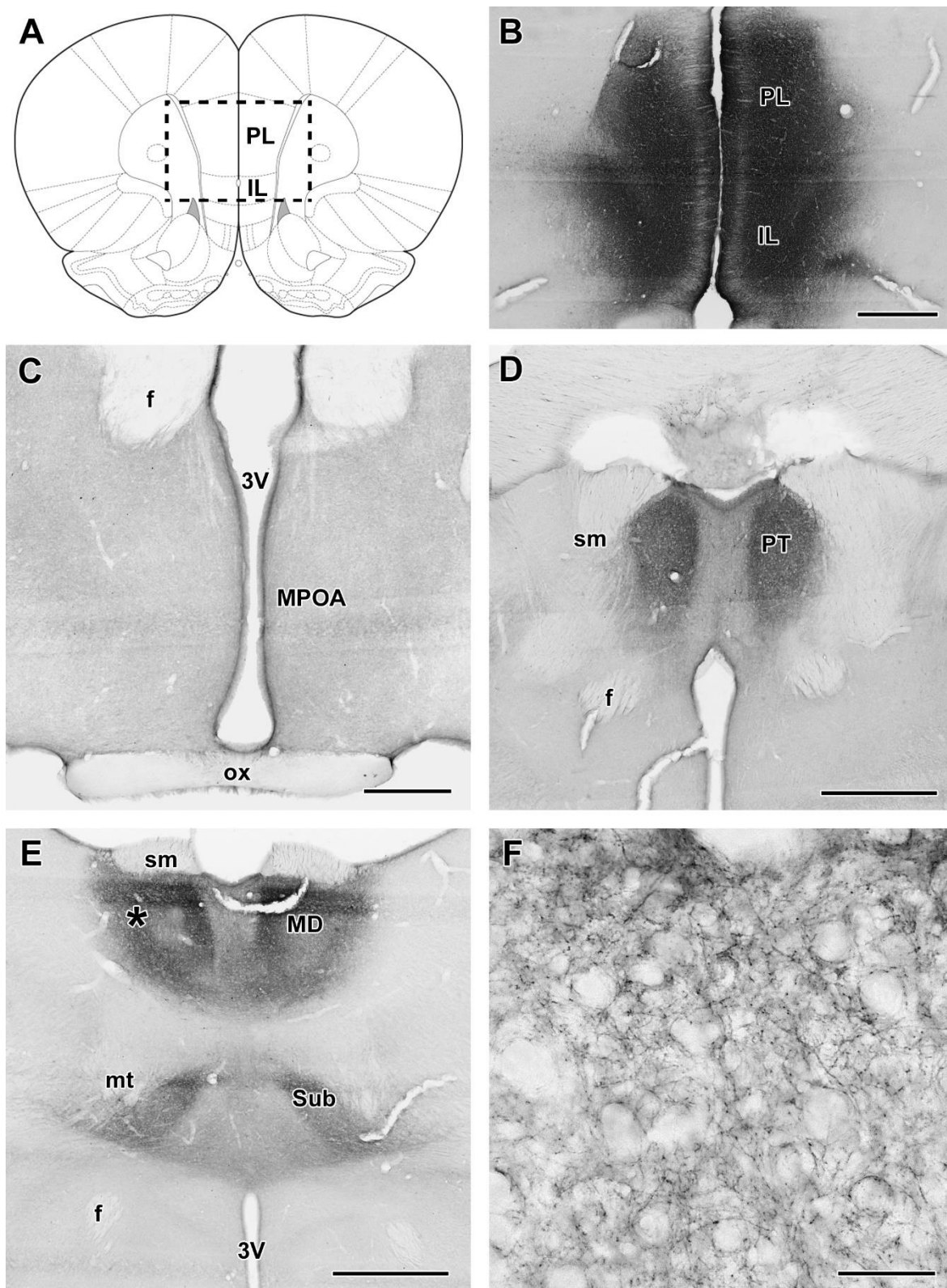
6. ábra – Az MPOA-ba vetülő mPFC neuronok serkentésének hatása a direkt szociális interakcióra. A kemogenetikailag serkentett állat (A), illetve az ismerős stimulus állat (B) viselkedési elemeinek időtartambeli változása DMSO és CNO injekciók hatására.

CaMKII promótert tartalmazó vírus mPFC-be történő injekcióján átesett állatokat perfundálás előtt CNO-val injektáltuk. A CNO-indukált c-Fos jelölés azon területen jelent meg, ahol az általunk beadott vírus is szétterjedt, és a vírusfertőzött neuronok többsége aktiválódott. Ezzel validáltuk a kemogenetikai serkentésünket, és azonosítani tudtuk azokat a sejteket, melyeket serkentettünk a viselkedésteszték során (7. ábra).



7. ábra – A CaMKII tartalmú neuronok serkentéséhez kapcsolódó vírusbeadás. A: A vírust a PL-t és az IL területére adtuk be, az mCherry anterográdan terjedt a thalamus MD, PT, és Sub magjaiba. B: A beadási helyet mutatják a megfertőzött sejtek (piros), míg a CNO indukált c-Fos jelölés (zöld) sejtmagokat jelöl. C: A nyílhegyek azon sejteket jelölik, melyekben vírus által kódolt DNS konstrukció alapján kifejeződött a DREADD, és a beadott CNO hatására c-Fos aktivitást mutattak. Lépték: 1 mm (B), 100 μ m (C).

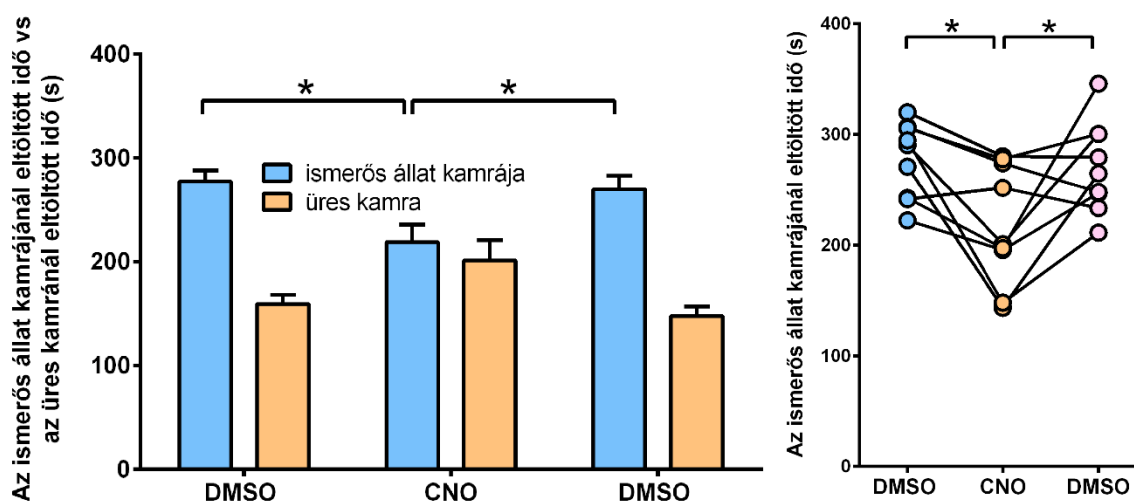
A PL és az IL területére vírusinjekciót adtuk (8. ábra), és ez vetületet adott a PT, MD és Sub thalamikus magokba (8D, 8E ábrák), viszont nem találtunk projekciót az MPOA területén (8C ábra).



8. ábra – Az mPFC területén elhelyezkedő CaMKII-t kifejező neuronok projekciói. A: Koronális rajz mutatja az mPFC agyterületet, ahova beadtuk a vírust. A szaggatott keret mutatja a B panel látóterét. B: Az A panelen jelölt terület mutatja a beadási helyet (PL és IL) Ni-DAB-os immunfestéssel előhívva. C: A vírusinjekciót követően nem volt jelölődés az MPOA-ban. D, E: A vírus által kódolt mCherry fehérje a PT, MD, és Sub magokban. F: Az

E panelen található, csillaggal jelölt terület nagy nagyítású képe, ami mutatja az egyéni idegrost végződéseket. Lépték: 100 μm (B, D, E), 500 μm (C), 50 μm (F).

Az mPFC CaMKII sejtjeiben DREADD-et kifejező állatok szociabilitását 3 kamrás tesztberendezéssel mértük, CNO-val történő serkentés hatására csökken a társával töltött idő (RMANOVA, $F=5,789$; $p=0,0128$). Ezután Holm-Sidak's posthoc tesztet végeztünk, ami kimutatta, hogy az első DMSO és a CNO oszlopok között történt szignifikáns változás, az ismerős állat kamrájában eltöltött idő $277\pm10,8$ -ról 219 ± 17 mp-re csökkent a CNO hatására, emellett a CNO és a második DMSO között történt még szignifikáns változás, 219 ± 17 -ről 270 ± 13 mp-re nőtt.

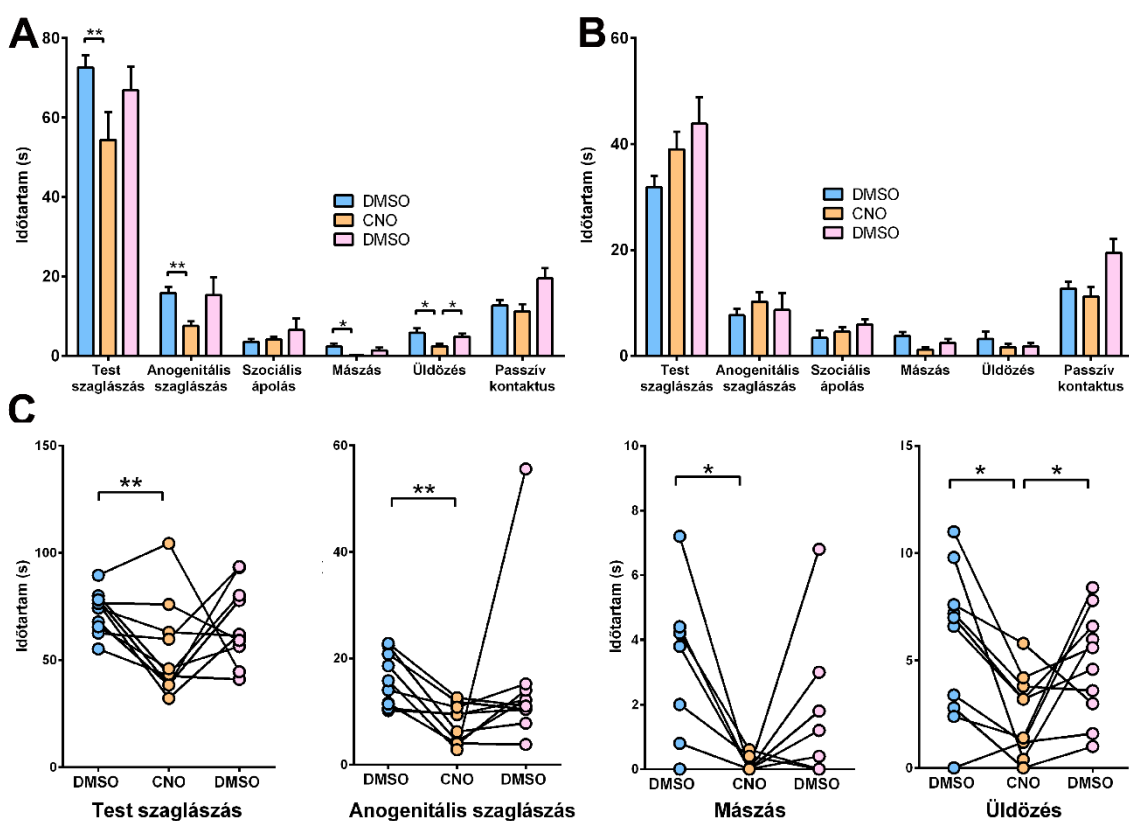


9. ábra. A három kamrás teszt eredménye az mPFC CaMKII neuronok serkentésének hatására. A: CNO hatására csökkent az ismerős állattal eltöltött idő, míg nőtt az üres kamrában töltött idő. B: Az egyes állatok adatait ábrázolva látható, hogy a második DMSO injekció beadásánál újra visszaemelkedett az eredeti értékre a szociabilitás. *: $p<0.05$.

Az mPFC CaMKII sejtjeiben DREADD-et kifejező állatok direkt szociális interakcióját nyílt porondon vizsgáltuk. CNO-val történő serkentés hatására csökkent több szociális viselkedésem időtartama (10. ábra). RMANOVA statisztikai tesztet végeztünk, mely alapján a test szaglászás ($F=5,435$; $p=0,0142$), az anogenitális szaglászás ($F=5,876$; $p=0,0109$), a mászás ($F=4,04$; $p=0,0355$) és az üldözés ($F=5,215$; $p=0,0163$) esetében tapasztaltunk szignifikáns csökkenést. Ezután elvégeztük a Holm-Sidak's posthoc tesztet, melynek során a test szaglászás esetében az első DMSO nap és a CNO nap között történt szignifikáns változás, $72,6\pm3,0$ -ról $54,4\pm6,6$ mp-re csökkent ezen viselkedésem időtartama

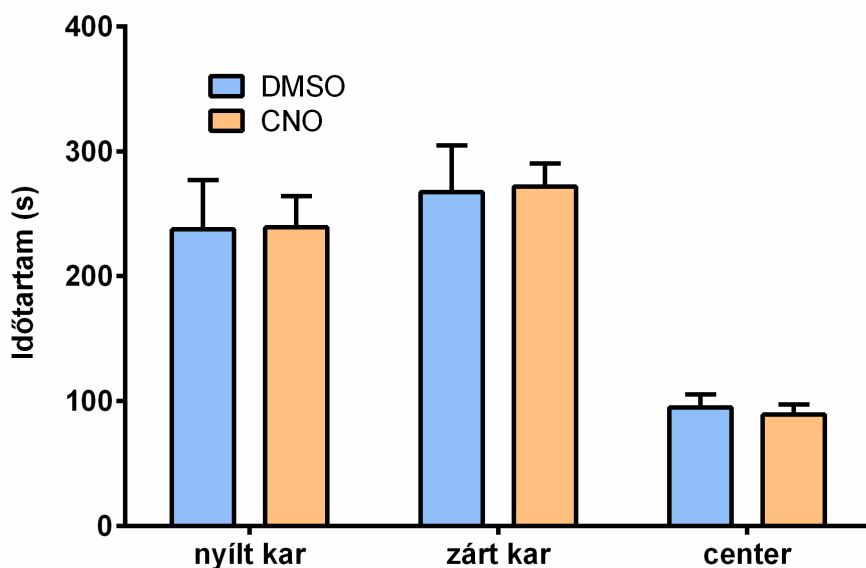
CNO hatására, az anogenitális szaglászás esetében szintén ezen 2 nap között történt változás, $15,8 \pm 1,5$ -ről $7,5 \pm 1,1$ mp-re csökkent a viselkedésem időtartama. A mászás esetében is szintén az első DMSO oszlop és a CNO oszlop között volt megfigyelhető szignifikáns változás, $2,32 \pm 0,71$ -ről $0,11 \pm 0,06$ mp-re csökkent az ezen viselkedésem időtartama. Az üldözés esetében nemcsak az első DMSO oszlop és CNO között ($5,78 \pm 1,05$ -ről $2,44 \pm 0,60$ mp-re változott az üldözés időtartama) volt megfigyelhető szignifikáns változás, hanem a CNO és a második DMSO oszlopok között ($2,44 \pm 0,56$ -ről $4,82 \pm 0,75$ mp-re nőtt az üldözés időtartama).

A kísérleti állatok mellett szintén megvizsgáltuk a stimulus állatok viselkedését, melyek esetében a különböző kísérleti napok között nem találtunk szignifikáns különbséget (10B ábra).



10. ábra – Direkt szociális interakció az mPFC CamKII neuronok serkentésének hatására. A: műtött állat viselkedési elemeinek időtartambeli változása kontroll DMSO és CNO injekciók hatására. B: Az ismerős stimulus állat viselkedési elemeinek időtartambeli változása. C: Azon viselkedési elemek időtartamai, melyeknél szignifikáns változást tapasztaltunk. Az egyes állatokat eltérő színek jelölik*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

Az emelt keresztpalló teszt segítségével szintén kimutattuk, hogy a mPFC CaMKII tartalmú sejtjeinek kemogenetikai stimulálásának nincs hatása az állatok szorongásszerű viselkedésére (11. ábra), így a szociális tesztekben megfigyelt viselkedésváltozások nincsenek összefüggésben az állatok stressz szintjével.



11. ábra – Az emelt keresztpalló teszt eredménye. A kísérleti eszköz egyik területén eltöltött időtartamban sem történt változás CNO hatására.

5 DISZKUSSZIÓ

A preoptikus projekciós neuronok jelölése megfelelő promóter hiányában némileg komplikáltabb, mint a CaMKII tartalmó projekciós neuronok esetében. Az MPOA-ba injektált retrográd módon terjedő vírust használtunk, amely képes volt megfertőzni az MPOA projekciós neuronok terminálisait, majd a sejttestekbe transzportálódott, és Cre-rekombinázt, valamint mCherry-t fejezett ki. Az IL L5 rétege és a PL ventrális része tartalmazott az MPOA-ba vetülő neuronokat. A második, az mPFC-be injektált vírus ugyanott fertőzött sejteket, azonban Cre-függő expresszióval rendelkezett, ezért csak a Cre dependens, az MPOA-ból retrográd módon jelölt neuronok expresszálták az mCitrine-nel fuzionált DREADD-t, amely ezekben a neuronokban anterográd módon terjedt az axonok mentén. A várt módon az MPOA-ban anterográd módon jelölt rostok jelentek meg. Ezenkívül más szubkortikális régiókban, köztük az Acc-ban, a VP-ban, az LS-ban, a PVN-ban, a VMH-ban és a MeA-ban is megjelentek jelölt rostok, ami arra utal, hogy azok az mPFC-neuronok, amelyek az MPOA-ba vetülnek, ezekre az agyi régiókra is projektálnak. Az mPFC L5 rétegében lévő sejttestek elhelyezkedése és a szubkortikális régiók projekciói alapján a PN neuronok vagy a PN neuronok egy alcsoportja vetül az MPOA-ba.

A CaMKII promóter által irányított mCherry-t tartalmazó vírus injektálását követően anterográdan jelölt rostok három thalamikus területen jelentek meg. A rostok megjelenése arra utal, hogy az mCherry anterográd módon a terminálisok felé terjedt, vagyis a CaMKII promóter a thalamusba vetülő neuronokban aktív volt. A CaMKII glutamáterg neuronokban fejeződik ki, így ezek a projekciós neuronok serkentő hatásúak. Érdekes módon azonban a CaMKII promóter nem volt hatékony minden projekciós neuronban. A projekciós mintázat alapján, mely nem foglalt magába nem thalamikus célsejteket, csak a CT sejtek fejezték ki az mCherry fluoreszcens fehérjét. A projekciós mintázat hasonló volt a korábban egerekben leírt Emx1 promóter esetéhez, amivel az MD és a ventromediális mag (VM) volt a sejtek fő projekciós célpontja (Collins és mtsai, 2018). Néhány különbséget is megfigyeltünk azonban, nevezetesen azt, hogy anterográdan jelölt rostokat találtunk közvetlenül az MD-től rostralis irányban elhelyezkedő Parateniális (PT) és a ventrális helyzetű Submedius magban (Sub), míg a Sub-tól közvetlenül laterálisan elhelyezkedő VM magban nem volt megfigyelhető jelölődés. Ezen eltérések faji különbségekből is adódhattak, mivel jelen kísérletek patkányokkal és nem egerekkel történtek, de az is felmerülhet, hogy az mPFC más területeit vizsgáltuk, mivel a mi injekcióink kissé ventrálisabbak voltak, mint Collins és munkatársaié. Az is lehetséges, hogy a CaMKII és az Emx1 promóterek nem teljesen átfedő

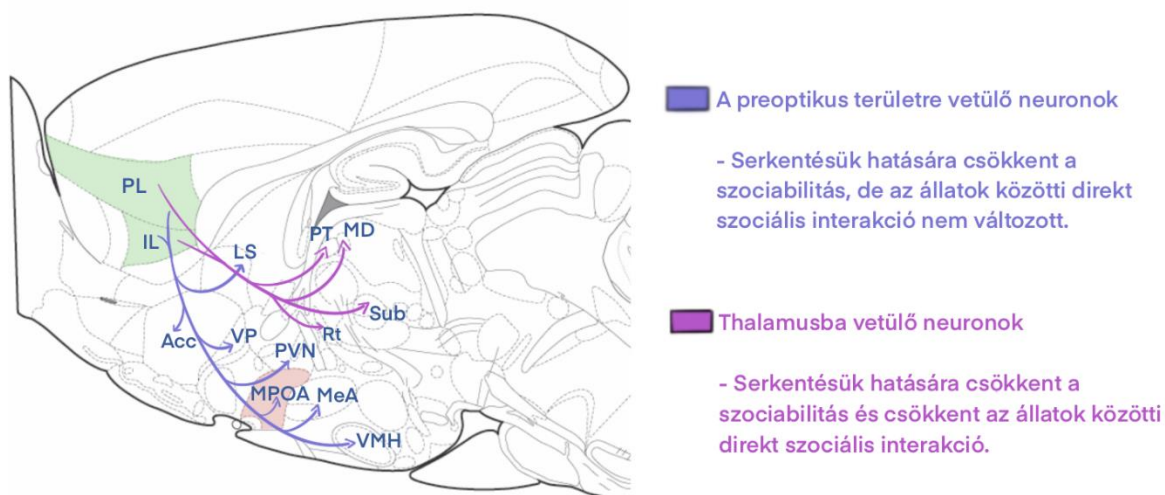
sejtpopulációkban voltak aktívak. Érdekes módon mindkettőt a piramissejtek vagy az összes fajta projekciós neuron markerének tekintik (Chan és mtsai, 2001), ugyanakkor az anterográd módon jelölt rostok mintázata alapján mindkettő csak a projekciós neuronok egy alcsoportjában aktív.

Az MPOA-ba vetülő neuronok és a CaMKII promóterrel rendelkező neuronok projekciós mintázata jelentősen különbözött. Nevezetesen, az MPOA-ba vetülő neuronok nem vetültek a thalamusba, míg a CaMKII neuronok nem vetültek az MPOA-ba. Ez a jelentős eltérés lehetővé tette számunkra, hogy szelektíven vizsgáljuk az mPFC két, nem átfedő projekciós neuronpopulációjának funkcióját.

Mivel a CNO-t a viselkedési kísérletek során szisztémásan injektáltuk, a sejttestekre és a sejtek terminálisaira egyaránt hatással volt, mivel mindkettő tartalmazott DREADD-receptort. A CNO hatékonyságát a DREADD-et expresszáló neuronok serkentése esetében a c-Fos megjelenése bizonyította a fluoreszcensen jelölt sejttestekben, válaszul a CNO beadására az állatok perfúziója előtt. Az MPOA-ba vetülő neuronok gátolták a szociabilitást, viszont a direkt szociális interakciókra nem volt mérhető hatásuk. A CaMKII neuronok serkentésének a hatására gátolták a szociabilitást, azaz a három kamrás teszt során csökkent a fajtárs kamrájában eltöltött idő az üres kamrával szemben. Továbbá a szociális interakciók több fajtája is gátolt volt a direkt szociális interakció tesztben. Ezek az eredmények valószínűleg nem a megváltozott szorongásszintnek tudhatók be, annak ellenére, hogy az mPFC részt vehet a szorongás szabályozásában (Giustino és Maren, 2015), mivel mi nem találtunk megváltozott szorongási szintet azoknál az állatoknál, amelyekben a CaMKII neuronjait stimuláltuk.

Az mPFC neuronok serkentésének a hatására lecsökkenő szociabilitás arra enged következtetni, hogy ezen sejtsoportok fontosak a szociális viselkedés szempontjából, azon belül is a szociális jutalom feldolgozásában lehet szerepük. Azt, hogy az mPFC projekciós neuronjai gátolják a társas interakciókat, a múltban már kimutatták az Acc esetében (Murugan és mtsai, 2017). Azonban nem minden projekciós neuron fejtette ki ezt a hatást, például a BLA-ba és a ventrális hippokampuszba projekciót adó neuronok nem voltak effektívek. A kortiko-thalamikus mPFC neuronok fokozott aktivitása valószínűleg képes növelni a thalamo-kortikális neuronok aktivitását, amelyek viszont először a felszíni réteg, majd az mPFC neuronok több különböző típusát aktiválják, és a szociabilitás mellett a szociális interakcióknak is a csökkenéséhez vezetnek. Az MPOA-ba, és más szubkortikális magokba projektáló mPFC neuronok specifikus stimulálásának hatása korlátozottabb lehet. Így a jelen eredmények azt mutatták, hogy a direkt szociális interakciókat nem gátolják az

MPOA-ba vetülő mPFC bemenetek, bár csökkent szociabilitást tapasztaltunk, ami a társas interakciók iránti csökkent motivációra utal. Ez a különbség a két sejttípus különálló funkciójára utal (12. ábra).



12. ábra. Az mPFC két különböző projekciós neuronjának célterületei, és szociális funkcióik.

Összefoglalva, jellemeztük az mPFC kortiko-thalamikus neuronjainak célterületeit patkányban, és kimutattuk részvételüket a szociális interakciók szabályozásában. Azt is megmutattuk, hogy bizonyos mPFC neuronok vetülnek az MPOA-ba, és kollaterálisokat adnak más szubkortikális régiókba is. Eredményeink szerint ezen neuronok aktivitása befolyásolja az állatok szociabilitását, de valószínűleg más mechanizmusokkal, mint a kortiko-thalamikus sejtek, mivel a direkt szociális interakciókat nem változtatta meg a serkentésük.

SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

Én, Darai Luca nyilatkozom, hogy:

- Az állatok sztereotaxiás műtéiteit, altatásukat, vírusinjekciók beadását és viselkedéstesztek elvégzését Dr. Keller Dávid segítségével és felügyelete mellett végeztem. A viselkedéstesztek összes videóját önállóan elemeztem ki.
- Immunhisztokémiai eljárásokat hajtottam végre önállóan, beleértve az agyak metszését, és azok immunjelölését.
- A fénymikroszkópos képeket önállóan készítettem el, a konfokális mikroszkópos képek elkészítésében részt vettem, a képfeldolgozásokat magam végeztem.
- A dolgozat megírása mellett az abban szereplő ábrákat is magam készítettem.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani a témavezetőmnek, Dr. Dobolyi Árpádnak, a dolgozatom elkészülése és a kutatási munkám során nyújtott segítségével, a TDK dolgozat javítása és a konzultációk során rám szánt rengeteg időért és köszönöm a hatalmas lehetőséget, hogy tagja lehetek egy ilyen családias kutatócsoportnak.

Külön köszönöm Dr. Keller Dávidnak, témavezetőmnek, hogy bevezetett a kutatás világába energiát és időt nem sajnálva és megtanított otthonosan dolgozni a laborban, a műtétek és a viselkedéstechnikák során. Hálás vagyok hatalmas türelméért, melyet felém tanúsított.

Köszönöm Dellaszéga-Lábas Viktóriának a segítséget, a türelmet és a sok-sok biztatást a labor munkálatok során. Köszönöm a kutatócsoport többi tagjának is, hogy bármikor segítségemre álltak.

Hálásan köszönöm családomnak a felém nyújtott támogatást és szeretetet, biztatásuk és az általuk megteremtett környezet nélkül nem születhetett volna meg ez a dolgozat. Emellett pedig szeretném megköszönni barátaimnak, hogy végig mellettem álltak egyetemi tanulmányaim és kutatásaim során. Köszönöm a sok közös élményt, beszélgetést, tanácsokat és kitartást mellettem.

A Nemzeti Agykutatási Program harmadik négyéves pályázati ciklusának támogatása (MTA-NAP3) nélkül a kutatás nem jöhetett volna létre. A dolgozatot szintén támogatta az NKFIH OTKA K133214 pályázata.



IRODALOMJEGYZÉK

Anastasiades, P.G., and Carter, A.G. (2021). Circuit organization of the rodent medial prefrontal cortex. *Trends Neurosci* 44, 550-563.

Anastasiades, P.G., Marlin, J.J., and Carter, A.G. (2018). Cell-Type Specificity of Callosally Evoked Excitation and Feedforward Inhibition in the Prefrontal Cortex. *Cell Rep* 22, 679-692.

Armbruster, B.N., Li, X., Pausch, M.H., Herlitze, S., and Roth, B.L. (2007). Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potently activated by an inert ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 5163-5168.

Arnsten, A.F., and Rubia, K. (2012). Neurobiological circuits regulating attention, cognitive control, motivation, and emotion: disruptions in neurodevelopmental psychiatric disorders. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 51, 356-367.

Burgos-Robles, A., Kimchi, E.Y., Izadmehr, E.M., Porzenheim, M.J., Ramos-Guasp, W.A., Nieh, E.H., Felix-Ortiz, A.C., Namburi, P., Leppla, C.A., Presbrey, K.N., *et al.* (2017). Amygdala inputs to prefrontal cortex guide behavior amid conflicting cues of reward and punishment. *Nat Neurosci* 20, 824-835.

Chan, C.H., Godinho, L.N., Thomaidou, D., Tan, S.S., Gulisano, M., and Parnavelas, J.G. (2001). Emx1 is a marker for pyramidal neurons of the cerebral cortex. *Cereb Cortex* 11, 1191-1198.

Collins, D.P., Anastasiades, P.G., Marlin, J.J., and Carter, A.G. (2018). Reciprocal Circuits Linking the Prefrontal Cortex with Dorsal and Ventral Thalamic Nuclei. *Neuron* 98, 366-379 e364.

Csányi, V. (2002). *Etológia* (Budapest: Nemzeti Tankönyvkiadó Rt).

Edeline, J.M., Hars, B., Hennevin, E., and Cotillon, N. (2002). Muscimol diffusion after intracerebral microinjections: a reevaluation based on electrophysiological and autoradiographic quantifications. *Neurobiol Learn Mem* 78, 100-124.

Gabbott, P.L., Warner, T.A., Jays, P.R., Salway, P., and Busby, S.J. (2005). Prefrontal cortex in the rat: projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *J Comp Neurol* 492, 145-177.

Giustino, T.F., and Maren, S. (2015). The Role of the Medial Prefrontal Cortex in the Conditioning and Extinction of Fear. *Front Behav Neurosci* 9, 298.

Harris, K.D., and Shepherd, G.M. (2015). The neocortical circuit: themes and variations. *Nat Neurosci* 18, 170-181.

Honjoh, S., Sasai, S., Schiereck, S.S., Nagai, H., Tononi, G., and Cirelli, C. (2018). Regulation of cortical activity and arousal by the matrix cells of the ventromedial thalamic nucleus. *Nat Commun* 9, 2100.

Keller, D., Lang, T., Cservenak, M., Puska, G., Barna, J., Csillag, V., Farkas, I., Zelena, D., Dora, F., Kuppers, S., *et al.* (2022). A thalamo-preoptic pathway promotes social grooming in rodents. *Curr Biol*.

Kim, Y., Yang, G.R., Pradhan, K., Venkataraju, K.U., Bota, M., Garcia Del Molino, L.C., Fitzgerald, G., Ram, K., He, M., Levine, J.M., *et al.* (2017). Brain-wide Maps Reveal Stereotyped Cell-Type-Based Cortical Architecture and Subcortical Sexual Dimorphism. *Cell* 171, 456-469 e422.

Kraeuter, A.K., Guest, P.C., and Sarnyai, Z. (2019). The Elevated Plus Maze Test for Measuring Anxiety-Like Behavior in Rodents. *Methods Mol Biol* 1916, 69-74.

Liu, X., and Carter, A.G. (2018). Ventral Hippocampal Inputs Preferentially Drive Corticocortical Neurons in the Infralimbic Prefrontal Cortex. *J Neurosci* 38, 7351-7363.

McKlveen, J.M., Myers, B., and Herman, J.P. (2015). The medial prefrontal cortex: coordinator of autonomic, neuroendocrine and behavioural responses to stress. *J Neuroendocrinol* 27, 446-456.

Murugan, M., Jang, H.J., Park, M., Miller, E.M., Cox, J., Taliaferro, J.P., Parker, N.F., Bhawe, V., Hur, H., Liang, Y., *et al.* (2017). Combined Social and Spatial Coding in a Descending Projection from the Prefrontal Cortex. *Cell* 171, 1663-1677 e1616.

Robinson, S., Todd, T.P., Pasternak, A.R., Luikart, B.W., Skelton, P.D., Urban, D.J., and Bucci, D.J. (2014). Chemogenetic silencing of neurons in retrosplenial cortex disrupts sensory preconditioning. *J Neurosci* 34, 10982-10988.

Schweinfurth, M.K. (2020). The social life of Norway rats (*Rattus norvegicus*). *Elife* 9.

Smith, K.S., Bucci, D.J., Luikart, B.W., and Mahler, S.V. (2016). DREADDS: Use and application in behavioral neuroscience. *Behav Neurosci* 130, 137-155.

Spellman, T., Rigotti, M., Ahmari, S.E., Fusi, S., Gogos, J.A., and Gordon, J.A. (2015). Hippocampal-prefrontal input supports spatial encoding in working memory. *Nature* 522, 309-314.

Wimmer, R.D., Schmitt, L.I., Davidson, T.J., Nakajima, M., Deisseroth, K., and Halassa, M.M. (2015). Thalamic control of sensory selection in divided attention. *Nature* 526, 705-709.

Zhang, S., Xu, M., Chang, W.C., Ma, C., Hoang Do, J.P., Jeong, D., Lei, T., Fan, J.L., and Dan, Y. (2016). Organization of long-range inputs and outputs of frontal cortex for top-down control. *Nat Neurosci* 19, 1733-1742.