

A bazális előagyi kolinerg rendszer életkorfüggő változásainak vizsgálata pavlovi kondicionálás során

36. OTDK Biológia Szekció

Készítette:

Velencei Anna

Témavezetők:

Dr. Hangya Balázs
laborvezető

Dr. Sergio Martínez Bellver
tudományos munkatárs

Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet
Lendület Rendszer-Neurobiológia Kutatócsoport

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
BIOLÓGIAI INTÉZET



Budapest, 2023

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

AAV	adeno-asszociált vírus
ACh	acetilkolin
AD	Alzheimer's disease (Alzheimer-kór)
ALR	előnyalási ráta (anticipatory lick-rate)
ArchT	archeorhodopsin
BF	bazális előagy (basal forebrain)
BFCNs	bazális előagyi kolinerg neuronok
BLA	bazolaterális amigdala
ChAT	kolin-acetiltranszferáz (choline acetyltransferase)
CS	feltételes inger (conditioned stimuli)
HDB	Broca-féle diagonális köteg horizontális ága
mPFC	mediális prefrontális kéreg
US	feltétel nélküli inger (unconditioned stimuli)
TTL	tranzisztor-tranzisztor logika

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítésjegyzék	2
1. Bevezetés	4
1.1. A bazális előagyi kolinerg rendszer	4
1.2. Alzheimer-kór	5
2. Célkitűzések	6
3. Anyagok és módszerek	7
3.1. Állatok	7
3.2. Műtéti eljárások	7
3.3. Pavlovi kondicionáláson alapuló hangdetekciós teszt protokoll	8
3.4. Hisztológia	10
4. Adatgyűjtés	10
4.1. Elektrofiziológia	10
4.2. Optogenetikai gátlás	11
4.3. Száloptikás fotometria	11
5. Eredmények	12
5.1. Az öregedéssel megváltozik a BFCNs sejtek aktivitása pavlovi kondicionálás közben.	12
5.2. Az HDB kolinerg sejteinek optogenetikai gátlása a CS alatt megzavarja a tanulási folyamatot.....	13
5.3. Az ACh felszabadulás változása idős és AD modell állatokban a BLA és mPFC területén pavlovi kondicionálás során.....	15
5.3.1. 3-5 hónapos ChAT-Cre egerekben ACh szabadul fel a jutalom jelzésre, de a büntetés jelzésre nem.....	15
5.3.2. A 12 hónapos ChAT-Cre egerek kolinerg sejtaktivitása és viselkedése nem tér el lényegesen a fiatal állatokétól.....	17
5.3.3. 18-21 hónapos ChAT-Cre állatokban a jutalom jelzést csak gyenge ACh felszabadulás követi	18
5.3.4. 3xTg Alzheimer-modell egerekben nem detektálható ACh felszabadulás a CS-t követően20	
5.4. Hisztológia	22
6. Diskusszió	23
Köszönetnyilvánítás	25
Irodalomjegyzék.....	26

1. BEVEZETÉS

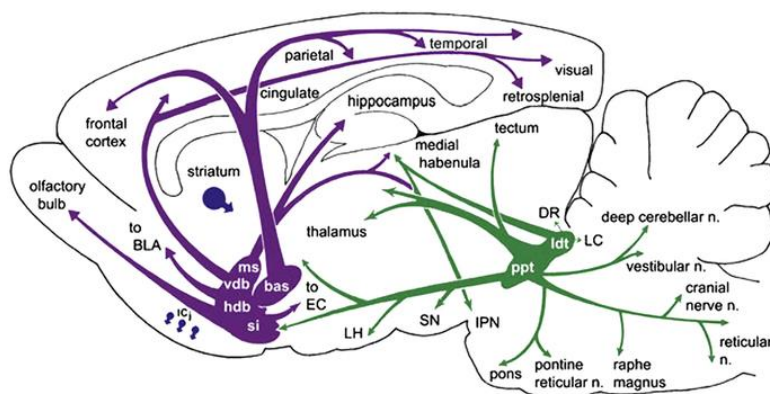
A Egyesült Nemzetek Szervezetének (ENSZ) 2019-es adatai szerint 2050-re a 65 évnél idősebb emberek a világ populációjának 16%-át fogják kitenni, és a 65 év felettiek várható élettartama növekedni fog 85 évre.¹ A WHO adatai szerint több mint 55 millió ember szenved valamilyen fajta demenciától, melynek 60-70%-át az Alzheimer-kór (Alzheimer's disease: AD) teszi ki, így a betegség kezelése az előregedő társadalmakra váró egyik legnagyobb kihívás.²

1.1. A bazális előagyi kolinerg rendszer

A bazális előagyi kolinerg neuronhálózat neuromodulátora az acetilkolin (acetylcholine: ACh), melynek felszabadítása révén fontos szerepet játszik az olyan kognitív funkciók megfelelő működésében, mint a figyelem, az éberség és a tanulási folyamatok.^{3,4} Már régóta ismert, hogy az életkor előrehaladtával a bazális előagyi kolinerg neuronok (basal forebrain cholinergic neurons: BFCNs) működése és morfológiája megváltozik, melyet funkcióvesztés és a dendritok, szinapszisok és axonok degenerációja jellemez. A kolinerg sejtek kognitív funkciók szabályozásában betöltött szerepéről az egészséges agyban alaposabb tudással rendelkezünk, az öregedés, valamint a neurodegeneratív betegségek során fellépő aktivitásbeli változások egyelőre tisztázatlanok.^{4,5}

A bazális előagyi kolinerg rendszerének része a mediális septum, a substantia innominata, a Broca-féle diagonális köteg horizontális és vertikális szára (HDB és VDB) és a Meynert-féle mag (1. ábra).⁶ A BFCNs az agy legkülönbözőbb területeire vetítenek, erősen innerválják a neokortikális területeket, valamint többek között projekciókat küldenek az amigdala, a hippocampus, és a neokortex felé.^{4,7}

A bazolaterális amigdala (BLA) és a mediális prefrontális kéreg (mPFC) bizonyítottan kulcsszerepet játszanak a tanulási folyamatokban.⁸ Mind az mPFC mind a BLA az HDB legjelentősebb projekciós területei közé tartoznak. Az erős kolinerg szabályozás alatt álló BLA elsősorban a félelmen alapuló tanulásban vesz részt. Az ide vetítő kolinerg sejtek jelentős hatást gyakorolnak az érzelmi emlékek rögzítésére.⁵ Eközben, az mPFC-ben felszabadított ACh révén a kolinerg neuronok részt vesznek a figyelmet igénylő tanulási feladatok elsajátításában.⁹



1. ábra Egér BF kolinerg rendszer (lilával) és agytörzsi kolinerg rendszer (zölddel) sematikus ábrája. Bazolaterális amygdala (BLA), entorhinális kéreg (EC), Broca-féle diagonális köteg horizontális és vertikális szára (HDB és VDB), medial septum (ms), substantia innominata (si), laterodorsális tegmentum (LDT), pedunculo-pontine tegmentum (PPT) valamint ezek vetületei.²¹

1.2. Alzheimer-kór

Napjaink egyik leggyakoribb neurodegeneratív betegsége az Alzheimer-kór.¹ Az AD-t két klasszikus patológiai jegy alapján különítik el az egyéb kognitív deficitel járó neurodegeneratív betegségektől, amelyek a amiloid-béta (A β) fehérje plakkok és a tau fehérje aggregátumok felhalmozódása.^{10,11} Egy másik fontos jellemző a korán megjelenő és progresszáló kolinerg sejtvesztés és degeneráció a BF-ben (basal forebrain), valamint a különböző kolinerg markerek, mint a kolin-acetiltransferáz (ChAT) és az ACh csökkenése.^{12,13} Bár számos bizonyíték támasztja alá, hogy az AD kolinerg elváltozása részben felelős a memória, a figyelem és a végrehajtó funkciók károsodásáért, azonban a pontos mechanizmus nem ismert.¹⁴

Az AD vizsgálatára számos állatmodell született, ebből az egyik leggyakrabban alkalmazott a 3xTg-AD egérmodell. Ezekben az állatokban három olyan transzgénikus mutáció fordul elő, melyek a familiáris AD jellemzői. Ezek a humán presenilin (PS1), az amiloid prekursor fehérje (amyloid precursor protein: APP) és a tau mutáns transzgénjei (APP Swedish, MAPT P301L és PSEN1 M146V). Ezen géneknek túlexpresszállása a központi idegrendszerre, főként a hippocampusra és a kéregre korlátozódik. A 3xTg-AD állatokban az életkor előrehaladtával először szinaptikus diszfunkció és helyi mezőpotenciál (local field potential: LTP) deficit, majd 6 hónapos kor körül A β plakkok és 12 hónapos korban tau neurofibrilláris kötegek is megjelennek. A 3xTg-AD állatok rendkívül hasznos modellek az AD vizsgálatához és a lehetséges terápiák teszteléséhez.^{15–17}

2. CÉLKITŰZÉSEK

Az eddigiek során röviden bemutattam, hogy a BF kolinerg rendszer érintett a természetes öregedés, valamint az AD során tapasztalt kognitív hanyatlásban.

A Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet, Rendszer-Neurobiológia Kutatócsoportban végzett kísérleteink a BF kolinerg rendszerének felépítés- és működésbeli jellemzőire, a kognícióban betöltött szerepére, valamint különböző agyi struktúrákkal, hálózatokkal kialakított kapcsolatrendszerére irányulnak.

Az itt bemutatott kísérleteink célja az volt, hogy feltárjuk a BFCNs működési mintázatait, és aktivitásbeli változásait a kognitív funkciók romlásával járó normális öregedés, valamint AD során.

Kutatásaink főbb célkitűzései a következők voltak:

- 1) Egy tanulási paradigma kifejlesztése mely lehetővé teszi a BFCNs vizsgálatát az életkor függő kognitív hanyatlás során.
- 2) A kifejlesztett tanulási feladat során optogenetikai módszerrel azonosított kolinerg sejtek aktivitásának regisztrálása elektrofiziológiai módszerek segítségével az öregedés különböző szakaszaiban.
- 3) A HDB kolinerg sejt aktivitás (optogenetikai) manipulációjának a tanulási teljesítményre kifejtett hatásának vizsgálata.
- 4) Az ACh felszabadulás életkor és AD függő változásainak feltárása különböző agyi területeken (BLA, mPFC).
- 5) A feltárt élettani elváltozások összevetése az állatok anatómiai elváltozásaival hisztológiai módszerek segítségével.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Állatok

A vizsgálatok során fiatal (3-6 hónapos), felnőtt (12 hónapos) és idős (18-21 hónapos) ChAT-IRES-Cre, B6129F1 valamint 3xTg-AD (PSEN1//App_{swe}//tauP301L (TmTgTg)) egereket használtunk az European Community's Council 1986. november 24-i direktívájának (86/609/EEC) megfelelően. A kísérleti eljárásokat a Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet Állatvédelmi Bizottsága, valamint a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal állatkutatás-etikai bizottsága (Committee for Scientific Ethics of Animal Research of the National Food Chain Safety Office of Hungary) vizsgálta felül és hagyta jóvá.

3.2. Műtéti eljárások

Az egereket ketamin-xilazin (83 mg/kg ketamin és 17 mg/kg xilazin feloldva 0.9% fiziológiás sóoldatban) intraperitoneális injekciójával altattuk. A fejbőrt leborotváltuk, fertőtlenítettük és lidokainos helyi érzéstelenítést alkalmaztunk. Az állatokat sztereotaxiás berendezésbe helyeztük, és a koponyát mind szinteztük a Bregma (β) és Lambda (λ) pontok segítségével. A bőrt felnyitottuk, majd a kötőszöveteket és a periosteumot eltávolítottuk a koponya felületéről.

Elektrofiziológiai vizsgálataink során ChAT-IRES-Cre, B6129F1 egereket (n = 3 db 3-6 hónapos; 3 db 18-21 hónapos) használtunk. Koponyaablakot fúrtunk az HDB fölé β -tól számítva antero-posterior (AP) 0,75 mm, medio-laterális (ML) 0,6 mm távolságra, az adeno-asszociált aktivátor opszin (AAV.EF1a.Dio.hChR2(H134R)-eYFP.WPRE.hGH; 300 nl) injektálásához, majd leeresztettük a saját tervezésű 32 csatornás mikrodrive-ot és a bal parietális kéregbe helyeztünk 1-1 föld és referencia vezetékét.

Az **optogenetikai manipulációs kísérleteink** során (n = 10 db) a szintén HDB-be injektáltunk bilaterálisan n = 5 állatba AAV gátló opszint (AAV.Cag.Flex.ArchT.GFP; 120-120 nl), valamint n = 5 egérbe kontroll vírust (AAV.Cag.Flex.GFP; 120-120 nl). A vírus injektálása után két optikai szálat (200 μ m) ültettünk az HDB-be, 20°-os szögben.

A **száloptikás fotometria kísérletekhez** ChAT-IRES-Cre, B6129F1, (n = 9 db: 3 db 3-6 hónapos; 3 db 12 hónapos; 3 db 18-21 hónapos), valamint 3xTg-AD (PSEN1//App_{swe}//tauP301L (TmTgTg)), 129SvF_x, (n = 6 db: 3 db 3-5 hónapos; 3 db 18-21 hónapos) egereket használtunk. A műtéti eljárás során BLA-ba (β -tól számítva AP -1,2 mm, ML -3 mm) és az mPFC-be (β -tól AP -1,76 mm, ML +0,30) injektáltunk fluoreszcens ACh

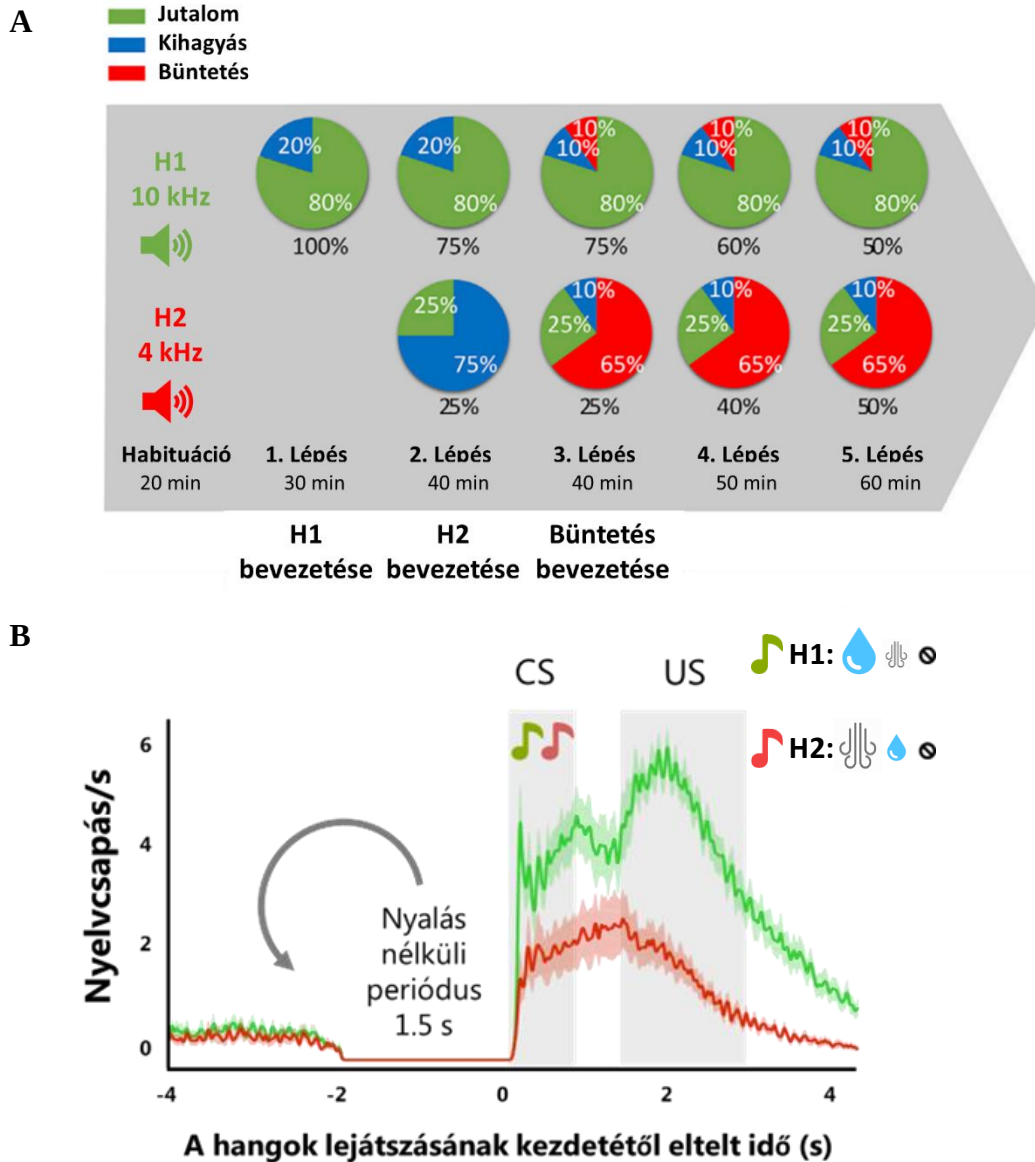
szenzort expresszálo AAV vírust (AAV.hSyn.ACh4.3.GFP; 300-300 nl), majd optikai szálakat (400 µm) ültettünk be a két terület fölé.

A műtétek során a mikrodrive-ot vagy az optikai szálakat, valamint egy fejbefogás céljából használt titánium tartót fogászati cementtel rögzítettünk a koponyához, végül fájdalomcsillapítót (buprenorphine 0.1 mg/kg) adtunk be intraperitoneálisan, majd a gyógyulási és vírus expressziós várakozási időszak után, egy héten át kézhez szoktattuk az állatokat a tréning megkezdése előtt.

3.3. Pavlovi kondicionáláson alapuló hangdetekciós teszt protokoll

Az egereket vízmegvontuk, naponta 1 ml folyadékot biztosítottunk számukra, mely nem jár jelentős súlyvesztéssel és szenvedéssel, azonban motiválttá teszi őket a feladat elvégzésére mely során a vizet, mint jutalmat használjuk. Az állatokat egy pavlovi kondicionáláson alapuló hangdetekciós feladatban tanítottuk (részletesen lásd: Hegedüs és munkatársai 2021 metodikai cikkünkben¹⁸) fejbefogott viselkedési környezetben (részletesen lásd: Solari és munkatársai¹⁹). A fejbefogott egerek a szájukhoz pozícionált nyelvcsapásmérő portból kaptak vizet. A nyelvcsapás frekvenciáját egy infravörös szenzor-emitter érzékelte.

A pavlovi vagy klasszikus kondicionálás egy olyan asszociatív tanulási paradigma, mely során egy feltétlen ingerhez (unconditioned stimuli: US) egy feltételes inger (conditioned stimuli: CS) kötődik. Fő jellemzője, hogy a kimenetel nem függ az alany cselekedeteitől, ezért az ilyen típusú tanuláson alapuló protokoll kialakítása lehetővé tette számunkra, hogy a lehető legjobban kontroll alatt tartsuk a kísérlet változóit és vizsgálhassuk a háttérben álló idegi mechanizmusokat. A feladat során az egereknek egy olyan hangdetekciós feladatot kellett végrehajtani, ahol két különböző frekvenciájú (10 és 4 kHz) hangokhoz különböző kimeneteleket kapcsoltunk. A 10 kHz-es hang (**H1**) jutalmat, míg a 4 kHz-s hang (**H2**) büntetést kódolt. A jutalom egy 3 µl mennyiségű vízcsepp, a büntetés pedig egy enyhe, de averzív levegő fúvást jelentett. A protokoll során az állatok minden nap új, egymást követő tanulási lépésekbe kerülnek. Az egereket 16-18 napig tanítottuk, napi egyszer 60 percet (2. ábra, A).



2. ábra (A) A pavlovi kondicionáláson alapuló hangdetekciós feladat tanulási protokoll lépései és a H1, H2 hangok arányai **(B)** A feladat egy próbájának felépítése. **Rövidítések:** CS:conditioned stimuli, US: unconditioned stimuli

A tréning első napján habituáció zajlik, ilyenkor kerülnek be az állatok először a tanítási környezetbe (2. ábra, A). Ebben a lépésben a fejbefogott egerek minden alkalommal kapnak vízjutalmat, amikor megnyalják a szájuk elé pozícionált csövet. A második napon bevezettünk a 10 kHz frekvenciájú (1. hang, H1) jutalom kódoló hangjelet. Az állatok minden jel után 80% valószínűséggel, 400-600 ms késéssel kapták a vízjutalmat, míg a többi 20%-ban kihagyás történt, vagyis nem érkezett jutalom az ezt jelző hangra. A következő lépésben megjelenik a 4 kHz-es hangjel (2. hang, H2), de büntetés még nem érkezik. A H2-t kis százalékban (25%) váratlan jutalom követi. Ez után következik a büntetés bevezetése. Ekkor a kimenetek

valószínűsége a következő volt H1: 80% jutalom, 10% büntetés, 10% kihagyás; H2: 25% jutalom, 65% büntetés, 10% kihagyás. A feltételes ingerek, valamint az ezeket követő feltétlen ingereket random generált sorrendben érkeztek (2. ábra, B).

3.4. Hisztológia

Az in vivo tanítási kísérletek után az állatokat ketamin-xilazin intraperitoneális injekciójával érzéstelenítettük és transzkardiálisan perfundáltuk foszfát-sóoldattal és 4% paraformaldehiddel. Az agyat eltávolítottuk a koponyából, posztfixáltuk (~24 óra, 4% PFA) és 50 µm-os metszeteket vágunk Leica 2100S vibratómmal, melyek mikroszkópos tárgylemezekre kerültek Aquamount lefedő anyaggal. A 3xTg állatokban immunhisztokémiai eljárással jelöltük az amiloid-β fehérjeaggregátumokat, valamint minden esetben a vírus konstrukciókhoz kapcsolt sárga és zöld fluoreszcens protein (YFP: yellow fluorescent protein, GFP: green fluorescent protein) segítségével vizsgáltuk mikroszkópos felvételeken (Nikon C2 konfokális mikroszkóp), hogy megfelelő volt-e a vírus expresszió és a beültetett optikai szálak helyzete.

4. ADATGYŰJTÉS

A viselkedési adatokat a Bpod Behavior Control System (Sanworks LLC. USA) segítségével rögzítettük, és egyedi MATLAB függvényekkel elemeztük. A Bpod tranzisztor-tranzisztor logika (TTL) szignálok generálása révén lehetővé tette az méréseink pontos időbeli szinkronizációját az állatok viselkedésével.

A fotometriai méréseinket Doric Lenses 2-site rendszerrel (Doric Lenses Inc, Kanada) végeztük. Ennek különlegessége, hogy szimultán tudunk két agyterületről detektálni fluoreszcens aktivitást. A rendszer 465 és egy 405 nm hullámhosszúságú LED-et vezérel. A 465 nm-es jelet, mely az ACh felszabadulással korrelál normalizáltuk a kontroll 405 nm-es izobesztikus jellel, ami lehetővé tette az agyszövet mozgásából származó műtermékek kiszűrését.

4.1. Elektrofiziológia

Az HDB-ben specifikusan mértük a területére beültetett 32 csatornás, egyedi tervezésű optrode segítségével channelrhodopsin asszisztált optikai azonosítással specifikusan egyedi kolinerg sejtek aktivitását a tanulási feladat alatt. Így követhettük a kolinerg sejtek tüzelési aktivitásváltozásait két korcsoportnál. Az állatok tanítása előtt és után 2-2 percig kék lézer

fénnyel (473 nm, Sanctity) 20 Hz-en stimuláltuk a sejteket a beültetett optikai szál segítségével. Az így detektált akciós potenciálok alapján főkomponens-analízissel azonosítottuk a kolinerg sejteket.

4.2. Optogenetikai gátlás

A CS-re az állatok különböző reakcióval válaszolhattak: „Találat”-nál a H1 alatt nyalták meg a csövet; „Téves” esetben H2 jelzésre nyaltak.

A válaszreakciók szerint elemeztük az állatok teljesítményét. H1 próbák során: „Találat” próbák/összes H1 próba, valamint H2 során: „Téves” próbák/összes H2 próba.

Az előnyalási ráta (anticipatory lick rate: ALR) megmutatja, hogy az állat mennyire sajátította el a feladatot. Az ARL azt méri, hogy az állat hányszor nyalta meg a csövet a H1 CS alatti időintervallumban (1s). A magas ARL arra utal, hogy az állat már a H1 hang hallatán is számít a jutalom érkezésére, tehát asszociáció alakult ki benne a H1 CS és az ezt követő jutalom US között.

4.3. Száloptikás fotometria

A fluoreszcencia (ΔF) mértékének kiszámításához az ACh felszabadulástól függő szenzorral mért, 465 nm-es jel, és az erre lineárisan illesztett, 405 nm-es izobesztikus jel közötti különbségét vettük. Ezután százalékos fluoreszcencia-növekedést számoltunk az alábbi módon:

$$\frac{\Delta F}{F} = \frac{465 \text{ nm jel} - \text{illesztett } 405 \text{ nm jel}}{\text{illesztett } 405 \text{ nm jel}} * 100$$

1. Képlet

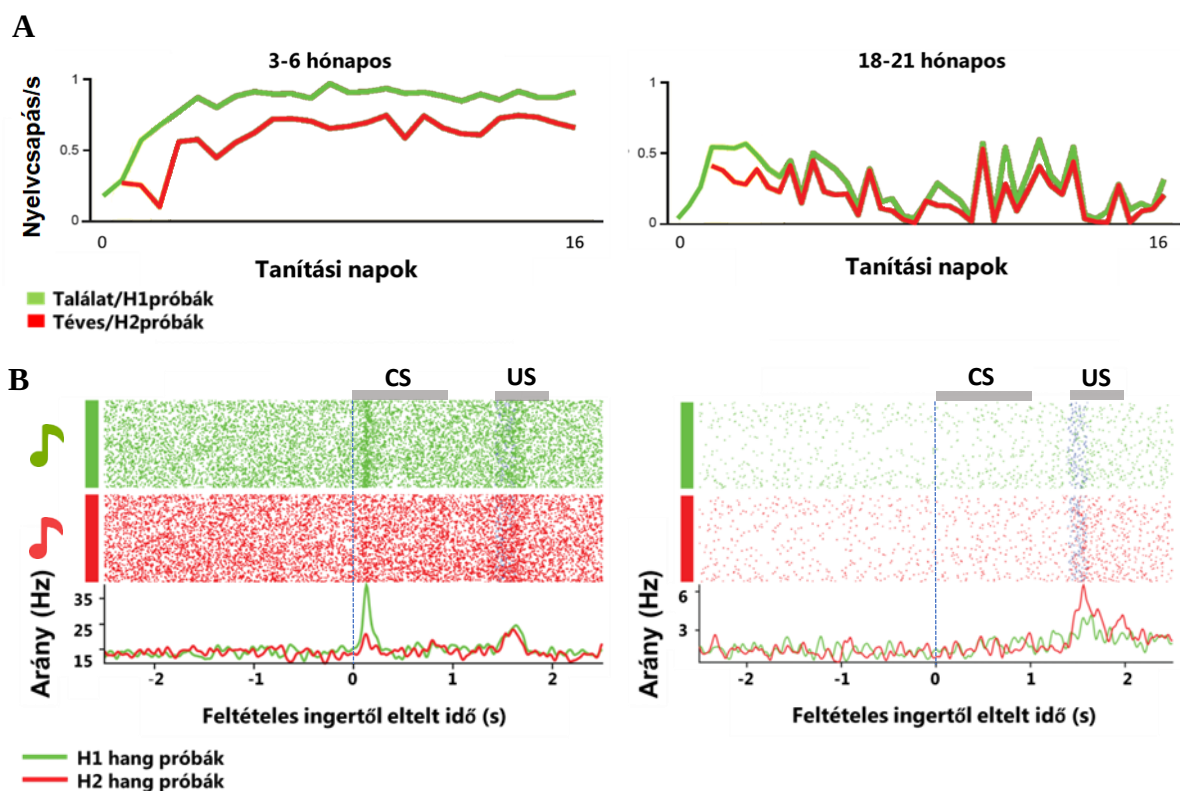
5. EREDMÉNYEK

5.1. Az öregedéssel megváltozik a BFCNs sejtek aktivitása pavlovi kondicionálás közben.

Korábbi munkánk során elektrofiziológiai és optogenetikai technikák ötvöztetésével rögzítettük azonosított kolinerg sejtek tüzelési aktivitását pavlovi asszociációs feladatot (3.3. fejezet) teljesítő fiatal ($n=3$) és öreg ($n=3$) állatokból (3. ábra).

A fiatal állatok hamar elsajátították a feladatot, különbséget tudtak tenni a H1 és H2 között és nagy aktivitást mutattak a feladat során (3. ábra, A). Az idős egerek nem diszkrimináltak a hangok között és sokkal kevésbé voltak aktívak, mint a fiatal állatok. A fiatal állatok HDB-ben mért kolinerg sejtaktivitás nőtt a H1 CS-re, azonban a H2-re nem (3. ábra, B). A kolinerg sejtek az US megérkezésére is megnövekedett tüzeléssel válaszoltak mind a fiatal, mind az idős állatoknál. Az idős egereknél nem tapasztaltunk megnövekedett kolinerg aktivitást egyik CS-t követően sem, azonban az US-re ebben az esetben is nőtt a sejtek tüzelése.

Eredményeink alapján elmondható, hogy az HDB kolinerg sejtjeinek fontos szerepe lehet a pavlovi kondicionálás során kialakuló CS-US asszociációban. A terület kolinerg



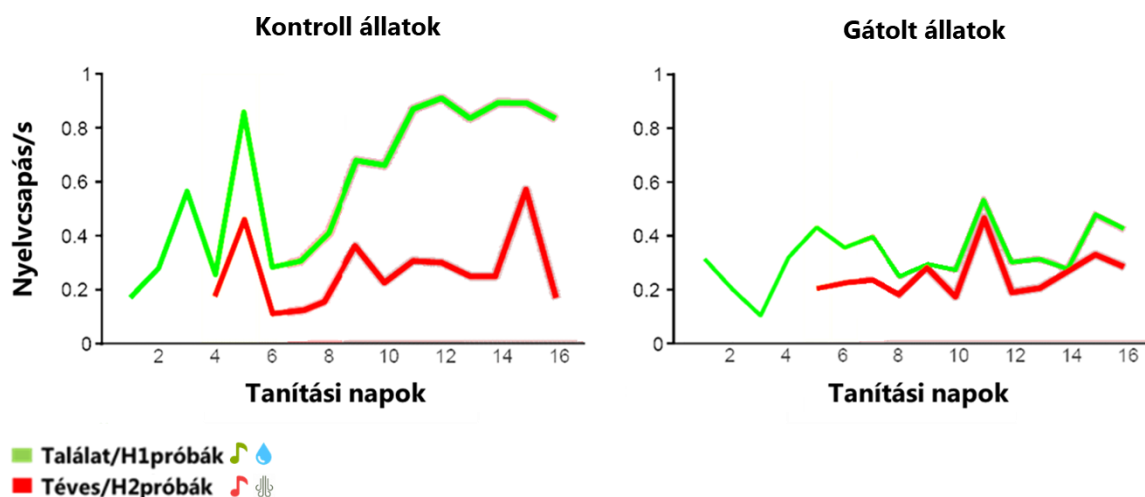
3. ábra (A) Fiatal (3-6), valamint idős (18-21) hónapos állatok viselkedésgörbéi **(B)** Egy-egy példa kolinerg sejtek tüzelési rátájára HDB-ben fiatal (balra) és idős (jobbra) állatokban

sejtjeinek CS-t követő aktivitásbeli különbsége idős és fiatal állatokban bizonyítékául szolgálhat, hogy az életkorral megjelenő kognitív deficit összefügghet a BFCNs nem megfelelő működésével.

5.2. Az HDB kolinerg sejtjeinek optogenetikai gátlása a CS alatt megzavarja a tanulási folyamatot

Az optogenetikai manipulációs kísérlet során az HDB kolinerg sejtjein végeztünk Archeorhodopsin (ArchT) mediálta gátlást, hogy ellenőrizzük az ACh szerepét a feladat elsajátítása során. Erre a célra fiatal (3-6 hónapos) ChAT-Cre állatokat használtunk, mely egértörzs lehetővé teszi a kolinerg sejtek célzott vizsgálatát. Az elektrofiziológiai vizsgálataink eredményei alapján, miszerint a fiatal és idős álatok eltérő kolinerg választ adnak a CS-re, úgy döntöttünk, hogy az HDB kolinerg neuronjainak gátlásához szükséges lézermegvilágítást (594 nm, Sanctity) a CS megjelenéséhez igazítjuk. Kontroll állatainkba a vírus kontroll változatát injektáltuk, mely nem tartalmazza a gátló opszint.

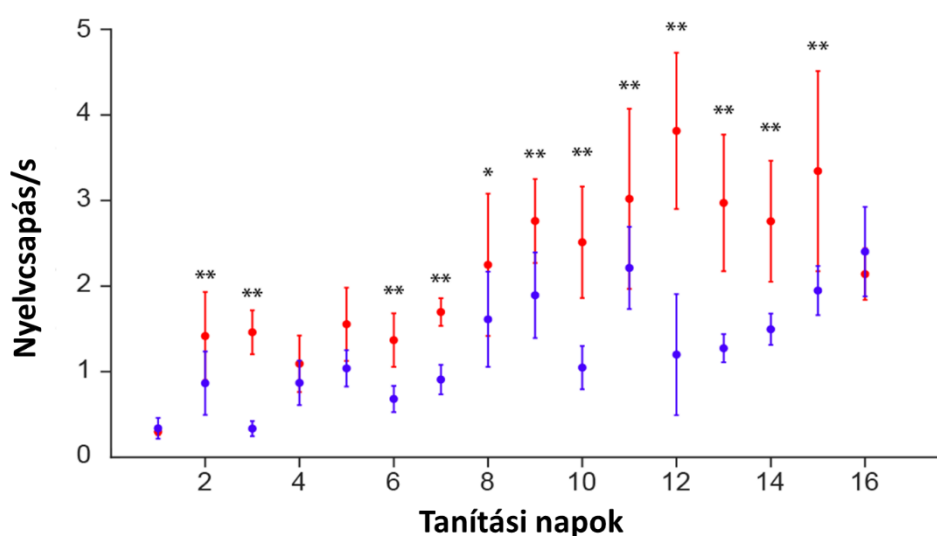
A tanítási folyamat során a gátolt állatok kevésbé tudták megkülönböztetni a H1 és H2 CS-t (4. ábra). A 4. ábrán jól látszik, hogy a kontrollcsoport aktívabb volt, és diszkrimináltak a H1-H2 CS között. A gátolt csoport ezzel szemben a tanítás alatt nem volt aktív és nem mutatott jelentős diszkriminációt, bár preferálták a H1 ingert (4. ábra).



4. ábra Kontroll és gátolt csoportok pszichometrikus tanulási görbéi a tanítási protokoll egymást követő lépéseiben. A zöld vonal jelzi a H1-re adott nyelvcsapások számát az összes H1 próbához viszonyítva. Pirossal ugyanezt láthatjuk a H2 próbákra.

Az 5. ábrán látszik, hogy a kontroll állatoknak szinte minden nap szignifikánsan magasabb volt az ALR szintje a gátoltakéhoz képest (Wilcoxon kétoldali rangteszt, $p < 0,01$).

Optogenetikai manipulációs kísérleteink eredményei alapján elmondható, hogy az HDB kolinerg neuronjainak hangjelzés alatti gátlásával romlott az állatok feladat során nyújtott teljesítménye a kontroll csoportéhoz képest. Ez arra utal, hogy az BFCNs szerepet játszanak a pavlovi tanulási folyamatban, és a kolinerg jelátvitel szükséges a CS-US asszociáció kialakulásához.



Gátolt állatok tanítási napjai (n = 5)

Kontroll állatok tanítási napjai (n = 5)

5. ábra ALR a 16 tanítási nap során. A **kontroll** (n = 5) állatok ALR-je majdnem minden nap szignifikánsan nagyobb (*) volt, mint a **gátolt** (n = 5) állatoké.

5.3. Az ACh felszabadulás változása idős és AD modell állatokban a BLA és mPFC területén pavlovi kondicionálás során

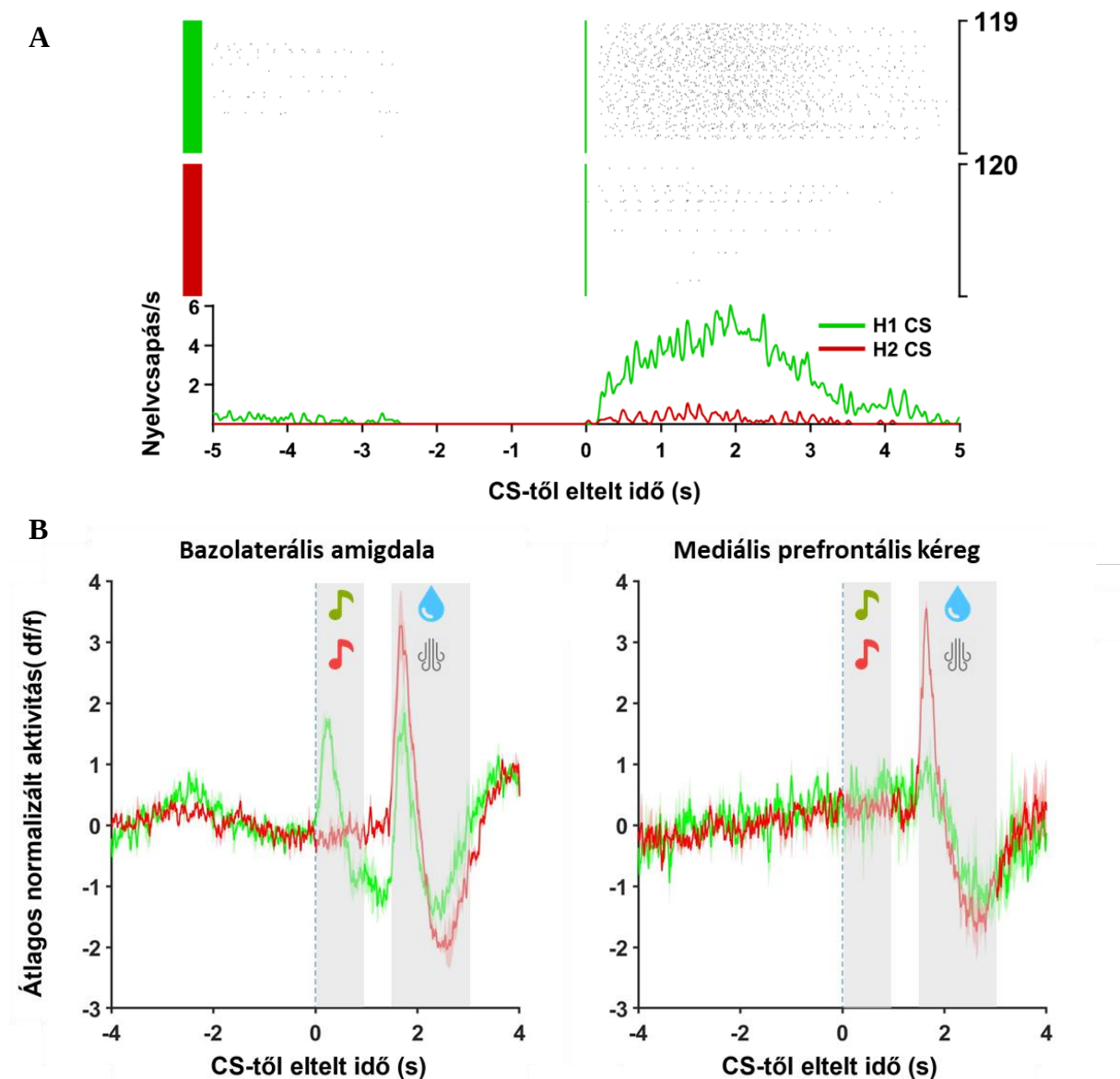
Fotometriai kísérleteink során, arra voltunk kíváncsiak, hogy az elektrofiziológiai vizsgálataink során mért adataink megfigyelhetők-e a kolinerg sejtek populációinak és az ACh felszabadulás szintjén is. Méréseinket ACh szenzor segítségével végeztük, mely ACh kötésének hatására konformációváltozáson esik át, így megváltozik a fluoreszcencia intenzitása, melyet optikai szál segítségével mérhetünk a célterületeken. A vizsgálatok során mért fotometriai jelünk arányos az ACh felszabadulással és közvetetten a kolinerg sejtek aktivitásával ²⁰. A műtéti eljárás során a BLA-ba és a mPFC-be injektáltuk az ACh szenzor kifejeződéséhez szükséges AAV konstruktot, és ugyanezekre a területekre ültettünk be 1-1 üvegszálat. A szenzor megfelelő expressziós szintjének elérése után, a már leírt pavlovi feladatban (3.3 fejezet) tanítottuk az állatokat, miközben szimultán vezettük el az ACh felszabadulást jelző fotometriai jelet a két agyterületről.

5.3.1. 3-5 hónapos ChAT-Cre egerekben ACh szabadul fel a jutalom jelzésre, de a büntetés jelzésre nem

A korábbiaknak megfelelően, a fiatal állatok hamar megtanulták a feladatot, és jól megtudták különböztetni a két CS-t. Szignifikánsan nagyobb ALR-t mutattak a H1 hangra a H2-höz képest, amely a feladat megfelelő elsajátítását feltételezi (7.ábra A).

Az egy órás tanítási intervallum alatt rögzített fotometriai jel mediánját vettük a tanítási napok között, ezeket Z-score normalizáltuk, majd az egy korcsoportba tartozó állatok mediánjait átlagoltuk.

Az elektrofiziológiai eredményeknek megfelelően a kolinerg sejtek aktivitásának növekedését figyeltük meg BLA-ban a jutalmat jelző H1 CS-t követően, azonban mPFC-ben csak egy lassú emelkedést tapasztaltunk a detektált fluoreszcens jelben. Az US megérkezését mindkét agyterület esetében jelentős kolinerg aktiváció követte. Ezzel szemben a büntetést prediktáló H2-es hangot nem követte a kolinerg sejtek megnövekedett aktivációja (7. ábra, B).

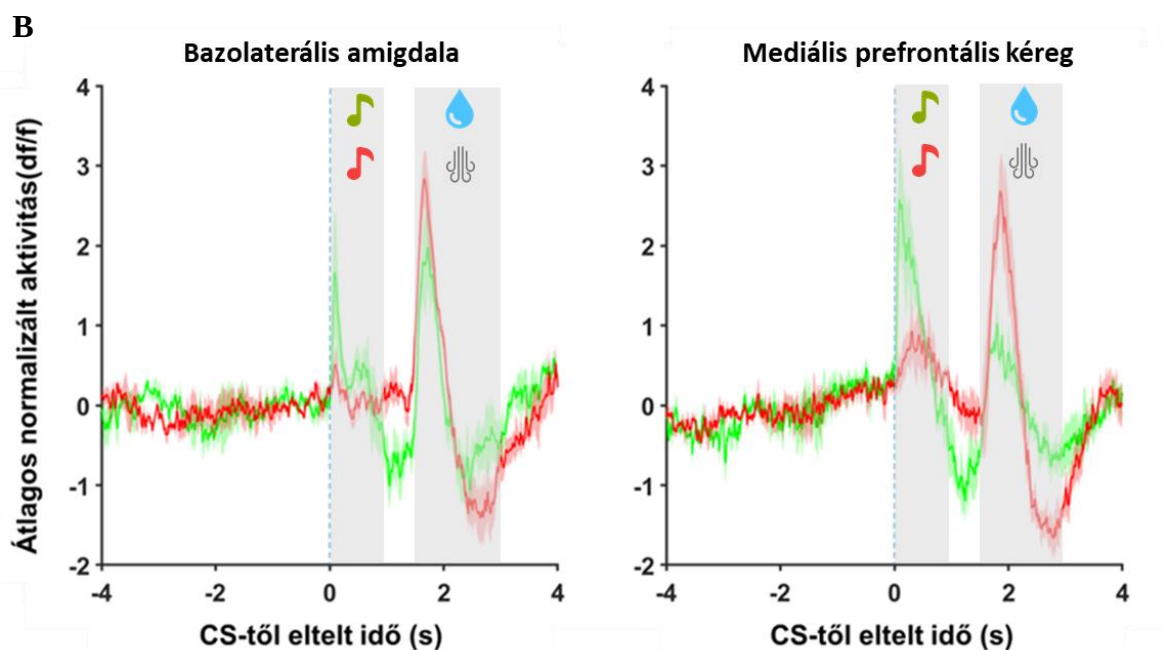
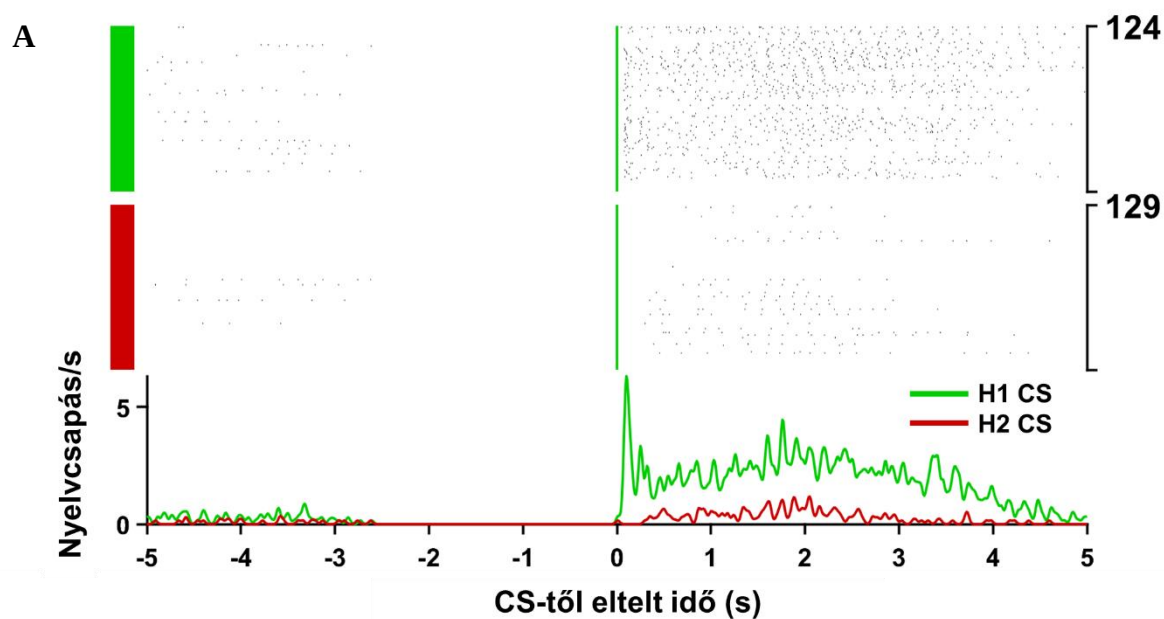


7. ábra (A) Egy fiatal állat napi teljesítménye. **Felül:** raszter diagrammokon ábrázoltuk, hogy hányszor nyalt az állat a **H1** és **H2** próbák során (egy sor egy próbának felel meg); **Alul:** ALR; **Zöld:** Nyalás száma a H1 próbákban, **Piros:** Nyalás száma a H2 próbákban
(B) A két agyterületen mért átlagos normalizált aktivitás (df/f) a H1 és H2 CS megjelenésétől eltelt idő függvényében.

Összességében ezek az eredmények arra utalnak, hogy 3-6 hónapos egerekben az ACh felszabadulása a BLA-ban összefügg a feladat teljesítésével, és ez nemcsak a visszacsatolásnál van jelen, hanem akkor is, amikor az állat a H1 CS alapján megtudja, hogy jutalomra számíthat. Ez a minta hasonló az HDB kolinerg idegsejtjeiben megfigyelthez, tehát a BLA-ban ACh felszabadulás történik a két US, valamint a H1-et követően. Érdekes, hogy ezekben az állatokban csak egy lassú emelkedésű ACh felszabadulást tapasztaltunk az az mPFC területén a H1 CS-t követően (7. ábra, B).

5.3.2. A 12 hónapos ChAT-Cre egerek kolinerg sejtaktivitása és viselkedése nem tér el lényegesen a fiatal állatokétól

Az egyéves korcsoportba tartozó állatok esetében nem tapasztaltuk a teljesítmény romlását (a fiatal egerekhez képest). Erősen diszkrimináltak a két hang között és az ALR-jük is rendkívül magas volt (8. ábra, A). A H1 CS-t, a fiatal állatoktól eltérően, itt nem csak a BLA-ban, hanem az mPFC-ben is gyors kolinerg aktivitásnövekedés követte. A fiatal állatokhoz hasonlóan itt sem detektáltunk megnövekedett ACh felszabadulást a H2 CS alatt. Az US-ek ezekben az állatokban is ACh felszabadulást váltottak ki, mindkét területen akárcsak a fiatalokban (8. ábra, B).



8. ábra (A) Egy 12 hónapos állat napi teljesítménye.

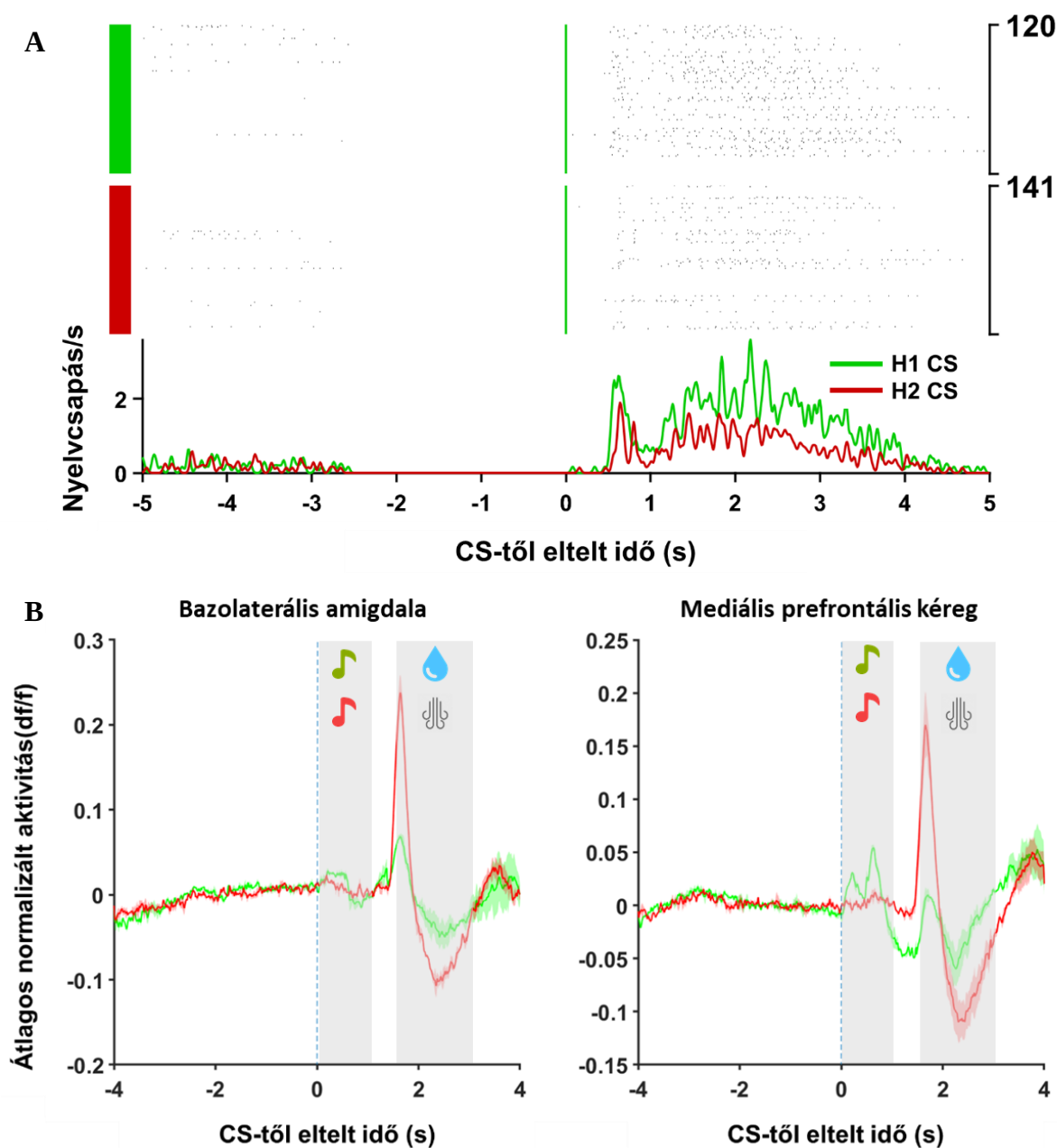
(B) A két agyterületen mért átlagos normalizált aktivitás (df/f) a H1 és H2 CS megjelenésétől eltelt idő függvényében.

5.3.3. 18-21 hónapos ChAT-Cre állatokban a jutalom jelzést csak gyenge ACh felszabadulás követi

Idős állataink az elektrofiziológiai méréseink során tapasztaltakhoz hasonlóan gyengébben teljesítették a feladatot, ALR-jük sokkal alacsonyabb, mint a fiatal és a 12 hónapos állatok esetében (9. ábra, A).

Az elektrofiziológiai eredményekkel ellentétben az állatokban mért kolinerg aktivitás a jutalmat prediktáló CS után még mindig megfigyelhető, azonban sokkal gyengébb, a BLA-ban egészen elhanyagolható a fiatal és az egyéves korcsoportjainkhoz viszonyítva. A büntetést prediktáló H2 jelre az idős állatoknál sem tapasztaltunk ACh felszabadulást (9. ábra, B).

Összességében fotometriai eredményeink alátámasztják az idős állatok HDB-kolinerg neuronjainak elektrofiziológiai mérései során megfigyeltet, miszerint csak az US ingert követi a kolinerg sejtek ACh felszabadulása, a CS érzézésére nem tapasztaltunk megnövekedett aktivitást.



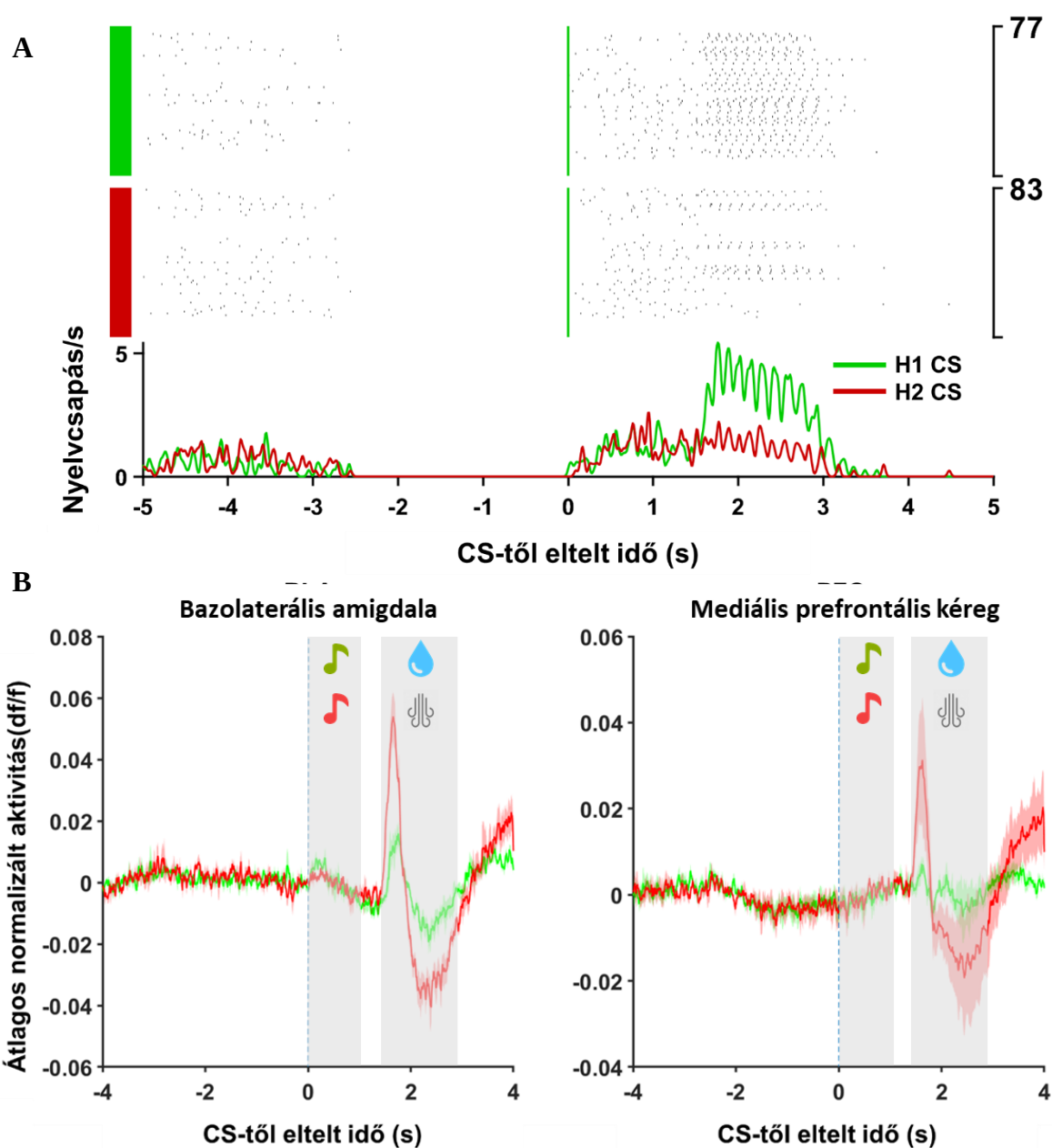
9. ábra (A) Egy 18-21 hónapos állat napi teljesítménye.

(B) A két agyterületen mért átlagos normalizált aktivitás (df/f) a H1 és H2 CS megjelenésétől eltelt idő függvényében.

5.3.4. 3xTg Alzheimer-modell egerekben nem detektálható ACh felszabadulás a CS-t követően

Fotometriai kísérleteinket 18 hónapos 3xTg Alzheimer-modell, valamint azonos korú és genetikai háttérű kontroll állatokon is elvégeztük.

Eredményeink alapján az mPFC-ben nem tér el a kontroll és az AD állatokban detektált ACh felszabadulás mintázata. A kontroll állatok BLA-jában detektáltunk egy gyenge ACh

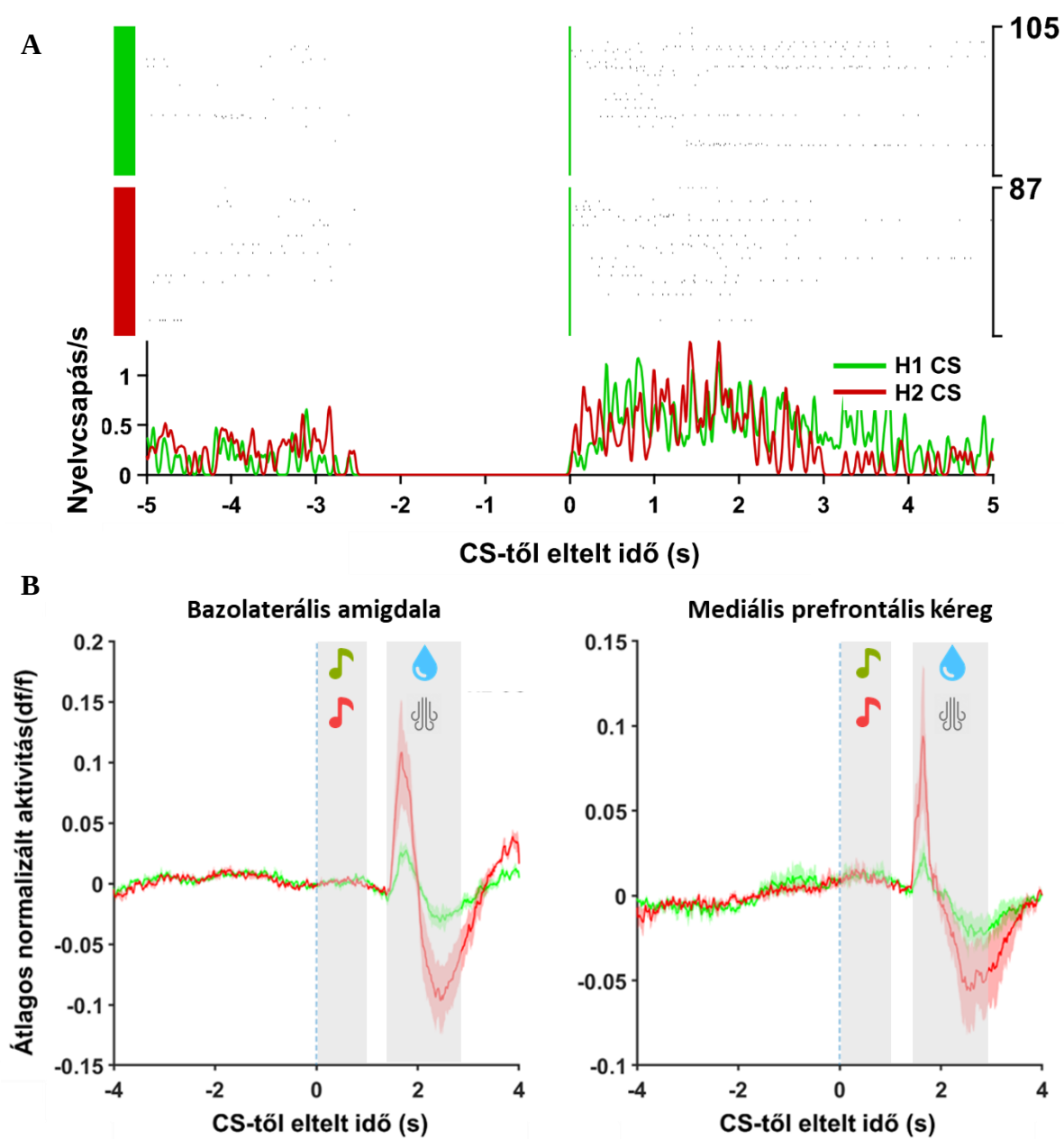


10. ábra (A) Egy 18 hónapos 3xTG kontroll állat napi teljesítménye.

(B) A két agyterületen mért átlagos normalizált aktivitás (df/f) a H1 és H2 CS megjelenésétől eltelt idő függvényében.

felszabadulást a H1 CS-re (10. ábra, B). Az AD állatoknál nem találtunk lényeges különbséget a két agyterület között (11. ábra, B).

Összehasonlítva a 18 hónapos ChAT-Cre állatok kolinerg aktivitásával (9. ábra, B) láthatjuk, hogy az AD állatokban nem detektáltunk semmilyen CS választ (11. ábra, B), míg természetes öregedésű ChAT-Cre állatainkban láthattunk gyenge ACh felszabadulást a H1-es jelre.



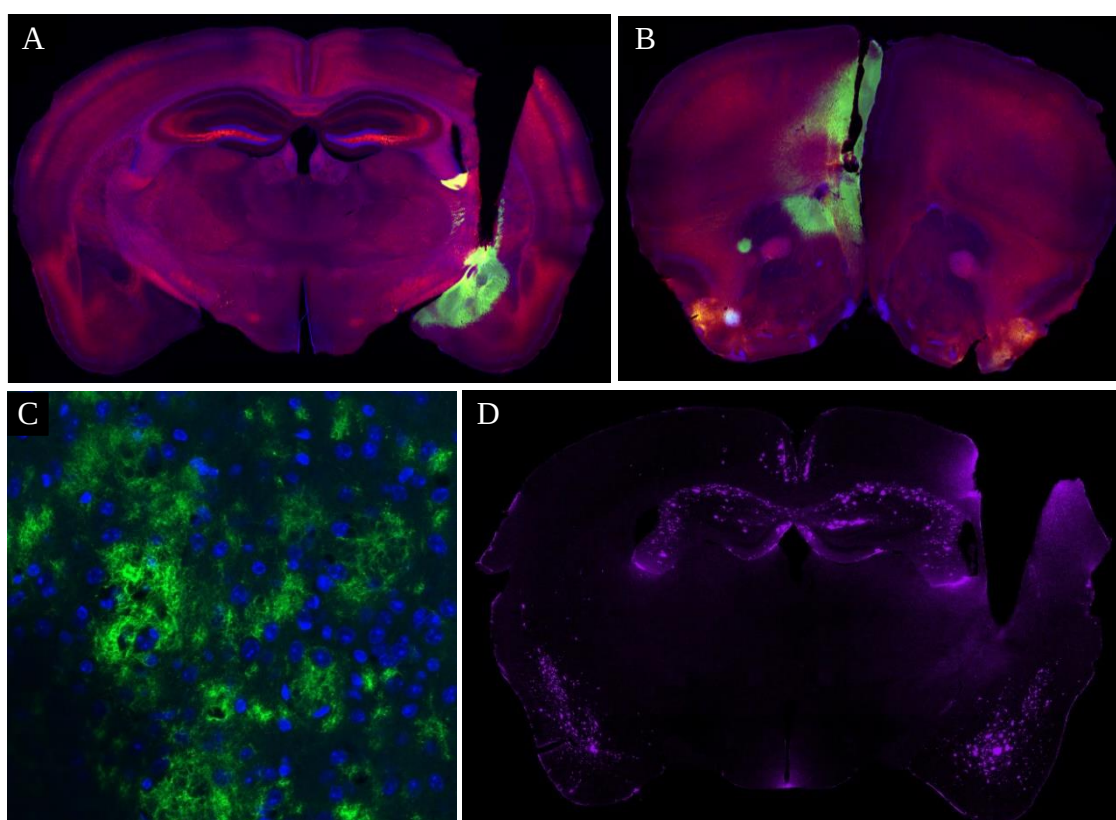
11. ábra (A) Egy 18 hónapos 3xTG-AD állat napi teljesítménye

(B) A két agyterületen mért átlagos normalizált aktivitás (df/f) a H1 és H2 CS megjelenésétől eltelt idő függvényében.

5.4. Hisztológia

A szenzor injektálásának, valamint az optikai szálak pozíciójának validálását hisztológiai felvételek készítésével végeztük. A 12.A és B ábrán 1-1 fluoreszcens felvételt láthatunk, amin jól látható az optikai szálak elhelyezkedése, valamint az ACh szenzor jelenléte a vizsgált területeken.

A 3xTG-AD állatainkban A β -antitesttel ellenőriztük az A β -plakkok meglétét (12. ábra, C), minden állat esetében. A plakkok száma a vártak megfelelően jelentős volt a kérgi területekben, a hippocampusban és a BLA környékén is (12. ábra, D).



12. ábra Fluoreszcens felvételek egy 12 hónapos Chat-Cre állatból (A) BLA-ból és (B) mPFC-ből. Jól látható az optikai szál elhelyezkedése. **Zölddel (GFP)** a szenzor kifejeződését, **kékkel (DAPI)** a sejtmagokat, **pirossal** (160 kDa neurofilament medium) a neurofilamentumokat jelöltük. (C-D) 18 éves AD állat fluoreszcens felvételei (C) **GFP**-vel az A β plakkok jelölődése, **kékkel** a sejtmagok DAPI festése látható (D) Ugyanebben az állatban **magentával** színeztük az A β plakkokat.

6. DISZKUSSZIÓ

Összefoglalva, dolgozatomban leírt kísérleteink alátámasztják, hogy a BFCNs ACh kibocsátás révén részt vesznek a tanulási folyamatok szabályozásában. Kísérleteink során a BF kolinerg rendszerét vizsgáltuk elektrofiziológiával 1-1 sejt szintjén HDB-ben, optogenetikai manipulációs vizsgálatainkban ugyanitt populációs szinten gátoltuk a kolinerg sejteket ezzel befolyásolva a tanulási folyamatot, valamint száloptikás duális fotometriával, szimultán mértük az HDB két vetítési területét a BLA-t és az mPFC-t, melyek a szakirodalom szerint meghatározóak a tanulási folyamatokban.⁸

Az HDB-ben végzett elektrofiziológiai méréseink során azt a felfedezést tettük, hogy fiatal állatok kolinerg sejtjei a pavlovi asszociációs feladat elsajátítása után aktivitásnövekedéssel válaszolnak a H1 CS-re, azonban H2-re nem. A kolinerg aktivitás mindkét US megérkezésekor is megnőtt. A viselkedést tekintve a fiatal állatok jobban diszkrimináltak a két hang között, és nagyobb aktivitást mutattak a feladat során, mint az idős egerek. Az idős állatoknál nem tapasztaltunk megnövekedett kolinerg aktivitást egyik CS-t követően sem, azonban az US-re ebben az esetben is nőtt a sejtek tüzelése. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az HDB kolinerg sejtjei részt vesznek a pavlovi kondicionálás során kialakuló CS-US asszociációban. A kolinerg CS válasz eltűnése az idős állatokban bizonyítékkal szolgál, hogy az életkorral megjelenő kognitív deficit összefügg a BFCNs megfelelő működésével.

Azok az állatok, melyekben az optogenetikával gátoltuk az HDB kolinerg neuronjait a CS bemutatása alatt, szignifikánsan gyengébb tanulási teljesítményt mutattak, mint a kontroll csoport. Ez is alátámasztja, hogy a BFCNs-ből felszabaduló ACh szükséges a CS-US asszociáció megfelelő elsajátításához pavlovi kondicionálás során.

Kétoldali szálfotometriával vezettünk el kolinerg ACh felszabadulás-függő fluoreszcens jelet a BF kolinerg terminálisaiból BLA-ban és mPFC-ben. A sejtek aktivitásnövekedéssel és ACh felszabadulással reagáltak a H1 CS-re, valamint mindkét US-re, azonban H2 CS-t itt sem követte aktivitás növekedés. A 3-6 és a 12 hónapos állatok viselkedése és a kolinerg sejtjeik aktivitása nagyon hasonló volt, azonban 18 hónapos ChAT-Cre és 3xTG állatok nem tudták elsajátítani a feladatot és nem alakult ki a fiatalabbakra jellemző H1 CS-re érkező ACh felszabadulás, mely CS-US asszociáció kialakulásával függ össze.

Az elért eredményeink is alátámasztják azt a hipotézist, miszerint a BF szerepet játszik a tanulásban, és a kor előrehaladtával, valamint a kolinerg sejtek nem megfelelő működése esetén a teljesítmény jelentős romlást mutat. Ennek a folyamatnak a pontos megértése

elvezethet oda, hogy közelebb kerüljünk az AD és különböző demenciák gyógyításához, és ezzel hozzájáruljunk az elöregedő társadalom okozta problémák mérsékléséhez.

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Hangya Baláznak, aki lehetővé tette a kísérletek elvégzését, valamint szakmai javaslataival segítette dolgozatom elkészítését. Köszönöm témavezetőmnek Dr. Sergio Martínez Bellver-nek, aki megtanított a különböző technikákra és a sztereotaxiás műtetre. Köszönettel tartozom továbbá kollegáimnak Király Bálintnak, Dr. Szabó Írisznek és Schlingloff Dánielnek a kísérletekben és a statisztikai elemzésekben nyújtott rengeteg segítségért, valamint Lengyel Katalinnak a hisztológiai metszetek preparálásáért.

IRODALOMJEGYZÉK

1. United Nations. World Population Ageing 2019. World Population Ageing 2019 Highlights (2019). doi:10.18356/9df3caed-en.
2. prince, martin. World Alzheimer Report. (2015).
3. Everitt, B. J. & Robbins, T. W. Central cholinergic systems and cognition. *Annu. Rev. Psychol.* 48, 649–684 (1997).
4. Hangya, B., Ranade, S. P., Lorenc, M. & Kepecs, A. Central Cholinergic Neurons Are Rapidly Recruited by Reinforcement Feedback. *Cell* 162, 1155–1168 (2015).
5. Ballinger, E. C., Ananth, M., Talmage, D. A. & Role, L. W. Basal Forebrain Cholinergic Circuits and Signaling in Cognition and Cognitive Decline. *Neuron* 91, 1199–1218 (2016).
6. Pini, L. et al. Brain atrophy in Alzheimer’s Disease and aging. *Ageing Res. Rev.* 30, 25–48 (2016).
7. Schliebs, R. & Arendt, T. The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behav. Brain Res.* 221, 555–563 (2011).
8. Gordon, J. A. PFC-AMY Entrainment Fear. 33, 395–401 (2015).
9. Ährlund-Richter, S. et al. A whole-brain atlas of monosynaptic input targeting four different cell types in the medial prefrontal cortex of the mouse. *Nat. Neurosci.* 22, 657–668 (2019).
10. Kerbler, G. M. et al. Basal forebrain atrophy correlates with amyloid β burden in Alzheimer’s disease. *NeuroImage Clin.* 7, 105–113 (2015).
11. Haass, C. & Selkoe, D. J. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer’s amyloid β -peptide. 8, (2007).
12. Schliebs, R. Basal Forebrain Cholinergic Dysfunction in Alzheimer ’ s Disease – Interrelationship with b -amyloid , Inflammation and Neurotrophin Signaling. 30, 895–908 (2005).
13. Hampel, H. et al. The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer’s disease. *Brain* 141, 1917–1933 (2018).

14. Grothe, M., Heinsen, H. & Teipel, S. J. Atrophy of the cholinergic basal forebrain over the adult age range and in early stages of Alzheimer's disease. *Biol. Psychiatry* 71, 805–813 (2012).
15. Oddo, S. et al. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* 39, 409–421 (2003).
16. LaFerla, F. M. & Green, K. N. Animal models of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, (2012).
17. Billings, L. M., Oddo, S., Green, K. N., McGaugh, J. L. & LaFerla, F. M. Intraneuronal A β causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron* 45, 675–688 (2005).
18. Hegedüs, P., Velencei, A., Belval, C. H. de, Heckenast, J. & Hangya, B. Training protocol for probabilistic Pavlovian conditioning in mice using an open-source head-fixed setup. *STAR Protoc.* 2, (2021).
19. Solari, N., Sviatkó, K., Laszlovszky, T. & Hegedüs, P. Open Source Tools for Temporally Controlled Rodent Behavior Suitable for Electrophysiology and Optogenetic Manipulations. 12, 1–14 (2018).
20. Jing, M. et al. A genetically encoded fluorescent acetylcholine indicator for in vitro and in vivo studies. *Nat. Biotechnol.* 36, 726–737 (2018).
21. Perez-Lloret, S. & Barrantes, F. J. Deficits in cholinergic neurotransmission and their clinical correlates in Parkinson's disease. *npj Park. Dis.* 2, (2016).