

παρα
πολύ
ελλειπής η
εργασία
και δεν
την
βάλατε σε
ένα
γενικότερ
ο πλαίσιο-
Λείπουν
οι εικόνες
των
αποτελεσ
ματων,
αυτη την
μορφη
δεν
μπορει να
παρουσια
σται

Processing reliant on granule cells is essential for motor learning but dispensable for social preference and numerous other cerebellar-dependent behaviors

Joon-Hyuk Lee, Chong Guo, Shuting Wu, Aliya Norton, Soobin Seo, Zhiyi Yao & Wade G. Regehr

Επεξεργασία εξαρτώμενη από κοκκιώδη κύτταρα είναι σημαντική για κινητήρια μάθηση αλλά περιττή για κοινωνικές προτιμήσεις και άλλες συμπεριφορές εξαρτώμενες από την παρεγκεφαλίδα

Ομάδα 8: Αντάμ Ροσοσάνσκι & Θεοχάρης Καμπούρης

Περίληψη

Μηνύματα από τις βρυώδεις ίνες (MF - Mossy Fibers), που είναι νευροάξονες που οδηγούν στη παρεγκεφαλίδα, μετατρέπονται σε αποκρίσεις από τα κύτταρα πουρινιέ (PC - Purkinje Cells), που εκκρίνουν τον νευροδιαβιβαστή GABA, μέσω επεξεργασίας από τα κοκκιώδη κύτταρα (GC - Granule Cells). Η δυσλειτουργία της παρεγκεφαλίδας οδηγεί σε κινητήρια, μαθησιακά, συναισθηματικά και κοινωνικά προβλήματα που συνήθως οφείλονται σε αλλιωμένη σηματοδότηση από PC που προέρχεται από εσφαλμένη επεξεργασία των σημάτων από τις βρυώδεις ίνες, παρότι τα PC μπορούν να ενεργοποιηθούν ανεξάρτητα των GC. Για να εξακριβωθεί η συνεισφορά τους στις συμπεριφορές εξαρτώμενες από την παρεγκεφαλίδα, παρεμποδίστηκε είτε η σηματοδότηση των GC, αφήνοντας άθικτη των PC, είτε των PC αφήνοντας τα GC για να εξαλειφθεί η επιρροή τους. Πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε ποντίκια και των δυο φύλων και βρέθηκε ότι και τα δυο είδη κυττάρων είναι απαραίτητα για εκμαθημένο κλείσιμο των ματιών και μάθηση του αιθουσαίο-οφθαλμικού αντανakλαστικού (vestibulo-ocular reflex - VOR). Παρεμπόδιση της σηματοδότησης των PC αλλοιώνει το VOR, τις κοινωνικές συμπεριφορές, και προκαλεί άγχος, αλλά παρεμπόδιση των κοκκιωδών δεν είχε αυτό το αποτέλεσμα. Αυτό εδραιώνει πως σηματοδότηση από τα GC είναι απαραίτητη για κινητήρια μάθηση αλλά δεν επηρεάζει πολλές συμπεριφορές, όπως αυτές που είναι συσχετισμένες με τον αυτισμό. Αυτό σημαίνει ότι συμπεριφορές ανεξάρτητες των GC μπορούν να επιδιορθωθούν επαναφέροντας την φυσιολογική σηματοδότηση σε καθοδικές περιοχές της νευρικής οδού

Εισαγωγή

Ο φλοιός μετατρέπει τα MF ερεθίσματα σε PC σήματα μέσω του μονοπατιού MF-GC-PC και ενδιάμεσων κατασταλτικών νευρώνων. Αλλιωμένη σηματοδότηση των PC οδηγεί σε έλλειψη κινητήριας ικανότητας και μάθησης, και κοινωνικές συμπεριφορές που συσχετίζονται με τον αυτισμό, καθω και διάφορες άλλες παρεκκλίνουσες συμπεριφορές. Τα κύτταρα πουρκινιέ επηρεάζουν τις συμπεριφορές αυτές είτε μεταφέροντας τα σήματα του MF-GC-PC στους πυρήνες της παρεγκεφαλίδας (Cerebellar Nuclei - CbN) είτε ανεξάρτητα των GC, μέσω αυθόρμητης πυροδότησης, που προκαλεί συνεχή καταστολή των CbN, ή ενεργοποίησης από αναρριχητικές ίνες, που προκαλούν πολύπλοκες κορυφές (complex spikes) στη σηματοδότηση και ύστερα μια παύση στη πυροδότηση. Πριν γραφεί το άρθρο δεν ήταν γνωστό εάν τα PC επηρεάζουν αυτές τις συμπεριφορές μέσω GC ή ανεξαρτήτως αυτών. Η παρεμπόδιση της σηματοδότησης PC παρεμποδίζει τη μάθηση και στο εκπαιδευμένο κλείσιμο των ματιών και στο VOR, αλλά ο ρόλος των GC σε αυτό δεν ήταν γνωστός. Σύμφωνα με τα κλασικά μοντέλα τα GC είναι απαραίτητα για την κινητήρια μάθηση, και η μάθηση στη παρεγκεφαλίδα οφείλεται στη συναπτική πλαστικότητα μεταξύ GC και PC. Ωστόσο μια έρευνα βρήκε πως η αναστολή των GCs μονάχα καθυστερεί την μάθηση του εκπαιδευμένου κλείσιμου των ματιών, που σημαίνει ότι θα μπορούσε να συμβαίνει και ανεξάρτητα αυτών. Επίσης δεν ήταν γνωστός ο ρόλος των GC στο VOR. Ενώ αυξημένη διεγερτικότητα των GC δεν είχε αποτέλεσμα στην απομάθηση του αντανakλαστικού, μειωμένη σηματοδότηση την μείωσε. Ένα μειονέκτημα σε αυτές τις μελέτες ήταν πως δεν απενεργοποιούνταν πλήρως τα GC, κάτι που έχει βρεθεί πως είναι απαραίτητο για να αποκαλυφθεί η πλήρης τους επίδραση στη συμπεριφορά. Για παράδειγμα, μόνο πλήρης απενεργοποίηση των συνάψεων GC - PC, με knock out στα GC των καναλιών Cav2.1, Cav2.2 και Cav2.3, επηρέασε τον βηματισμό και την ισορροπία, χωρίς μεγάλες μορφολογικές

αλλαγές στη παρεγκεφαλίδα, δείχνοντας πως κάτι τέτοιο είναι απαραίτητο για την εξακρίβωση του ρόλου των GC στη κινητική μάθηση.

Μείωση της σηματοδότησης των PC οδηγεί επίσης σε κοινωνικές δυσκολίες και άλλα συμπτώματα που σχετίζονται με τον αυτισμό, αλλά δεν ήταν γνωστό αν σηματοδότηση των GC χρειάζεται για αυτές τις συμπεριφορές. Έχει γίνει η εικασία πως είναι απαραίτητα, καθώς σε άλλη έρευνα βρέθηκε πως διαγράφοντας το γονίδιο SCN2A στα GC, που σχετίζεται με τον αυτισμό, υπήρξαν παρόμοια προβλήματα στα οφθαλμικά αντανakλαστικά με αυτά που παρατηρούνται σε άτομα με αυτισμό, και διαταραχές στη νευρογένεση των GC προκαλούν συμπεριφορικά προβλήματα και σημαντικές αλλαγές στον φλοιό τη παρεγκεφαλίδας. Ωστόσο δεν ήταν γνωστό αν το εμπόδιο των συνάψεων στη 3η εβδομάδα της ανάπτυξης, όπως συμβαίνει στα Cre διαγονιδιακά ποντίκια που χρησιμοποιήθηκαν, έχει αυτά τα αποτελέσματα, και ο ρόλος των GC στη συμπεριφορά παρέμενε αντιλεγόμενος.

Για να βρεθεί οπότε ποιές συμπεριφορές βασίζονται ή όχι σε μηχανισμούς με GC, αποκλείστηκε τελείως η σηματοδότηση είτε των GC είτε των PC, κάνοντας knock out τα κανάλια Cav2.1, Cav2.2 και Cav2.3 στοχευμένα στα αντίστοιχα κύτταρα, χρησιμοποιώντας την Cre ρεκομπινάση, καθώς χρειάζεται για να βρεθεί ο συμπεριφορικός ρόλος των GC. Εάν χρησιμοποιούνταν οπτογενητικές ή χημιογενητικές παρότι θα προσέφεραν μεγαλύτερο έλεγχο στην στιγμή που θα γίνει το knockout, θα έμεναν κάποια υπολείμματα των σημάτων, και δε θα προσομοιάζονταν η μακροχρόνια έλλειψη σηματοδότησης σε τέτοιες παθήσεις. Βρέθηκε πως εμποδίζοντας σηματοδότηση και στα δύο είδη κυττάρων χάνεται το εκπαιδευμένο κλείσιμο των ματιών και η απομάθηση του VOR, αλλά βασικές συμπεριφορές όπως το VOR, συμπεριφορές που σχετίζονται με το άγχος και κοινωνικές συμπεριφορές επηρεάστηκαν μόνο μέσω PC και όχι GC. Επομένως ενώ η κινητήρια μάθηση περνάει επεξεργασία από GC, πολλές άλλες παρεγκεφαλικές συμπεριφορές δεν. Επιπλέον, από τα δύο είδη μόνο η παρεμβολή των PC αύξησε τον ρυθμό πυροδότησης των πυρήνων της παρεγκεφαλίδας. Αυτό σημαίνει πως συμπεριφορές που δεν χρειάζονται την πολύπλοκη επεξεργασία από τα GC θα μπορούσαν να επανέλθουν επαναφέροντας τον ρυθμό πυροδότησης σε περιοχές καθοδικά των νευρικών οδών τους.

Αποτελέσματα

Ο ρόλος της σηματοδότησης των κοκκιωδών κυττάρων στο εκπαιδευμένο κλείσιμο των ματιών

Έχει καθιερωθεί πως διαταραχή της σηματοδότησης των PC εμποδίζει την εκπαίδευση του κλείσιμου των ματιών, οπότε για να εξακριβωθεί ο ρόλος των GC χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια στα οποία έχει γίνει τριπλό knock out (TKO) στα κανάλια ασβεστίου των κυττάρων αυτών, χρησιμοποιώντας την cre ρεκομπινάση μαζί με τον υποκινητή της α6 υπομονάδας του GABAA υποδοχέα, που εκφράζεται στα κοκκιώδη κύτταρα, και εμποδίζει την απελευθέρωση του νευροδιαβιβαστή χωρίς να προκαλεί μεγάλες μορφολογικές αλλαγές. Χρησιμοποιήθηκαν 2 γραμμές cre με τον ίδιο υποκινητή, η GC α6 TKO και η GC GABRA6 TKO. Το εκπαιδευμένο κλείσιμο των ματιών περιλαμβάνει ένα ερέθισμα το οποίο προκαλεί το κλείσιμο των ματιών, που στη προκειμένη περίπτωση ήταν ένα φύσημα αέρα στο μάτι, και ένα ταυτόχρονο ερέθισμα το οποίο δεν το προκαλεί, που εδώ ήταν ένα λευκό LED. Σκοπός της πειραματικής διαδικασίας είναι, με συνεχή έκθεση και στα δυο ερεθίσματα, να προκαλέσει κλείσιμο των ματιών (conditioned response) χρησιμοποιώντας το LED, το οποίο φυσιολογικά δεν το προκαλεί. Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκε τεχνητή νοημοσύνη για να καθοριστεί πόσο έκλειναν τα μάτια και κατά την διάρκεια του πειράματος ως απόκριση στο LED. Τα ποντίκια περπατούσαν σε έναν μηχανοκίνητο διάδρομο σε ήπια ταχύτητα, για να προαχθεί

γρήγορη μάθηση. Παρότι τα GC TKO ποντίκια είχαν αταξία, μπόρεσαν να περπατήσουν στον διάδρομο, οπότε ελαχιστοποιήθηκαν οι διαφορές στην μάθηση από την διαφορά στην κίνηση μεταξύ των TKO ποντικίων και των control. Τα control στις 9 ημέρες που διήρκεσε το πείραμα έδειχναν προοδευτικά πιο έντονα και πιο συχνά conditioned responses στο LED, ενώ τα GC TKO ποντίκια δεν είχαν αυτές τις αποκρίσεις, ακόμη και μετά από μέρες εκπαίδευσης, με παρόμοια αποτελέσματα και στις δύο γραμμές Cre. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν πως διαταραχή στη σηματοδότηση των κοκκιωδών κυττάρων εμποδίζει την κινητήρια μάθηση στο τεστ του εκπαιδευμένου κλείσιμου των ματιών.

Ο ρόλος της σηματοδότησης των κοκκιωδών κυττάρων στην μάθηση VOR

Έγινε επίσης έλεγχος του εάν σηματοδότηση από τα GC επηρεάζει την μάθηση του VOR με μείωση λειτουργίας. Σε αυτό το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν πάλι μηχανοκίνητοι διάδρομοι για να παραμείνουν τα ποντίκια ξύπνια και σε εγρήγορση για μαθήματα που κρατούσαν αρκετή ώρα. Γινόταν μετρήσεις για 4 μέρες, πριν και μετά κάθε ένα από τα 6 ημερήσια μαθήματα. Στις μετρήσεις των αντισταθμιστικών κινήσεων των ματιών ως αποτέλεσμα της διέγερσης του αιθουσαίου συστήματος, γινόταν διέγερση του αιθουσαίου συστήματος στο σκοτάδι, με ποντίκια που το κεφάλι τους ήταν σταθεροποιημένο σε ένα περιστρεφόμενο τραπέζι το οποίο γυρνούσε $\pm 5^\circ$ σε συχνότητα 5 Hz. Κατά την εκπαίδευση, η ίδια κίνηση συνοδευόταν από οπτικό ερέθισμα, που ήταν κατακόρυφες μπάρες που κινούνταν σε ίδια φάση με το τραπέζι, όπου και τα δυο γυρνούσαν για $\pm 5^\circ$, $\pm 7.5^\circ$, $\pm 10^\circ$ και $\pm 10^\circ$ στις μέρες 1-4 αντίστοιχα. Τα control ποντίκια έμαθαν να μειώνουν τις αντισταθμιστικές κινήσεις των ματιών, επειδή οι αντισταθμίσεις που προκαλούνταν από την διέγερση του αιθουσαίου συστήματος δεν συμφωνούσαν με το οπτικό ερέθισμα, το οποίο περιστρεφόταν μαζί με το τραπέζι, κάνοντας την αντιστάθμιση να το προσπεράσει (για παράδειγμα περιστροφή του τραπεζιού κατά $+5^\circ$ αν οδηγούσε τα μάτια σε περιστροφή κατά -5° , δε θα συμφωνούσε με το οπτικό ερέθισμα, το οποίο είχε επίσης περιστεφεί κατά $+5^\circ$, κάνοντας τα μάτια να βρίσκονται 5° εκτός του στόχου). Τα GC TKO δεν εμφάνιζαν αλλαγή στην απόκριση του VOR. Στα PC TKO ποντίκια, στα οποία τα κανάλια Cav2.1, Cav2.2 και Cav2.3 απενεργοποιήθηκαν στα κύτταρα πουρκινιέ μέσω της Cre και του υποκινητή PCP2, επίσης δεν υπήρχε η εκμαθημένη απόκριση. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν πως διαταραχή στη σηματοδότηση είτε των GC είτε των PC εμποδίζει την απομάθηση του VOR

The influence of silencing granule cell or Purkinje cell synapses on OKR, VOR, and VVOR

Έχει διαπιστωθεί πως διαταραχές στην σήμανση των GC και PC οδηγούν σε παρόμοια προβλήματα στον βηματισμό, στον περιστρεφόμενο κύλινδρο, την δοκό ισορροπίας και την κινητήρια μάθηση στο εκπαιδευμένο κλείσιμο των ματιών και το VOR. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα για να εξακριβωθεί αν άλλες συμπεριφορές που βασίζονται στην παρεγκεφαλίδα επηρεάζονται με τον ίδιο τρόπο στα GC TKO και PC TKO ποντίκια. Στις δοκιμές του οπτικοκινητικού αντανάκλαστικού (OKR), ένα οπτικό ερέθισμα κινούταν αριστερά και δεξιά $\pm 5^\circ$ με τις δοκιμές να γίνονται στα 0.2, 0.5 και 1 Hz, και έγινε σύγκριση μεταξύ της γωνιακής ταχύτητας των ματιών και του ερεθίσματος. Όπως είχε βρεθεί στο παρελθόν, η απόδοση των ποντικίων στο τεστ είναι καλύτερη για μικρότερες συχνότητες του ερεθίσματος. Σε σύγκριση με τα control, είχαν μειωμένη απόδοση τα GC (α6) TKO και τα PC (PCP2) TKO ποντίκια στα 0,5 και 1 Hz, ενώ τα GC (GABRA6) TKO στα 1 Hz. Επομένως διαταραχές στην σήμανση των GC και PC οδηγούν σε παρόμοια προβλήματα με το OKR στα 0,5 και 1 Hz.

Στις συγκρίσεις των γωνιακών ταχυτήτων των ματιών στο VOR, με δοκιμές στα 0.2, 0.5 και 1 Hz και περιστροφή $\pm 5^\circ$ για ερεθισμό της αιθουσαίας συσκευής, βρέθηκε πως στα GC TKO ποντίκια οι ιδιότητες του VOR ήταν ίδιες με τα control, ενώ τα PC TKO είχαν αφύσικα

μεγάλες αποκρίσεις στα 0,5 και 1 Hz. Στα 0,2 Hz βρέθηκε επίσης μία παροδική ανώμαλη απόκριση στα PC TKO ποντίκια. Αυτά τα ευρήματα αποδεικνύουν ότι η διαταραχή της σηματοδότησης των GC και PC δεν επηρεάζει πάντα τις συμπεριφορές με τον ίδιο τρόπο. Στο πειραματικό πρωτόκολλο του οπτικά υποβοηθούμενου αιθουσαίο-οφθαλμικού αντανakλαστικού (visually enhanced vestibulo-ocular reflex - VVOR), γίνεται η προσθήκη ενός ακίνητου οπτικού ερεθίσματος, που στα control ποντίκια οδηγεί σε αντισταθμιστικές κινήσεις σχεδόν ίσες με την περιστροφή για όλες τις συχνότητες. Αυτό ίσχυε και για τα GC και PC TKO ποντίκια, που σημαίνει ότι για το VVOR δεν απαιτείται ο παρεγκεφαλικός φλοιός.

Επιρροές των GCs και PCs στην αυθόρμητη συμπεριφορά, μετακίνηση, και άγχος

Για την μελέτη της επίδρασης της σηματοδότησης των GC και PC σε αυθόρμητες συμπεριφορές, χρησιμοποιήθηκε η πλατφόρμα ανάλυση συμπεριφορών Motion Sequencing (MoSeq), που παρακολουθεί τις κινήσεις των ποντικών σε έναν κυκλικό χώρο και τις χαρακτηρίζει ως ξεχωριστές συμπεριφορικές “συλλαβές”, με την ικανότητα να διακρίνει και μικρές διαφορές στη συμπεριφορά των ποντικών μοντέλων. Μεταξύ των διαφόρων control γκρουπ βρέθηκαν μερικές μικρές διαφορές στη συμπεριφορά αλλά γενικά συμπεριφερόταν παρόμοια. Μεταξύ των GC και PC TKO ποντικών μερικές συμπεριφορές ήταν διαταραγμένες σε παρόμοιο βαθμό, όπως στο βηματισμό, τη δοκό ισορροπίας και τον περιστρεφόμενο κύλινδρο. Συγκεκριμένα ήταν συλλαβές που σχετίζονται με την αρχή και παύση της μετακίνησης, ενώ στα PC TKO ήταν διαταραγμένες και οι συλλαβές που έχουν να κάνουν με ταλάντευση όσο είναι ακίνητα και με την αρχή τη κίνησης. Πέραν αυτών, τα TKO ποντίκια είχαν διάφορα άλλα παρόμοια και διαφορετικά μοτίβα συλλαβών σε σχέση με τα control. Αν και η λειτουργική σημασία για αυτές τις διαφορές στη συμπεριφορά δεν είναι ξεκάθαρες, είναι σίγουρο πως η διαταραχή στη σηματοδότηση των GC και PC έχει επίδραση σε μερικές αυθόρμητες συμπεριφορές.

Στο τεστ του ανοιχτού πεδίου, μόνο τα PC TKO ποντίκια είχαν διαφορές στην απόσταση που ταξίδευαν (πιο μικρή) και ταξίδευαν πιο πολύ σε χαμηλές ταχύτητες (0–5 cm/s) και λιγότερο σε υψηλές (20–100 cm/s), ενώ τα GC TKO ποντίκια δεν έδειξαν διαφορές σε σχέση με τα control. Επίσης έγινε τεστ φωτός-σκότους για να μετρηθεί το άγχος των ποντικών, καθώς τα ποντίκια δεν τους αρέσει το έντονο φως, οπότε προτιμούν ένα σκοτεινό δωμάτιο σε σχέση με ένα φωτεινό. Το να περνούν λιγότερο χρόνο στο δωμάτιο με δυνατά φώτα θεωρείται ως μια αύξηση σε συμπεριφορά που μοιάζει με το άγχος. Σε αντίθεση με τα GC TKO ποντίκια, που πέρασαν παρόμοιο χρόνο με τα control στο φωτεινό δωμάτιο, τα PC TKO πέρασαν λιγότερο χρόνο. Μια από τις προκλήσεις στην ερμηνεία των συμπεριφορών αυτών ήταν πως τα TKO ποντίκια είχαν κινητήριες δυσκολίες, που θα μπορούσε να επηρεάσει έμμεσα την συμπεριφορά. Ωστόσο καθώς τα GC και PC ποντίκια είχαν τόσο δραστικές διαφορές στα τελευταία δύο πειράματα παρά τις παρόμοιες αποδόσεις στον βηματισμό και την δοκό ισορροπίας, το έλλειμμα των PC TKO στο τεστ φωτός-σκότους λογικά δεν παρατηρείται λόγω κινητικών ελλείψεων. Συνολικά, η σηματοδότηση των GC και PC επηρεάζει με διαφορετικούς τρόπους διαφορετικές συμπεριφορές, όπως VOR, αυθόρμητες συμπεριφορές, μετακίνηση και άγχος.

Η σηματοδότηση των κοκκιωδών κυττάρων δεν είναι απαραίτητη για κοινωνικές συμπεριφορές

Για τη διερεύνηση του αντίκτυπου της διατάραξης σηματοδότησης GC και PC σε κοινωνικές συμπεριφορές, χρησιμοποιήθηκε το τεστ τριών δωματίων, όπου συγκρίνεται ο χρόνος που περνάνε τα ποντίκια κοντά σε ένα νέο κοινωνικό ερέθισμα (ένα ποντίκι) με τον χρόνο που περνάνε κοντά σε ένα νέο αντικείμενο. Παρά τις κινητικές τους δυσκολίες, τα GC (α6) TKO

ποντίκια είχαν φυσιολογική κοινωνική προτίμηση, όπως και τα control, που σημαίνει πως προτιμούσαν να βρίσκονται κοντά στο κοινωνικό ερέθισμα. Το ίδιο ίσχυε και για τα GC (GABRA6) TKO ποντίκια, αν και περνούσαν πιο πολύ χρόνο στο μεσαίο θάλαμο. Τα PC (PCP2) TKO ποντίκια δεν έδειξαν κοινωνική προτίμηση, που παρατηρήθηκε και σε όσα επισκέφτηκαν κάθε θάλαμο τουλάχιστον μια φορά, που σημαίνει πως η συμπεριφορά οφείλεται σε κοινωνικές και όχι κινητικές ελλείψεις. Επιπλέον φάνηκε η ικανότητα της προσέγγισης μέσω σίγασης των συνάψεων να αποκαλύπτει κοινωνικές ελλείψεις, ενώ σε ποντίκια με μερική σίγαση της σηματοδότησης των PC εξαφανίζεται μονάχα η κοινωνική προτίμηση, με ολική σίγαση περνούσαν πολύ χρόνο ακίνητα κοντά στην άκρη της περίφραξης.

Για την περαιτέρω διερεύνηση της κοινωνικής προτίμησης στα GC (α6) TKO ποντίκια, πραγματοποιήθηκε οσφρητικό τεστ όπου μετρήθηκε ο χρόνος που μύριζαν ουδέτερες και κοινωνικές οσμές. Στο παρελθόν έχει φανεί ότι στοχεύοντας τα PC μέσω γενετικής τροποποίησης, μειώνεται η κοινωνική προτίμηση και εμποδίζεται η αναγνώριση των κοινωνικών οσμών. Τα GC (α6) TKO ποντίκια είχαν φυσιολογικούς χρόνους μυρίσματος, ενώ τα PC (PCP2) TKO είχαν σημαντικά μειωμένο χρόνο για τις κοινωνικές μυρωδιές και φυσιολογικό για τις ουδέτερες, όπως έχει φανεί για τα τελευταία και στο παρελθόν.

Μια πιθανή εξήγηση για την φυσιολογική κοινωνική συμπεριφορά στα GC (α6) TKO ποντίκια είναι η ατελής σίγαση των GC στο Crus I, ή άνω μηνοειδές λοβίο, που είναι η περιοχή του φλοιού της παρεγκεφαλίδας που εμπλέκεται σε κοινωνικές συμπεριφορές. Ενώ γνώριζαν πως έχουν αποσιωπηθεί όλες συνάψεις GC-PC στον σκώληκα της παρεγκεφαλίδας, υπάρχουν διάφορα είδη PC και GC σε διαφορετικές περιοχές. Για να ελεγχθεί αυτή η υπόθεση χρησιμοποιήθηκε ολοκύτταρη ηλεκτροφυσιολογία για να μετρηθεί το διεγερτικό προσυναπτικό δυναμικό (Excitatory Postsynaptic Current - EPSC) μεταξύ των GC και PC σε τομές της παρεγκεφαλίδας που περιέχουν Crus I από ενήλικα ποντίκια 8 εβδομάδων. Ενώ στα control ποντίκια μπόρεσαν να προκληθούν EPSCs, δεν βρέθηκαν τέτοιες αποκρίσεις στα GC (α6) TKO. Επιπλέον, χρησιμοποίησαν πολλαπλά συνεχόμενα ερεθίσματα για να προκαλέσουν παρατεταμένη απόκριση στα control, η οποία δεν ανιχνεύτηκε στα GC (α6) TKO [τα GC (GABRA6) TKO παρουσίασαν τα ίδια αποτελέσματα με τα GC (α6) TKO]. Επομένως οι άθικτες κοινωνικές συμπεριφορές δεν οφείλονται σε συνάψεις που παραμένουν στο Crus I.

Έχοντας επιβεβαιώσει πως η σηματοδότηση των GC έχει εξαλειφθεί στο Crus I, έγινε έλεγχος αν η παρεμβολή στα GC επηρεάζει ανεξάρτητες από αυτά λειτουργίες στα PC, συγκεκριμένα την αυθόρμητη τους πυροδότηση, μετρώντας απλές κορυφές σε κατάσταση ηρεμίας, και την εμφάνιση περίπλοκων κορυφών στο Crus I. Οι απλές κορυφές είναι δυναμικά δράση νατρίου που υπάρχουν σε μεγάλη συχνότητα και οι περίπλοκες κορυφές προκύπτουν από τον ελαιοειδή πυρήνα και επάγουν τις αναρριχητικές ίνες. Κανένα από τα δύο δεν ήταν αφύσικα στα GC (α6) TKO ποντίκια, ούτε η παραλλακτικότητα, ούτε η συχνότητα, ούτε η παύση που ακολουθεί τις περίπλοκες κορυφές. Αυτό σημαίνει ότι δεν επηρεάζονται αυτές οι λειτουργίες από την πυροδότηση των GCs ούτε υπάρχουν αλλαγές που αντισταθμίζουν την έλλειψη σηματοδότησης τους.

Αυθόρμητη πυροδότηση στους πυρήνες της παρεγκεφαλίδας βάθους ρυθμίζεται από PCs αλλά όχι GCs

Οι νευρώνες στους πυρήνες της παρεγκεφαλίδας πυροδοτούνται αυθόρμητα, και αλλαγές στις πυροδοτήσεις τους έχουν συσχετιστεί με κοινωνικές ελλείψεις, και έχουν παρατηρηθεί σε αταξικά ποντίκια. Οπότε είναι πιθανό πως η αποσιώπηση συνάψεων PC ή GC μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετικές πυροδοτήσεις που οδηγούν τα PC TKO και GC TKO ποντίκια να

συμπεριφέρονται αλλιώς. Ενώ είναι πιθανό πως η αφαίρεση της αναστολής από τα PC θα αυξήσει τον ρυθμό πυροδότησης τους, θα μπορούσαν να συμβαίνουν μακροχρόνιες προσαρμογές για να αντισταθμιστεί. Σε άγριου τύπου ποντίκια υπάρχει μεγάλο εύρος στους ρυθμούς πυροδότησης των νευρώνων των CbN, και στα GC TKO ήταν παρόμοιοι, αλλά βρέθηκε με μικρή αλλά σημαντική αύξηση στη μεταβλητότητα της πυροδότησης. Στα PC TKO υπήρχε μεγάλη αύξηση στο ρυθμό πυροδότησης αλλά μειωμένη παραλακτικότητα. Οπότε τα PCs και GCs έχουν διαφορετικές επιδράσεις στον ρυθμό πυροδότησης στους CbN, που μπορεί να συνεισφέρουν σε διαφορές στη συμπεριφορά των GC TKO και PC TKO ποντικών.

Συζήτηση

Η σύγκριση της συμπεριφοράς μετά από απαλοιφή σηματοδότησης GC και PC αποδεικνύει ότι η παρεγκεφαλίδα ελέγχει συμπεριφορές μέσω κοκκιωδο-εξαρτόμενων και κοκκιωδο-ανεξάρτητων μηχανισμών. Και οι δυο μηχανισμοί είναι απαραίτητοι για κινητήρια μάθηση, το OKR, βάδισμα, ισορροπία και αυθόρμητες συμπεριφορές ενώ ο δεύτερος για VOR, κίνηση, κάποιες αυθόρμητες συμπεριφορές, κοινωνικές προτιμήσεις και φυσιολογικά επίπεδα άγχους. Απαλοιφή σηματοδότησης πουρκινιέ αλλάζει τον ρυθμό πυροδότησης πυρήνων της παρεγκεφαλίδας ενώ των GC όχι, για αυτό η πυροδότηση των πυρήνων μπορεί να διορθωθεί χωρίς επέμβαση στα κοκκιώδη.

Οι συμπεριφορικές επιρροές των PCs

Αποσιώπηση των PC στα τριπλά knock-out ποντίκια συνδέθηκε με την έλλειψη σηματοδότησης τους και θεωρείται ότι έχει μεγαλύτερο αντίκτυπο από ότι εν μέρη καταστολή. Άλλες μελέτες δεν είχαν σχεδιαστεί για να αποσιωπήσουν τελείως τα PC. Αρκετές μελέτες έχουν εξακριβώσει τι συμπεριφορές εμφανίζονται με την στοχοποίηση γονιδίων των PC που σχετίζονται με κινητικά σύνδρομα και τον αυτισμός και εδραίωσαν την σημαντικότητα που έχουν τα κύτταρα για την κίνηση και κοινωνικοποίηση. Ωστόσο, αυτά θα μπορούσαν να προκύπτουν από μειωμένη σηματοδότηση ή λανθασμένη πυροδότηση των PC.

Είναι γνωστό ότι τα PC είναι σημαντικά για το εκπαιδευμένο κλείσιμο των ματιών αλλά αμφιλεγόμενο αν σχετίζεται με το VOR. Μελέτες έχουν δείξει ότι προκαλώντας λανθασμένη πυροδότηση των PC δυσκολευόταν η απομάθηση του VOR ενώ μια άλλη ισχυρίστηκε ότι η εκμάθηση του αντανakλαστικού ήταν μηδαμινή. Τα αποτελέσματα των ερευνητών έδειξαν ότι η απαλοιφή την σηματοδότησης των πουρκινιέ οδηγούσε και σε ανικανότητα απομάθησης και ότι αυτό δεν ήταν πιθανό να είχε προκληθεί από παράπλευρη έκφραση cre εφόσον τα TKO ποντίκια είχαν φυσιολογικό VVOR.

Τα τριπλά knock-out πουρκινιέ κυττάρων ποντίκια μεγάλη μείωση εκμάθησης του OKR και ακόμα μεγαλύτερη αύξηση εκμάθησης του VOR αλλά αμετάβλητο VVOR. Αυτά τα ευρήματα συνάδουν με προηγούμενη μελέτη που έκανε ένεση αγωνιστή GABA(A)-υποδοχέα στην μαϊμού flocculus και βρήκε μείωση του OKR με μικρή επιρροή στο VVOR.

Κοινωνικές προσεγγίσεις και αποκρίσεις σε οσμές μειώθηκαν πολύ στα TKO ποντίκια όπως και σε προηγούμενες μελέτες που τα PC είχαν τροποποιηθεί. Αυτά τα ελλείμματα δεν είναι πιθανό να είναι δευτερεύοντα στα κινητήρια διότι τα τριπλά knock-out GC ποντίκια είχαν διατηρήσει την κοινωνικότητα τους παρά τα κινητικά προβλήματα ενώ τα TKO πουρκινιέ δεν έδειξαν προτίμηση για κοινωνικότητα έναντι νέων αντικειμένων ούτε διερευνούσαν νέες μυρωδιές ποντικών. Επιπλέον, ξόδευαν μεγάλες περιόδους ακίνητα δίπλα σε τοίχο ενώ τα TKO κοκκιωδών που είχαν αταξία δεν παρουσίαζαν τέτοια συμπεριφορά. Το άγχος επίσης αυξάνεται με οπτογενετική επαγωγή του μοριώδης στιβάδας των ενδιάμεσων νευρώνων του

έβδομου λοβιδίου του φλοιού της παρεγκεφαλίδας ενώ αναστολή των πουρκινιέ στο δεξί άνω μηνοειδές λοβίο οδήγησε σε κοινωνικά ελλείμματα.

Απαλοιφή PC σηματοδότησης αυξάνει την συχνότητα πυροδότησης των CbN νευρώνων

Τα PC διεγείρονται 10-100 φορές το δευτερόλεπτο και πολλαπλά κύτταρα έχουν απολήξεις σε έναν νευρώνα πυρήνα παρεγκεφαλίδας και καταστέλεται σε μεγάλο βαθμό με δυνατά σήματα. Απουσία αυτής της καταστολής οδηγεί σε ισχυρές και συχνές πυροδοτήσεις ενώ στα ΤΚΟ πουρκινιέ ποντίκια υπάρχει πολύ μικρή αύξηση, που συνιστά μια αντιστάθμιση από τους πυρήνες μέσω πυροδότησης ανά δεκάδες δευτερόλεπτα και άλλων μηχανισμών σε βάθος χρόνου.

GCs είναι απαραίτητα για κινητήρια μάθηση

Απώλεια σηματοδότησης GC οδηγεί σε ανικανότητα εκπαίδευσης κλείσιμου ματιών και απομάθησης του VOR, που συμβαδίζει με την γνωστή πλαστικότητα της παρεγκεφαλίδας και πως η μάθηση προκύπτει από συνάψεις μεταξύ κοκκιωδών και πουρκινιέ κυττάρων. Τα τεστ του VOR και της εκπαίδευσης κλείσιμου ματιών έγιναν καθώς τα ποντίκια έτρεχαν σε διάδρομο ώστε να τα κρατήσουν ξύπνια για μεγαλύτερη διάρκεια και να διατηρηθεί η ίδια κινητικότητα για κάθε ποντίκι για να μην επηρεάσουν κινητικές ανεπάρκειες το πείραμα. Τα ποντίκια αγρίου τύπου παρουσιάζουν πρόοδο στο εκπαιδευμένο κλείσιμο των ματιών ενώ τα ΤΚΟ ποντίκια είτε κοκκιωδών είτε πουρκινιέ κυττάρων δεν εμφανίζουν καμία εκμάθηση ακόμα και μετά από εννέα μέρες, θεμελιώνοντας ότι η ανεπάρκεια μάθησης προκύπτει από εσφαλμένη επεξεργασία της παρεγκεφαλίδας.

Σε προηγούμενη έρευνα όπου εξέφρασαν τεχνητούς υποδοχείς που ενεργοποιούνται από προσχεδιασμένα φάρμακα (DREADDs) στα GC για να καταστείλουν την σηματοδότηση, το εκπαιδευμένο κλείσιμο των ματιών αργούσε να υιοθετηθεί από τα διαγονίδια και ειπώθηκε ότι κάποιος μηχανισμός των πυρήνων της παρεγκεφαλίδας αντιστάθμιζε την ανεπάρκεια. Ωστόσο αυτή η τεχνική αφήνει έως και 50% υπολειμματική λειτουργία των νευρώνων και άρα δεν θα μπορούσε να εξαλείψει την σηματοδότηση των GC. Εφόσον στα πειράματά τους οι ερευνητές είδαν πως το εκπαιδευμένο κλείσιμο των ματιών παύει να είναι εφικτό με την καταστροφή του σηματοδοτικού μονοπατιού και δεν παρατηρούν κανέναν παράπλευρο μηχανισμό, θεωρούν πιθανό ότι η μειωμένη σηματοδότηση καθιστά δυνατή το εκμαθευόμενο κλείσιμο των ματιών αν και αργοπορημένα. Παρομοίως για το VOR, παραλαγή του συμμεταφορέα K-Cl ή KO καναλιών ασβεστίου CaV2.1 σε GC οδηγεί σε ελαφρύτερη απομάθηση του αντανεκλαστικού αλλά και οι δύο μέθοδοι διατηρούν μεγάλο μέρος της σηματοδότησης διατηρημένο. Μια έρευνα βρήκε ότι KO του γονιδίου SCN2A για τασικά κανάλια νατρίου αρκούσε για να κάνει την απομάθηση αδύνατη για τα ποντίκια σε μια εικοσάλεπτη διαδικασία μάθησης, ωστόσο δεν διερεύνησε το ενδεχόμενο μακρύτερης διάρκειας εκπαίδευσης. KO του γονιδίου SHISA6 που κωδικοποιεί για μια ρυθμιστική υπομονάδα του AMPA υποδοχέα στα PC μείωσε το μετασυναπτικό δυναμικό δράσης σε συνάψεις κοκκιωδών-πουρκινιέ κυττάρων κατά τρεις φορές αλλά κατήργησε την δυνατότητα απομάθησης του VOR και την δυνατότητα εκπαιδευόμενου κλείσιμου ματιών. Ωστόσο οι συνάψεις των αναρριχητικών ινών με τα PC είναι πιθανό να έχουν τροποποιηθεί στα SHISA6 ποντίκια ενώ παίζουν σημαντικό ρόλο στην πλαστικότητα και μάθηση στην παρεγκεφαλίδα. Τέλος, ενώ η σηματοδότηση των GC δεν είναι απαραίτητη για την σωστή λειτουργία του VOR και VVOR, επιβάλλεται για το OKR, κάτι που δεν φάνηκε σε μελέτες όπου η σηματοδότηση μειώθηκε αλλά δεν απαλείφθηκε.

GCs δεν είναι απαραίτητα για κοινωνικές προτιμήσεις

Οι κοινωνικές προτιμήσεις και οι αποκρίσεις σε οσμές κοινωνικοποίησης παρέμειναν αναλλοίωτες σε ποντίκια TKO GC παρότι ήταν αταξικά. Οι ερευνητές έλεγξαν μήπως επικρατούσε σηματοδότηση στο άνω μηνοειδές λοβίο αλλά βρήκαν ότι ήταν κατεστραμμένη, άρα αυτή η συμπεριφορά δεν οφειλόταν στην διατήρηση της σηματοδότησης.

Τα αποτελέσματα είναι σημαντικά για την μελέτη με το SCN2A που είναι ένδειξη κινδύνου αυτισμού εφόσον συσχετίζεται με υπερευαίσθητες απόκρισης σε ερεθίσματα. Η παρουσία του SCN2A στα κοκκώδη κύτταρα παράλληλα με ετεροζυγώτες του γονιδιακού τύπου να παρουσιάζουν αυξημένο VOR πρότεινε ότι μειωμένη εκφραστικότητα του SCN2A μπορεί να ευθύνεται για τον αυτισμό. Τα αποτελέσματα των ερευνητών δείχνουν ότι απαλοιφή της σηματοδότησης των GC δεν οδηγεί σε κοινωνικά ελλείμματα και άρα θεωρούν ότι είναι σημαντικό να διερευνηθεί η συμπεριφορά των ποντικών με στοχευμένη ετερόζυγη απώλεια του SCN2A στα GC.

Αν και τα GC δεν είναι απαραίτητα για κοινωνικές συμπεριφορές, δεν σημαίνει ότι στο άνω μηνοειδές λοβίο δεν έχουν λειτουργικούς ρόλους. Όπως δεν είναι σημαντικά για το VOR αλλά είναι στην απομάθηση του, οι ερευνητές θεωρούν πιθανό τα κοκκώδη κύτταρα να επιτρέπουν στην παρεγκεφαλίδα να μαθαίνει καινούργιες κοινωνικές αποκρίσεις.

Διαφορετικά συμπεριφορικά αποτελέσματα από την απαλοιφή και αύξηση της σηματοδότησης GC

Απαλοιφή και υπερευαίσθητοποίηση των GC έχουν διαφορετικές επιπτώσεις. Ποντίκια KO για τη δ υπομονάδα GABA υποδοχέων δημιουργήθηκαν για να ελαττώσουν την ιδιοσυστατή αναστολή των GC που τα έκανε πιο ευαίσθητα. Ενώ η απαλοιφή επιρρέαζε την κινητήρια συμπεριφορά και μάθηση, δεν υπήρχε παρέκκλιση από το κανονικό με την υπερευαίσθητοποίηση. Επίσης τα TKO ποντίκια δεν είχαν υψωμένα επίπεδα άγχους ενώ τα GABAR δ KO ποντίκια ήταν αγχώδη. Επιπλέον δεν υπήρχαν κοινωνικές ανεπάρκειες στα TKO ποντίκια ενώ στα δεύτερα τα θηλυκά παρουσίαζαν διαφοροποιημένη συμπεριφορά. Οι διαφορές αυτές υποδηλώνουν τα επιπρόσθετα δεδομένα που μπορούν να συλλεχθούν με την καταστολή και την υπερενεργοποίηση της σηματοδότησης ενός κυτταρικού τύπου.

Σύγκριση συμπεριφορικής επιρροής από τα GCs και PCs

Η σύγκριση των επιπτώσεων που έχει η αποσιώπηση της σηματοδότησης των PC και GC στοιχειοθετεί ότι οι περισσότερες συμπεριφορές εξαρτώμενες από την παρεγκεφαλίδα εξαρτώνται από τον φλοιό της και ότι ένα μεγάλο ποσοστό δεν απαιτεί επεξεργασία από τα GC. Τα τεστ της ράβδου ισορροπίας, περιστρεφόμενου ραβδίου, βαδίσματος, OKR, συγκεκριμένων αυθόρμητων συμπεριφορών, μάθηση VOR και εκπαιδευμένου κλείσιμου ματιών δείχνουν ότι τα TKO PC και TKO GC ποντίκια είναι ελλειματικά σε αυτά και άρα αυτές οι συμπεριφορές βασίζονται σε μηχανισμούς εξαρτώμενους από τα GC και βασίζονται στον φλοιό της παρεγκεφαλίδας. Αντιθέτως, τα TKO GC ποντίκια δεν παρουσίασαν αρκετά από τα συμπτώματα των αντίστοιχων ποντικινιέ: δεν εμφάνισαν υπεραντίδραση του VOR, κάποιες αυθόρμητες συμπεριφορές παρέμειναν αναλλοίωτες, δεν ελλατώθηκε η απόσταση που διένευαν, δεν παρουσίαζαν αυξημένα επίπεδα άγχους και κοινωνικές συμπεριφορές και αποκρίσεις σε οσμές παρέμειναν το ίδιο. Αυτό αποδεικνύει ότι αυτές οι λειτουργίες εξαρτώνται από τον φλοιό της παρεγκεφαλίδας αλλά όχι από τα GC. Επιπλέον η διατήρηση του ίδιου βαθμού ανεπάρκειας σε τεστ ισορροπίας, περιστρεφόμενου ραβδίου και βαδίσματος μεταξύ TKO ποντίκια GC μέσω α6 και GABRA6 αποδεικνύει ότι δεν ευθύνονται παράπλευροι στόχοι της Cre για τα συμπτώματα. Ωστόσο, μερικές ελάχιστες διαφορές μεταξύ τα δύο στελέχη στην ανάλυση MoSeq προτείνει ότι διαφέρουν μεταξύ τους.

Είναι καθιερωμένο ότι συγκεκριμένες περιοχές του φλοιού της παρεγκεφαλίδας επηρεάζουν συγκεκριμένες συμπεριφορές και πολλοί θεωρούσαν ότι το κύκλωμα επαναλαμβάνεται σε όλο τον φλοιό και ότι διαφορετικές περιοχές ρυθμίζουν διαφορετικές περιοχές μέσω διαφορικής συνάψεων GC-PC για να μετατρέψουν το σήμα εισόδου από τις MF σε σήμα εξόδου από τα PC. Η διαφορά μεταξύ κινητικής ανεπάρκειας και αναλλοίωτης κοινωνικότητας αποδεικνύει ότι δεν επεξεργάζονται όλες οι συμπεριφορές εξαρτώμενες από την παρεγκεφαλίδα μέσω των συνάψεων κοκκιωδών- πουρκινιέ κυττάρων.

Αυτά τα ευρήματα είναι σημαντικά για τυχόν αποκατάσταση ανεπάρκειων λόγω δυσλειτουργίας της παρεγκεφαλίδας. Συμπεριφορές βασισμένες σε σηματοδότηση GC περιλαμβάνουν περίπλοκη και δυναμική πυροδότηση PC επαγόμενη από τα κοκκιώδη, καθιστώντας διόρθωση των συμπεριφορών δύσκολη. Αντιθέτως, υπερδραστητικότητα του VOR, αυξημένο άγχος και ελλείμματα κοινωνικών συμπεριφορών δεν περιλαμβάνουν κοκκιωδο-εξαρτώμενη επεξεργασία σύμφωνα με τα πειραματικά αποτελέσματα. Το πιο πιθανό είναι ότι σε ΤΚΟ PC ποντίκια, η έλλειψη αυθόρμητης πυροδότησης των πουρκινιέ κυττάρων οδηγεί σε αυτά τα συμπτώματα εφόσον προηγούμενη έρευνα απέδειξε ότι η μείωση αυτών των πυροδοτήσεων οδηγεί σε κοινωνικές ανεπάρκειες. Αυτό γίνεται επειδή η μείωση αποκαταστέλει του πυρήνες της παρεγκεφαλίδας και αυξάνει την συχνότητα του δυναμικού δράσης καθοδικά της νευρικής οδού. Επιδιόρθωση αυτών των συμπεριφορών θα μπορούσε να επιτευχθεί μέσω της καταστολής αυτών των περιοχών και αυτό παρατηρήθηκε προηγουμένως σε ποντίκια μοντέλα αυτισμού. Ποντίκια με κοινωνικές ανεπάρκειες λόγω μειωμένης πυροδότησης των PC στο άνω μηνοειδές λοβίδιο του παρεγκεφαλιδικού φλοιού εμφανίζουν αυξημένη συχνότητα δυναμικών δράσης στον (αντιπλευρικό) πρόσθιο μετωπιαίο λοβό και η αναστολή τους επιδιόρθωνε την συμπεριφορά τους. Αυτές οι μελέτες προτείνουν ότι ο αυτισμός μπορεί να θεραπευτεί ενισχύοντας την ενεργότητα των PC ή αναστέλοντας τις κατάλληλες περιοχές καθοδικά των νευρικών οδών τους. Τα αποτελέσματα των ερευνητών υποδεικνύουν ότι τέτοιες θεραπείες είναι εφικτές εφόσον οι κοινωνικές συμπεριφορές δεν υπόκεινται επεξεργασία από τα GC. Τα αποτελέσματα τους επίσης αναδεικνύουν ότι παρόμοιες προσεγγίσεις μπορούν να εφαρμοστούν σε ανεπάρκειες που δεν εξαρτώνται από την σηματοδότηση GC, όπως η υπερδραστητικότητα του VOR ή του αυξημένου άγχους.

Μέθοδοι

Ποντίκια

Φέρθηκαν στα ποντίκια σύμφωνα με τους κανονισμούς των NIH και IACUC και τα πρωτόκολλα εγκρίθηκαν από το Harvard Medical Area Standing Committee on Animals. Χρησιμοποιήθηκαν αρσενικά και θηλυκά ποντίκια από διαφορετικά στελέχη. Τα ποντίκια ζούσαν σε ομάδες 2-5 ατόμων σε 12ωρο κύκλο φωτός-σκοταδιού σε θερμοκρασία 22 °C με 50% υγρασία και σε ελεύθερη και συνεχή πρόσβαση σε φαγητό και νερό.

Έφτιαξαν ΤΚΟ ποντίκια με αλληλόμορφα των καναλιών ασβεστίου CaV2.1, CaV2.2 & CaV2.3 ενδιάμεσα LoxP για υπό συνθήκη απαλοιφή τους. Χρησιμοποιήθηκαν τα a6-cre & Gabra6-cre για τα GC και το Pcp2-cre για τα PC.

Συμπεριφορικά τεστ

Όλα τα τεστ κινητικών λειτουργιών έγιναν πάνω σε ποντίκια και των δύο φύλων με τον ερευνητή που τα διεξήγαγε να μην ξέρει το γενότυπο τους. Τα τεστ επίσης γινόντουσαν και σε διαφορετικές ηλικιακές ομάδες:

- 10-11 εβδομάδες => εκπαιδευμένο κλείσιμο ματιών
- 9-10 εβδομάδες => μάθηση VOR & τεστ OKR/VOR/VVOR

- 11-15 εβδομάδες => MoSeq τεστ
- 8-13 εβδομάδες => τεστ ανοιχτού πεδίου, φωτός-σκότους και τριών δωματίων
- 7-34 εβδομάδες => τεστ όσφρησης

Πριν τα τεστ ο ερευνητής χειριζόταν τα ποντίκια για 15 λεπτά για δύο μέρες και στην ημέρα του τεστ έβαλε το ποντίκι στο δωμάτιο του πειράματος για 30 λεπτά για να εξοικειωθεί. Οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν για το τεστ συμπεριφοράς καθαρίστηκαν με διάλυμα 70% αιθανόλης. Η μάθηση του αιθουσαίο-οφθαλμικού αντανakλαστικού και το εκπαιδευόμενο κλείσιμο των ματιών γινόντουσαν διαδοχικά στο ίδιο ποντίκι με τρεις μέρες διαφορά από την ολοκλήρωση του πρώτου. Άλλη ομάδα ποντικών συμμετείχαν σε συμπεριφορικά τεστ ανοιχτού πεδίου, φωτός-σκότους και τριών δωματίων με την αντίστοιχη σειρά και με διάστημα χρόνου δύο ωρών και μιας μέρας αντίστοιχα μεταξύ τους. Τα ποντίκια που συμμετείχαν στο τεστ τριών δωματίων πριν το τεστ όσφρησης και MoSeq δεν άρχισαν τα πειράματα αυτά μέχρι δύο εβδομάδες αφότου τελείωσαν τα συμπεριφορικά τεστ. Το διάστημα μεταξύ των δύο πειραμάτων ήταν τουλάχιστον μια εβδομάδα.

Τεστ εκπαιδευμένου κλείσιμου ματιών

Πριν το πείραμα, τα ποντίκια εμφυτεύτηκαν με στηρίγματα στο κεφάλι και τα άφησαν να αναρρώσουν για τουλάχιστον πέντε μέρες μετά το χειρουργείο. Έπειτα, μια μέρα πριν την εκπαίδευση κλείσιμου ματιών πέρασαν μια περίοδο απευαισθητοποίησης όπου το κεφάλι τους ακινητοποιήθηκε πάνω από έναν κινούμενο διάδρομο για να συνηθίσουν την συσκευή. Κατά την εκπαίδευση, ένα άσπρο LED που άνοιγε για μισό δευτερόλεπτο την φορά στο αριστερό μάτι χρησιμοποιήθηκε ως το εκπαιδευμένο ερέθισμα (Conditioned Stimulus - CS) που σταμάταγε ταυτόχρονα με το ανεκπαίδευτο ερέθισμα (Unconditioned Stimulus - US) το οποίο ήταν εκτόπιση αέρα στο δεξί μάτι για πέντε χιλιοστά του δευτερολέπτου. Εκατό δοκιμές χρήσης CS και US και δέκα μόνο CS διεξήχθησαν σε τυχαία σειρά σε ένα ποντίκι την ημέρα. Η περίοδος κάθε δοκιμής ήταν τυχαία ανάμεσα στα τέσσερα και δώδεκα δευτερόλεπτα και η εκπαίδευση διήρκεσε 8-9 μέρες. Κατά την διάρκεια των δοκιμών το δεξί μάτι βιντεοσκοπούταν από μια κάμερα υπέρυθρου φωτός και έναν μακροσκοπικό φακό. Για να χαρακτηριστεί το κλείσιμο των ματιών καταγράφηκαν οι θέσεις του άνω και κάτω βλεφάρου από τεχνητή νοημοσύνη και μετρήθηκε η κάθετη απόσταση μεταξύ τους. Η ένταση της εκπαιδευόμενης απόκρισης (Conditioned Response - CR amplitude) ορίστηκε ως η μέση τιμή κλείσιμου του ματιού μεταξύ 0,4 και 0,5 δευτερολέπτων μετά το άνοιγμα του LED και η πιθανότητα της εκπαιδευόμενης απόκρισης ορίστηκε ως το ποσοστό των γεγονότων που η ένταση του CR ξεπερνά το 50%. Οι αναλύσεις έγιναν με ειδικά διαμορφωμένο κώδικα.

Εκπαίδευση OKR/VVOR/ και VOR

Πριν το πείραμα έγινε εμφύτευση στηρίγματος στο κεφάλι των ποντικών και τα άφησαν να αναρρώσουν για τουλάχιστον πέντε μέρες. Κατά την διάρκεια του πειράματος τα ποντίκια στερεώθηκαν πάνω από έναν διάδρομο με το αριστερό τους μάτι στο κέντρο μιας ειδικής συσκευής VOR. Η συσκευή ήταν τελείως έγκλειστη για καλύτερο έλεγχο του φωτισμού και περιστρεφόταν με μηχανή, επιτρέποντας ερεθισμό του αιθουσαίου οργάνου με οριζόντια κίνηση. Ένα κυλινδρικό φύλλο χαρτί περιέβαλλε το ποντίκι σε απόσταση 25 εκατοστών από το αριστερό μάτι χρησιμοποιήθηκε για να εμφανίσει τα οπτικά ερεθίσματα από λείζερ. Τα ερεθίσματα ήταν ράβδοι 3 μοιρών πάχους και είχαν απόσταση 7 μοίρες και ταλαντώνονταν σε πλάτος ± 5 μοιρών. Το αριστερό μάτι βιντεοσκοπούταν από μια κάμερα υπέρυθρου φωτός μεγάλης ταχύτητας και μια I/O συσκευή χρησιμοποιήθηκε για να καταγράφει την περιστροφή της VOR συσκευής και για να ελέγχει την μηχανή περιστροφής, και όλο το σύστημα ελεγχόταν από ειδικό κώδικα. Υπέρυθρο LED συνδεδεμένο στην κάμερα χρησιμοποιήθηκε

για να δημιουργήσει αντανάκλαση στην κόρη του αριστερού ματιού και τοποθετήθηκε κάτω από αυτή. Μια μέρα πριν το πείραμα τα ποντίκια απευαισθητοποιήθηκαν από την συσκευή και όταν ήρθε η ώρα του πειράματος προστέθηκε πιλοκαρπίνη στο αριστερό μάτι για να περιοριστεί η διαστολή της κόρης για να καταγράφεται ακριβώς η κίνηση του ματιού.

Πριν την βιντεοσκόπηση του ματιού, φωτογράφησαν την κόρη κάθε ποντικίου με μία κάμερα που κινούνταν πάνω-κάτω σε πλάτος $\pm 10^\circ$ στον κάθετο άξονα της συσκευής για να υπολογιστεί η ακτίνα περιστροφής της κόρης (Radius of pupil rotation - R_p) που χρησιμοποιείται για την μετατροπή των θέσεων των πύξελ σε γωνιακή θέση του οφθαλμού. Οι τιμές R_p μετρήθηκαν σε τρεις διαφορετικές διαμέτρους της κόρης μέσω του τύπου $R_p = \Delta / \eta \mu(20^\circ)$ όπου Δ η απόσταση των πύξελ από το κέντρο της κόρης που καθορίζεται από την απόσταση του από την αντανάκλαση της κόρης σε φωτογραφίες που λήφθηκαν σε εύρος $\pm 10^\circ$. Έπειτα η γραμμή παλινδρόμησης R_p χαράχθηκε για να υπολογιστούν οι τιμές R_p για κάθε διάμετρο της κόρης. Η γωνιακή μετατόπιση του οφθαλμού μεταξύ δύο χρονικά διαστήματα υπολογίστηκε από $\eta \mu^{-1}[(P_{t1} - CRF_{t1}) - (P_{t2} - CRF_{t2}) / R_p]$ όπου P η θέση του κέντρου της κόρης, CRF η θέση της αντανάκλασης της και R_p η τιμή για την αντίστοιχη διάμετρο της κόρης από την γραμμή παλινδρόμησης.

Στο τεστ OKR βιντεοσκοπήθηκε το αριστερό μάτι παρουσία διαφορετικών οπτικών ερεθισμάτων με πλάτος $\pm 5^\circ$ χωρίς να περιστρέφεται η συσκευή. Στο VOR βιντεοσκοπήθηκε το μάτι σε απόλυτο σκοτάδι καθώς περιστρεφόταν η συσκευή σε διαφορετικές συχνότητες με πλάτος $\pm 5^\circ$. Το τεστ VVOR ήταν το ίδιο με το VOR αλλά υπήρχαν οπτικά ερεθίσματα. Στην εκπαίδευση VOR την πρώτη μέρα τα οπτικά ερεθίσματα περιστρεφόντουσαν σε φάση με την συσκευή σε πλάτος $\pm 5^\circ$ και για τα δύο. Στις μέρες 2-4 τα ερεθίσματα περιστρεφόντουσαν σε φάση με την συσκευή αλλά σε πλάτος $\pm 7,5-10^\circ$ ενώ η συσκευή είχε πλάτος $\pm 5^\circ$. Κάθε μέρα εκπαίδευσης περιλάμβανε 6 περιστάσεις εκπαίδευσης VOR 10 λεπτών και 7 VOR τεστ που διεξαγόντουσαν πριν, ενδιάμεσα και μετά κάθε γύρο εκπαίδευσης για να καταγράψουν την επίδραση που έχει η εκπαίδευση στα τεστ. Στην εκπαίδευση VOR τα οπτικά ερεθίσματα και η περιστροφή της συσκευής έχουν 0,5 Hz όπως και η περιστροφή της συσκευής στα VOR τεστ.

Στα βίντεο που καταγράφηκαν το κέντρο της κόρης προσδιορίστηκε από τεχνητή νοημοσύνη. Αφότου μετατράπηκε η πύξελ ταχύτητα της κόρης σε γωνιακή ταχύτητα, ένα κατώφλι δύο φορές της συχνότητας του ερεθίσματος ορίστηκε που εάν ξεπεραστεί οδηγεί σε απόρριψη του δεδομένου. Στοιχεία που υπερβαίνουν $40^\circ/s$ αφαιρέθηκαν από μελλοντικές αναλύσεις για να απορριφθούν ταχείες κινήσεις των οφθαλμών, εκτός από τα TKO PC ποντίκια που το κατώφλι τους ήταν $60^\circ/s$ διότι οι αποκρίσεις τους σε ηρεμία ξεπερνούσαν τις $40^\circ/s$. Η τιμή της μάθησης υπολογίστηκε ως ο λόγος του πλάτους της γωνιακής ταχύτητας του ματιού προς την γωνιακή ταχύτητα είτε του ερεθίσματος είτε της συσκευής. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με δικό τους κώδικα.

Αλληλούχηση κινήσεων

Πραγματοποιήθηκε όπως σε προηγούμενες μελέτες χρησιμοποιώντας μη επιβλεπόμενη μηχανική μάθηση για να προσδιοριστεί ο αριθμός και το περιεχόμενο των "συλλαβών" που καθιστούν την συμπεριφορά του ποντικίου. Κάθε εικόνα του βίντεο ανατίθενται και μια συλλαβή που εκφράζεται εκείνη την στιγμή και συμπεριφορά άγριου τύπου από μεταλλαγμάτων διαφοροποιείται συγκρίνοντας συχνότητα έκφρασης κάθε συλλαβής στην διάρκεια. Έβγαζαν βίντεο κάθε ποντίκι για τρία μισάωρα κάθε τεστ χρησιμοποιώντας αισθητήρα βάθους καθώς αυτά περιφερόντουσαν σε κυκλικό ανοιχτό πεδίο και τα δεδομένα των τριποδιάστατων εικόνων κατατέθηκαν στο MoSeq pipeline.

Τεστ ανοιχτού πεδίου

Άφηναν ένα ποντίκι σε ένα ορθογωνικό θάλαμο να εξερευνήσει για δέκα λεπτά σε χαμηλό φωτισμό. Δικοί τους κώδικες κατέγραφαν τις κινήσεις του ποντικιού, πόση απόσταση διένυσε και τον χρόνο που ξόδεψε στην κεντρική ζώνη (4 πλαίσια ενώ το πάτωμα έχει χωριστεί σε 16 μέρη).

Τεστ φωτός-σκότους

Άφησαν ένα ποντίκι σε σκοτεινό θάλαμο που διασυνδέεται με μια πόρτα με ένα φωτιζόμενο θάλαμο και επέτρεψαν στο ποντίκι να εξερευνήσει τα δύο δωμάτια ελεύθερα για δέκα λεπτά. Οι κινήσεις του ποντικού καταγραφόντουσαν από κώδικα που είχαν φτιάξει και ανέλυαν τον λόγο του χρόνου διαμονής στο φωτεινό προς το σκοτεινό δωμάτιο.

Τεστ τριών δωματίων

Θάλαμος από διαφανές plexiglas με ανοιχτό το πάνω μέρος του χωρίστηκε σε τρεις περιοχές ίσου μεγέθους από δύο διαφανή τοιχώματα που είχαν μια πόρτα που επέτρεπε στα ποντίκια να περάσουν στο άλλο δωμάτιο το καθένα. Αρχικά, άφησαν τα ποντίκια για πέντε λεπτά στο κεντρικό δωμάτιο με κλειστές τις πόρτες για να μεγιστοποιηθεί η εξερεύνηση των άλλων δωματίων μόλις ανοίξουν. Μετά, οι πόρτες άνοιξαν και τα ποντίκια ήταν ελεύθερα να εξερευνήσουν τα τρία δωμάτια για δέκα λεπτά. Έπειτα, ένα ποτήρι με σύρμα που περιείχε ένα κοινωνικό ερέθισμα τοποθετήθηκε στα εκατέρωθεν δωμάτια του κεντρικού. Το ένα είχε ερέθισμα από ποντίκι 15-30 ημερών του ίδιου φύλου και το άλλο ένα καινούργιο αντικείμενο για το ποντίκι και η θέση τους εναλλάσσονταν για να μειωθεί η πιθανότητα ότι το ποντίκι έχει προτίμηση για μια πλευρά του θαλάμου από την άλλη. Αφότου τοποθετήθηκαν τα ερεθίσματα, το ποντίκι ήταν ελεύθερο να εξερευνήσει ξανά για δέκα λεπτά καθώς οι ερευνητές το παρατηρούσαν και ο χρόνος που ξόδευε σε κάθε δωμάτιο καταγραφόταν από ειδικά φτιαγμένο κώδικα.

Τεστ όσμησης

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε σκοτεινό περιβάλλον σε διαφανές θάλαμο με φωλιά όπου άφησαν τα ποντίκια για τριάντα λεπτά με ένα εφαρμοσμένο βαμβακερό άκρο να κρέμεται στο κέντρο λίγο πιο πάνω από το πάτωμα, χωρίς να έχουν προσθέσει μυρωδιά ακόμα, για να εξοικειωθούν. Πρόσθεταν 10μl οσμής στο βαμβάκι και το παρουσίαζαν στα ποντίκια τρεις φορές για δύο λεπτά η κάθε μια και άλλαζαν το βαμβάκι με ένα καινούργιο με την ίδια οσμή για κάθε μεταξύ των γύρων. Τα ποντίκια βιντεοσκοπίστηκαν με υπέρυθρη κάμερα και παρουσιάστηκαν δείγματα οσμών από νερό, καρύδα, ούρα του ίδιου φύλου και ούρα του αντίθετου. Το διάλυμα καρύδας αραιώθηκε κατά δέκα φορές από το αρχικό (McCormick, Inc.) και τα ούρα προήλθαν από ενήλικα ποντίκια τουλάχιστον επτά εβδομάδων. Στο βίντεο μετρήθηκαν οι αποκρίσεις των ποντικιών στην μυρωδιά από τον ερευνητή χωρίς αυτός να ξέρει τον γενότυπο του κάθε ποντικιού. Ως απόκριση ορίστηκε η στιγμή που το ποντίκι μύριζε το βαμβάκι με την μύτη του να είναι στραμμένη προς αυτό σε απόσταση τριών εκατοστών.

Καταγραφή in vivo

Ποντίκια 9-10 εβδομάδων προετοιμάστηκαν για in vivo καταγραφή με χορήγηση ισοφλουρανίου για αναισθησία και εμφύτευση ειδικά κατασκευασμένου στηρίγματος από τιτάνιο στο κεφάλι. Μια μικρή κρανιοτομή δημιουργήθηκε πάνω από το άνω μηννοειδές λοβίο για να επιτρέψει την καταγραφή του και των πυρήνων της παρεγκεφαλίδας. Το κρανίο πάνω

από το πρόσθιο τμήμα της παρεγκεφαλίδας παρέμεινε ακάλυπτο και σκεπάστηκε με πολυμερές σιλικόνης, το Kwik-Sil, μετά το χειρουργείο. Επέτρεψαν στα ποντίκια τουλάχιστον πέντε μέρες να αναρρώσουν και πριν την καταγραφή την ίδια μέρα κρατήθηκαν με το κεφάλι πάνω σε κυλινδρικό διάδρομο για τουλάχιστον τριάντα λεπτά για να προσαρμοστούν. Για την καταγραφή αφαίρεσαν το πολυμερές σιλικόνης και αισθητήρας από σιλικόνη βουτηγμένο σε Di-I (χρωστική για σήμανση κυττάρων) εισήχθει στο κρανίο σε γωνία είκοσι μοιρών από την κάθετο. Ο ανιχνευτής πέρασε από το άνω μηνοειδές λοβίο και έφτασε τους πλευρικούς πυρήνες της παρεγκεφαλίδας. Η καταγραφή έγινε με το ποντίκι σε ήρεμη και ακινητοποιημένη κατάσταση και τα δεδομένα συλλέχθηκαν στα 20 kHz και φιλτραρίστηκαν στα 0,1-8 kHz και τα PC χαρακτηρίστηκαν από τις περίπλοκες κορυφές. Μετά την ολοκλήρωση της καταγραφής διοχέτευσαν στα ποντίκια ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών σε αλατόνερο και παραφορμαλδεΰδη πριν γίνουν στεφανιαίες τομές του εγκεφάλου για να εξακριβώσουν ότι έγινε καταγραφή των σωστών περιοχών.

Προετοιμασία τομών για ηλεκτροφυσιολογία

Αρσενικά ποντίκια οκτώ εβδομάδων χρησιμοποιήθηκαν για τα in-vitro πειράματα φυσιολογίας. Χωρηγήθηκε κεταμίνη/ζυλαζίνη/ασεπρομαζίνη ως αναισθησία και μέσω της καρδιάς διοχέτευσαν ζεστό διάλυμα χολίνης-τεχνητού εγκεφαλονωτιαίου υγρού (Artificial Cerebrospinal Fluid - ACSF). Ο οπίσθιος εγκέφαλος αφαιρέθηκε για να προετοιμαστούν οι τοξοειδείς τομές της παρεγκεφαλίδας, την οποία έκοψαν στην μέση και τα δύο μισά και τοποθέτησαν με την κομμένη επιφάνεια πάνω στον θάλαμο τομής όπου κόπηκαν σε τοξοειδείς τομές σε ζεστό διάλυμα χολίνης-ACSF. Οι τομές μεταφέρθηκαν σε διάλυμα ACSF που διατηρούταν σε θερμοκρασία 34-35 °C για 10-12 λεπτά και μετά κρατήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά πριν αρχίσει η καταγραφή.

Καταγραφές ολόκληρων των κυττάρων πουρκινιέ έγιναν με γυάλινα βοριοπυριτικά ηλεκτρόδια στους 33 °C με γκαμπαζίνη στο διάλυμα για να κατασταλούν ανασταλτικά σήματα. Καταγραφές των πουρκινιέ στο άνω μηνοειδές λοβίο έγιναν με οπτική βοήθεια στα -65 mV. Δεδομένα ηλεκτροφυσιολογίας λήφθηκαν στα 20 kHz και φιλτραρίστηκαν στα 4kHz. Οι παράλληλες ίνες ενεργοποιήθηκαν μέσω γυάλινων ηλεκτρόδιων γεμάτα με ACSF που τοποθετήθηκαν στο μοριώδες στρώμα και πέρασε ένα ρεύμα σύντομης διάρκειας για μεμονωμένης επαγωγής στα 20 kHz για αλυσιδωτή επαγωγή των ινών. Για τα πειράματα μεμονωμένης επαγωγής ο μέσος όρος της απόκρισης κάθε κυττάρου πουρκινιέ λήφθηκε από 30 με 40 δοκιμές σε 3-4 περιοχές ενεργοποίησης.

Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε λογισμικό του εμπορίου και με ελεύθερα διαθέσιμη βιβλιοθήκη κώδικα python. Για όλες τις αναλύσεις διεξήχθησαν τεστ κανονικότητας για να επιλεχθούν οι κατάλληλες παραμετρικοί και μη παραμετρικές μέθοδοι. Τα επίπεδα σημαντικότητας καταγράφηκαν ως * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, και μη σημαντικό (not significant - ns). Καμία στατιστική μέθοδος δεν χρησιμοποιήθηκε για να καθορίσει το μέγεθος δειγματοληψίας. Στα box plots, το πάνω και κάτω μέρος κάθε πλαισίου αντιστοιχούσαν στο 75ο και 25ο εκατοστημόριο αντίστοιχα και το κάθετο μήκος του box αντιστοιχούσε στο διατεταρτημοριακό εύρος. Οι πάνω και κάτω γραμμές σφάλματος αναδείκνυαν τις πιο ακραίες τιμές μεταξύ 1,5 φορές το διατεταρτημοριακό εύρος από το 75ο και 25ο εκατοστημόριο αντίστοιχα.