

Mgr inż. Kamil Filip Tomaszewski

Podłoże neuronalne wygaszania pamięci strachu

Rozprawa doktorska
wykonana w Pracowni Molekularnych Podstaw Zachowania
Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego
PAN w Warszawie

PROMOTOR:
Prof. dr hab. Katarzyna Radwańska

Warszawa, 2023

Oświadczenie autora

Ja, niżej podpisana(-y) Kamil Filip Tomaszewski, wyrażam zgodę na przechowywanie i udostępnianie mojej pracy doktorskiej pt. „Podłoże neuronalne wygaszania pamięci strachu” przez Bibliotekę Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w formie drukowanej, w czytelni oraz w ramach wypożyczeń międzybibliotecznych, na zasadach dozwolonego użytku.

Jednocześnie udzielam Bibliotece Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN nieodpłatnej licencji niewyłącznej na korzystanie z w. w. pracy bez ograniczeń czasowych i terytorialnych na następujących polach eksploatacji:

- 1) umieszczenie treści pracy w formie pliku pdf wraz z metadanymi, w repozytorium cyfrowym RCIN (*Repozytorium Cyfrowe Instytutów Naukowych*, kolekcja: *Instytut Biologii Doświadczalnej PAN/ Prace dyplomowe*) znajdującym się pod adresem: <https://rcin.org.pl/dlibra/collectiondescription/121>
- 2) zwielokrotnienie utworu techniką cyfrową (digitalizacja pracy w przypadku konieczności zeskanowania wersji drukowanej)

Warszawa, dnia 08 czerwca 2023 r.

Podpis

.....

Spis treści

Spis treści.....	2
Streszczenie.....	6
Abstract.....	8
Wykaz skrótów.....	10
1. Wstęp.....	13
1.1. Teorie konsolidacji pamięci.....	13
1.1.1. Konsolidacja pamięci na poziomie synaptycznym.....	13
1.1.2. Systemowa konsolidacja pamięci.....	14
1.1.2.1. Klasyczna teoria konsolidacji pamięci.....	14
1.1.2.2. Teoria mnogich śladów pamięciowych.....	16
1.1.2.3. Podsumowanie.....	17
1.2. Wygaszanie pamięci strachu.....	18
1.4. Obwody neuronalne zaangażowane w wygaszanie wczesnej pamięci strachu..	22
1.5. Obwody neuronalne zaangażowane w wygaszanie późnej pamięci strachu.....	24
2. Cele pracy.....	27
3. Materiały i metody.....	28
3.1. Zwierzęta wykorzystane w doświadczeniach.....	28
3.2. Wektory wirusowe.....	28
3.2.1. Wektory AAV.....	28
3.2.2. Wektory AAV z ekspresją ładunku w systemie zależnym od rekombinazy Cre.....	29
3.3. Operacje stereotaktyczne.....	31
3.4. Warunkowanie i wygaszanie pamięci strachu zależnej od bodźców ogólnych...	32
3.5. Perfuzja przezsercowa.....	34
3.6. Immunofluorescencyjna detekcja białek na skrawkach mózgu.....	35
3.6.1. Białko c-Fos.....	35
3.6.2. Białka reporterowe mCherry i GFP.....	35
3.7. Obrazowanie i analiza zdjęć mikroskopowych.....	36
3.8. Analiza statystyczna.....	36

3.9. Wykorzystane programy graficzne.....	37
4. Wyniki.....	39
4.1. Wpływ autofosforylacji reszty treoninowej w pozycji 286 α CaMKII (T286- α CaMKII) na wygaszanie pamięci strachu.....	39
4.2. Mapowanie aktywności mózgu podczas wygaszania wczesnej i późnej pamięci strachu.....	41
4.3. Walidacja metody chemogenetycznego hamowania aktywności komórek nerwowych.....	51
4.3.1. Immunofluorescencyjna walidacja systemu DREADD i jego wpływu na hamowanie aktywności neuronów w myszach linii C57BL/6J.....	52
4.3.2. Ocena wpływu CNO na zachowanie zwierząt podczas treningu wygaszania pamięci strachu.....	54
4.4. Rola grzbietowego pola CA1 w wygaszaniu późnej pamięci strachu.....	56
4.5. Rola kory IL w wygaszaniu pamięci strachu.....	58
4.6. Rola MS w regulacji wygaszania pamięci strachu.....	61
4.7. Rola RE w regulacji wygaszania pamięci strachu.....	65
4.8. Rola projekcji RE→MS w regulacji wygaszania pamięci strachu.....	70
4.9. Rola V1 w regulacji wygaszania późnej pamięci strachu.....	74
5. Dyskusja.....	77
5.1. Autofosforylacja α CaMKII w pozycji 286 upośledza wygaszanie późnej pamięci strachu.....	77
5.2. Białko c-Fos jako marker plastyczności obszarów mózgu zaangażowanych w przetwarzanie pamięci.....	78
5.3. Chemogenetyczna regulacja aktywności neuronów.....	78
5.4. Obszary mózgu zaangażowane w wygaszanie wczesnej pamięci strachu.....	79
5.5. Obszary mózgu zaangażowane w wygaszanie późnej pamięci strachu.....	80
5.5.1. Udział wzgórza w wygaszaniu późnej pamięci strachu.....	80
5.5.2. Udział jądra łączącego w wygaszaniu pamięci strachu.....	82
5.5.3. Udział MS w wygaszaniu pamięci strachu.....	84
5.5.4. Udział projekcji RE→MS w wygaszaniu strachu.....	86
5.5.5. Udział wzroku i V1 w wygaszaniu pamięci strachu kontekstu.....	90
5.5.6. Udział CA1 w wygaszaniu pamięci strachu.....	91
5.5.7. Udział IL w wygaszaniu pamięci strachu.....	91

6. Podsumowanie i wnioski.....	92
7. Bibliografia.....	94
8. Suplement.....	113
9. Spis publikacji własnych.....	115



Praca doktorska została zrealizowana dzięki wsparciu finansowemu, uzyskanemu z NCN w ramach grantu PRELUDIUM nr 2019/35/N/NZ4/01910 oraz SONATA BIS nr 2012/05/E/NZ4/02996.

Streszczenie

Mechanizmy komórkowe związane z konsolidacją, wygaszaniem i upośledzeniem pamięci są od długiego czasu przedmiotem badań naukowych. Poznanie tych procesów jest kluczowe dla lepszego zrozumienia trwałej natury pamięci strachu oraz dla opracowania nowych terapii zaburzeń lękowych. Większość badań nad mechanizmami wygaszania pamięci strachu dotyczy wczesnej pamięci strachu (od kilku minut do kilku dni po warunkowaniu strachu). Jednocześnie, niewiele uwagi poświęcono do tej pory mechanizmom komórkowym leżącym u podłoża pamięci późnej (co najmniej kilka dni od warunkowania).

W niniejszej rozprawie przedstawiam wyniki badań dotyczących selektywnego upośledzenia wygaszania późnej pamięci strachu zależnej od kontekstu (otoczenia) u myszy, które wykazywały obniżony poziom autofosforylacji izoformy alfa kinazy zależnej od wapnia i kalmoduliny typu drugiego (α CaMKII) (T286A^{+/-}). W celu ustalenia obszarów mózgu zaangażowanych w ten proces, zastosowano analizę ekspresji białka c-Fos, które posłużyło jako wskaźnik neuroplastyczności, w 23 obszarach mózgu myszy. Obszary mózgu, w których zaobserwowano wyraźne różnice w aktywacji podczas wygaszania późnej pamięci strachu u myszy T286A^{+/-} i typu dzikiego (WT), zostały następnie poddane chemogenetycznemu hamowaniu aktywności za pomocą systemu DREADD (ang. *Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs*). Ponadto, przeprowadzono manipulacje aktywności projekcji neuronalnych pomiędzy jądrem łączącym wzgórza (RE) a jądrem przyśrodkowym przegrody (MS).

Uzyskane dane dowodzą, że zaburzona autofosforylacja α CaMKII u myszy T286A^{+/-} przyczynia się do upośledzenia wygaszania późnej, lecz nie wczesnej, pamięci strachu. Wzór ekspresji c-Fos w mózgu tych myszy podczas wygaszania późnej pamięci strachu różni się od wzorca u myszy WT. W szczególności, po treningu wygaszania pamięci późnej, zaobserwowano hiperaktywność RE, jądra przyśrodkowo-grzbietowego (MD) i środkowo-pośrodkowego (CM) wzgórza oraz pierwszorzędowej kory wzrokowej (V1) u myszy T286A^{+/-}.

Ponadto zaobserwowałem, że wygaszanie *późnej* pamięci strachu zależy od aktywności MS i RE. Chemogenetyczne zahamowanie tych struktur upośledza wygaszanie *późnej* pamięci strachu. Co ciekawe, zahamowanie RE w czasie wygaszania *wczesnej* pamięci przyspiesza wygaszanie, co ujawnia złożoną rolę tego obszaru mózgu w procesach

nabywania i konsolidacji wygaszania pamięci strachu, zaś zahamowanie MS w tym samym punkcie czasowym nie wpływa na proces wygaszania. Ponadto, selektywne zahamowanie neuronów glutaminianergicznycnych w RE za pomocą wektorów wirusowych kodujących DREADD pod promotorem α CaMKII wpływa na wygaszanie strachu w czasie sesji lecz nie ma wpływu na konsolidację pamięci wygaszania niezależnie od tego czy jest to pamięć wczesna czy późna. Dodatkowo, wykazałem, że chemogenetyczne zahamowanie projekcji z RE do MS (RE→MS) upośledza wygaszanie późnej, lecz nie wczesnej pamięci strachu.

Podsumowując, przeprowadzone przeze mnie doświadczenia wykazały udział α CaMKII w regulacji aktywności jąder wzgórza w czasie długotrwałej konsolidacji pamięci strachu. Ponadto wykazałem udział RE i MS, oraz projekcji RE→MS, w regulacji wygaszania późnej pamięci strachu.

Słowa kluczowe: wygaszanie strachu, wzgórze, przegroda, c-Fos, DREADD, obwody neuronalne

Abstract

Cellular mechanisms associated with memory consolidation, extinction, and its impairment have been the subject of scientific research for a long time. This is particularly important due to their clinical significance in patients with emotional disorders such as post-traumatic stress disorder (PTSD), anxiety, and phobias. Understanding the neurological correlates of these processes is crucial for a better understanding of the enduring nature of fear memory and the development of new therapies for anxiety disorders in humans. Most studies on fear memory extinction mechanisms focus on recent memory (from a few hours to several days after fear conditioning). At the same time, few studies have focused on late memory (e.g., several weeks after conditioning), although it is certainly more important in the context of long-term emotional disorders. Hence, the neuronal basis of remote fear memory extinction remains mostly unknown.

In this dissertation, I present the results of studies on selective impairment of late context-dependent fear memory extinction in mice with impaired autophosphorylation of the alpha isoform of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (α CaMKII) (T286A^{+/-}). To determine the brain regions involved in this process, the expression of the c-Fos protein, which serves as an indicator of neuroplasticity, was examined in 23 brain regions of the mice. Brain regions showing distinct differences in activation during remote fear memory extinction in T286A^{+/-} mice compared to wild-type (WT) mice were then subjected to chemogenetic inhibition using the Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs (DREADD) system. Additionally, similar manipulations were performed at the level of neuronal projections between the nucleus reuniens (RE) and the medial septum (MS).

The obtained data demonstrate that reduced autophosphorylation of α CaMKII in T286A^{+/-} mice impairs late, but not early, fear memory extinction. The c-Fos expression pattern in the brain of these mice during extinction differs from the pattern in WT mice, suggesting differences in the processes of acquisition and consolidation of remote fear memory extinction. Specifically, after late memory extinction training, hyperactivity was observed in the RE, central-medial (CM) and medio-dorsal (MD) thalamic nuclei and the primary visual cortex (V1) in T286A^{+/-} mice.

Furthermore, I observed that remote fear memory extinction depends on the activity of the MS and RE. Chemogenetic inhibition of these structures impairs remote fear memory extinction. Interestingly, inhibiting the RE during recent memory extinction accelerates extinction, revealing the complex role of this brain region in the processes of acquisition and

consolidation of fear memory extinction. In contrast, inhibiting the MS at the same time point does not affect the extinction process. Additionally, selective inhibition of glutamatergic neurons in the RE using viral vectors encoding DREADD under the α CaMKII promoter affects fear extinction during the session but has no impact on the consolidation of extinction memory, regardless of whether it is recent or remote memory. Moreover, I demonstrated that chemogenetic inhibition of the RE→MS projection impairs late, but not recent fear memory extinction.

In summary, the experiments I conducted revealed the involvement of α CaMKII in the regulation of thalamic activity during long-term consolidation of fear memory. Additionally, I demonstrated the involvement of the RE and MS, as well as the RE→MS projection, in the regulation of remote fear memory extinction.

Key words: fear extinction, thalamus, septum, c-Fos, DREADD, neuronal circuits

Wykaz skrótów

- ACC** (ang. *anterior cingulate cortex*) - przednia część kory obręczy zakrętu
- AD** (ang. *antero-dorsal thalamus*) - jądro przednio-grzbietowe
- AMPA** (ang. *α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*) kwas α-amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowy
- AP** (ang. *anterioposterior*) przednio-tylny
- AV** (ang. *antero-ventral thalamus*) - jądro przednio-brzuszne
- BDNF** (ang. *brain-derived neurotrophic factor*) - neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego
- BLA** (ang. *basolateral amygdala*) - jądro podstawno-boczna ciała migdałowatego
- c-Fos** - białko c-Fos
- c-fos** - gen kodujący białko c-Fos
- αCaMKII** (ang. *calcium and calmodulin-dependent kinase II, isoform alpha*) - kinaza kalmodulinowa zależna od wapnia typu drugiego, podjednostka alfa
- cAMP** (ang. *cyclic adenosine monophosphate*) - cykliczny adenozymonofosforan
- CeA** (ang. *central amygdala*) - jądro środkowe ciała migdałowatego
- CeC** (ang. *central amygdala, capsular part*) - część torebkowa jądra środkowego ciała migdałowatego
- CeL** (ang. *central amygdala, lateral part*) - część boczna jądra środkowego ciała migdałowatego
- CeM** (ang. *central amygdala, medial part*) - część przyśrodkowa jądra środkowego ciała migdałowatego
- CM** (ang. *central-medial thalamus*) - jądro środkowo-pośrodkowe wzgórza
- CNO** (ang. *clozapine-N-oxide*) - N-tlenek klozapiny
- CR** (ang. *conditioned response*) - reakcja warunkowa
- CS** (ang. *conditioned stimulus*) - bodziec warunkowy
- DAPI** (ang. *4',6-diamidino-2-phenylindole*) 4',6-diamidyno-2-fenylindol
- dCA1** (ang. *dorsal part of Cornu Ammonis field 1*) - Pole CA1 hipokampa
- dCA3** (ang. *dorsal part of Cornu Ammonis field 3*) - Pole CA3 hipokampa
- dDG** (ang. *dentate gyrus*) - zakręt zębaty
- DREADD** (ang. *Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs*) - zaprojektowane receptory wybiórczo aktywowane przez zaprojektowane związki
- DV** (ang. *dorsoventral*) grzbietowo-brzuszy
- ENT** (ang. *entorhinal cortex*) - kora śródwęchowa

GABA (ang. *γ-aminobutyric acid*) - kwas γ -aminomasłowy

hM3Dq (ang. *związany z białkiem Gq DREADD, based on human muscarinic type 3 receptor*) - ludzki, sprzężony z białkiem Gq DREADD, oparty o receptor muskarynowy typu trzeciego

hM4Di (ang. *związany z białkiem Gi DREADD, based on human muscarinic type 4 receptor*) - ludzki, sprzężony z białkiem Gi DREADD, oparty o receptor muskarynowy typu czwartego

hSyn (ang. *human synapsin gene*) - gen ludzkiej synapsyny

IEG (ang. *immediate early genes*) - geny odpowiedzi wczesnej

IL (ang. *infralimbic cortex*) - kora infralimbiczna

L-ITR (ang. *left inverted terminal repeat*) lewostronna sekwencja odwróconych powtórzeń końcowych

LA (ang. *lateral amygdala*) - jądro boczne ciała migdałowatego

LC (ang. *locus coeruleus*) - miejsce sinawe

LD (ang. *latero-dorsal thalamus*) - jądro boczno- grzbietowe

LS (ang. *lateral septum*) - jądro łączące boczne

LTD (ang. *long-term depression*) - długotrwałe osłabienie (synaptyczne)

LTP (ang. *long-term potentiation*) - długotrwałe wzmocnienie (synaptyczne)

mCherry (ang. *mCherry protein*) białko mCherry

MD (ang. *medio-dorsal thalamus*) - jądro przyśrodkowo-grzbietowe wzgórze

MeA (ang. *medial nucleus of the amygdala*) - przyśrodkowe jądro ciała migdałowatego

mGluR5 (ang. *metabotropic glutamate receptor 5*) - receptor metabotropowy dla glutaminianu typu piątego

mGluR7 (ang. *metabotropic glutamate receptor 7*) - receptor metabotropowy dla glutaminianu typu siódmegomigdałowatego

ML (ang. *medial-lateral*) przyśrodkowo-boczny

mPFC (ang. *medial-prefrontal cortex*) - przyśrodkowa kora przedczołowa

MS (ang. *medial septum*) - jądro łączące przyśrodkowe

MTT (ang. *multiple trace theory*) - teoria mnogich śladów

NDS (ang. *normal donkey serum*) roztwór surowicy oslej

NMDA - (ang. *N-methyl-d-aspartic acid or N-methyl-d-aspartate*) kwas N-metylo-D-asparaginowy

PBS (ang. *phosphate buffered saline*) - zbuforowany roztwór soli fizjologicznej

PBS (ang. *phosphate-buffered saline*) buforowana fosforanem sól fizjologiczna

PFA - (ang. *paraformaldehyde*) - paraformaldehyd

PrL (ang. *prelimbic cortex*) - kora prelimbiczna

PTSD (ang. *post-traumatic stress disorder*) - zespół stresu pourazowego

PV (ang. *paraventricular thalamus*) - jądro przykomorowe

R-ITR (ang. *right inverted terminal repeat*) prawostronna sekwencja sekwencja odwróconych powtórzeń końcowych

RE (ang. *nucleus reuniens of thalamus*) - jądro łączące wzgórza

RSA (ang. *retrosplenial cortex, agranular part*) - kora zapłatowa, część nieziarnista

RSC (ang. *retrosplenial cortex*) - kora zapłatowa

RSG (ang. *retrosplenial cortex, granular part*) - kora zapłatowa, część ziarnista

SC (ang. *superior colliculus*) - wzgórek górny

SR (ang. *spontaneous recovery*) - samoistne odnowienie (reakcji warunkowej)

T286A+/- (ang. *T286A heterozygous mice for α CaMKII*) myszy heterozygotyczne z substytucją treoniny na alaninę w pozycji 286 łańcucha aminokwasowego (α CaMKII)

TBS (ang. *Tris-buffered saline*) buforowana Trisem sól fizjologiczna

Thy1-EGFP (ang. *transgenic mice with enhanced green fluorescence protein controlled by regulatory element of Thy1.2 gene*) - mysz transgeniczna z ekspresją białka wzmocnionej zielonej fluorescencji kontrolowane przez sekwencję regulatorową genu *Thy1.2*

TRNrv (ang. *rostro-ventral part of thalamic reticular nucleus*) - przednio-brzusza część jądra siatkowatego wzgórza

US (ang. *unconditioned stimulus*) - bodziec bezwarunkowy

V1 (ang. *primary visual cortex*) - pierwszorzędowa kora wzrokowa

vIPAG (ang. *ventro-lateral*) - brzuszno-boczna część istoty szarej okołowodociągowej

VMHdm (ang. *ventro-medial hypothalamus, dorso-medial part*) - grzbietowo-przyśrodkowa części brzuszno-przyśrodkowego jądra podwzgórza

wektor AAV (ang. *Adeno-associated virus vector*) - wektor wirusowy związane z adenowirusami

WPRE (ang. *woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element*) posttranskrypcyjny element regulatorowy wirusa zapalenia wątroby świstaka

WT (ang. *wild type*) zwierzęta typu dzikiego

zif-268 - gen kodujący białko Zif268

1. Wstęp

1.1. Teorie konsolidacji pamięci

Do każdego organizmu nieustannie dociera ogromna liczba bodźców. Niektóre z tych bodźców wywołują reakcje bezwarunkowe (wrodzone), inne mogą stać się reakcjami warunkowanymi (wyuczonymi), wiele z bodźców też jest ignorowanych. Bodźce istotne z punktu widzenia organizmu tworzą ślad pamięciowy. Jest on kodowany w obwodach neuronalnych w procesie znanym jako konsolidacja pamięci [1–3]. Badacze tradycyjnie wyróżniają co najmniej trzy typy pamięci w zależności od czasu, który upłynął od oddziaływania istotnego bodźca na organizm. W okresie od kilku sekund do kilku minut mówimy o **pamięci roboczej**, od kilku godzin do kilku dni mówimy o **pamięci krótkotrwałej**¹. Ich podłożem są zmiany na poziomie synaptycznym, takie jak tworzenie nowych połączeń synaptycznych, czy przebudowa lub eliminacja już istniejących. **Pamięć długotrwałą** obejmująca znacznie dłuższy okres, tj. od dni do lat, związana jest ze zmianami obwodów neuronalnych, których natura jest ciągle słabo poznana.

Uważa się, że pamięć zależy od aktywności grup komórek [4–6]. Postuluje się również, że pamięć nie jest stałym zapisem doświadczenia (trwałą zmianą funkcji komórek), lecz ciągłym procesem, który pozwala na modyfikację istniejących wspomnień o nowe informacje poprzez proces aktualizacji pamięci [7].

1.1.1. Konsolidacja pamięci na poziomie synaptycznym

Plastyczność synaptyczna jest odpowiedzią adaptacyjną komórki nerwowej na bodźce zewnętrzne. Powszechnie uważa się, że stanowi ona podstawę konsolidacji pamięci [8]. W procesie tym uczestniczą kinazy i fosfatazy białkowe, odpowiedzialne za fosforylację i defosforylację białek zaangażowanych w transmisję synaptyczną, co w konsekwencji może prowadzić do wzmocnienia lub osłabienia przewodnictwa synaptycznego (ang. *long-term potentiation, LTP*, i *long-term depression, LTD*).

Utrwalenie zmian w przewodnictwie synaptycznym można podzielić na dwa etapy:

1) W początkowej fazie uczenia obserwuje się aktywację wtórnych przekaźników wewnątrzkomórkowych, tj. Ca^{2+} , cAMP (cyklicznego adenozyńmonofosforanu), czy tlenu azotu, które uruchamiają wiele procesów komórkowych. Należy do nich aktywacja kinaz

¹ Definicje te różnią się między szkołami naukowymi, a w szczególności między biologami molekularnymi, psychologami zwierząt i ludzi. Na użytek niniejszej rozprawy przyjmę jednak definicje podane powyżej - jeden dzień to pamięć wczesna lub krótkotrwała, zaś jeden miesiąc to pamięć późna lub długotrwała.

białkowych, tj. kinaza białkowa aktywowana przez mitogen (ang. *Mitogen-activated protein kinase, MAPK*), kinaza białkowa A (ang. *Protein kinase A, PKA*), kinaza typu drugiego zależna od jonów wapnia i kalmoduliny (α CaMKII). Następnie dochodzi do aktywacji czynników transkrypcyjnych, np. z rodziny CREB (ang. *cAMP response element binding protein*) lub czynnika AP-1 (ang. *Activator protein*, w tym c-Fos i Jun-B), które regulują ekspresję genów [9,10].

2) Zmiany w ekspresji genów zachodzą w jądrze komórkowym. Białka wyprodukowane w tym procesie modyfikują funkcję i morfologię synaps [11].

Jak pokazują liczne prace, α CaMKII jest niezbędna do utrzymania LTP w hipokampie, a więc jest białkiem kluczowym w procesie synaptycznej konsolidacji pamięci. W związku z powyższym α CaMKII sytuuje się jako szczególnie atrakcyjny cel dla badania procesów pamięciowych [12–17]. W szczególności Silva i wsp. (1992) pokazali, że u myszy z mutacją genu *Camk2a*, nie można wywołać LTP. Ponadto, heterozygoty z obniżoną ekspresją tej kinazy (α CaMKII^{+/-}) były zdolne skonsolidować wczesną strachu, lecz nie późną, pamięć strachu [17].

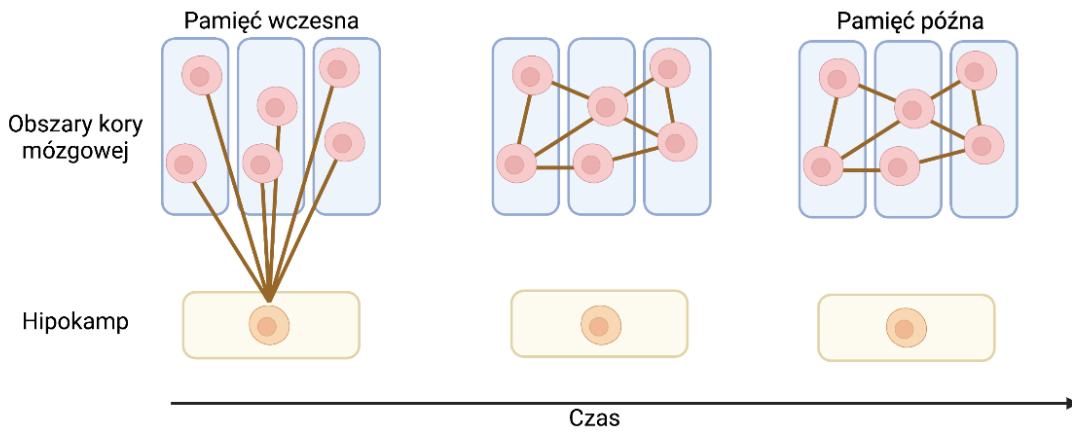
1.1.2. Systemowa konsolidacja pamięci

Na przestrzeni lat powstało kilka teorii tłumaczących w jaki sposób pamięć jest przetwarzana i przechowywana w mózgu [18–22]. Poniżej opiszę dwie wiodące koncepcje: klasyczną teorię konsolidacji pamięci oraz teorię mnogich śladów pamięciowych (ang. *Multiple Trace Theory, MTT*) [23–26]. Oba modele zobrazowane są na **Rycinie 1**.

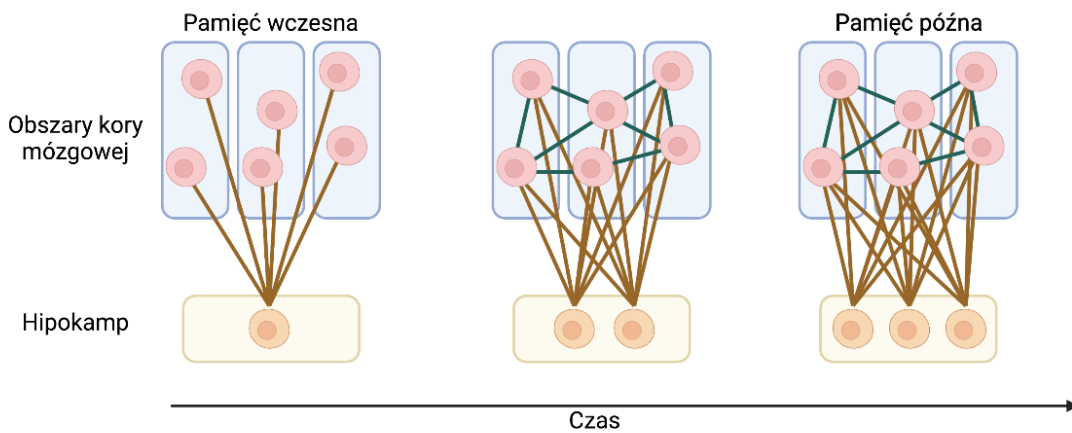
1.1.2.1. Klasyczna teoria konsolidacji pamięci

Zgodnie z założeniami klasycznej teorii konsolidacji pamięci, hipokamp pełni rolę tymczasowego, a obszary korowe stałego/długotrwałego, repozytorium informacji. Bodźce wielu modalności (wzrokowe, czuciowe, dźwiękowe itp.) docierające do osobnika, kodowane są równolegle w hipokampie i w wyspecjalizowanych obszarach korowych. Hipokamp przyjmuje rolę integratora informacji pochodzących z rozproszonych obszarów korowych, spajając je w pierwotny engram reprezentacji doświadczenia, stanowiący ślad pamięci wczesna [27,28]. Wielokrotna reaktywacja sieci neuronalnych kodujących ten ślad pamięciowy prowadzi do stopniowego wzmacniania zaangażowanych połączeń korowo-korowych. Z czasem obserwuje się uniezależnienie tych wspomnień od hipokampa i ich stopniową integrację w obwodach korowych, które tworzą ślad pamięci późna [24]. Pamięć późna odnosi się do zdarzeń i rzeczy z odległej przeszłości (> parę dni). Model ten zakłada zatem, że z czasem ślad pamięciowy zanika z hipokampa.

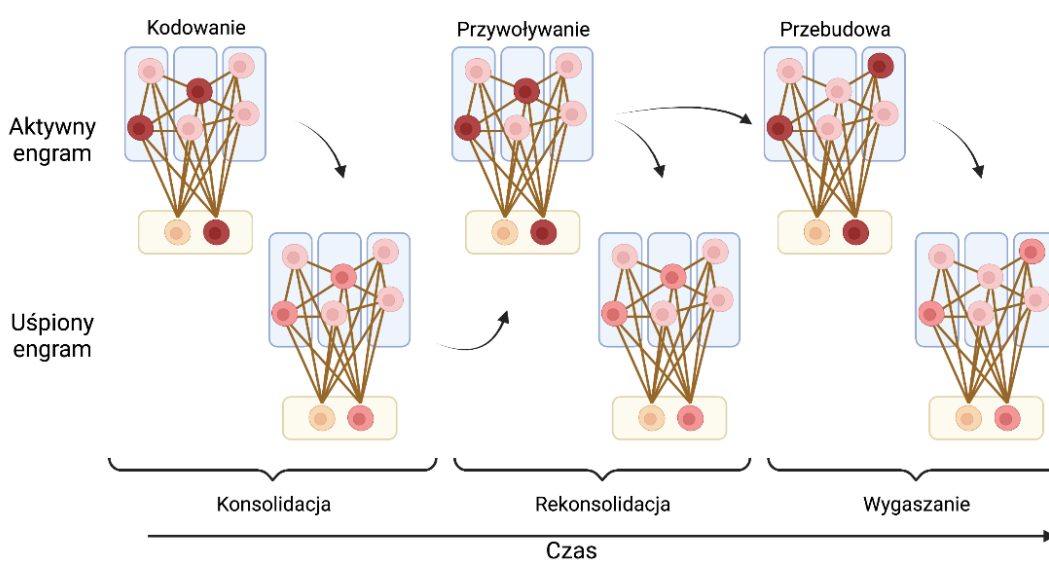
A. Klasyczna teoria konsolidacji pamięci



B. Teoria mnogich śladów pamięciowych



C. Cykl życia engramu



Rycina 1. Dwa modele konsolidacji pamięci długotrwałej.

(A) Klasyczna teoria konsolidacji zakłada stopniowy transfer śladu pamięciowego do wyspecjalizowanych obszarów kory mózgowej, podczas gdy rola hipokampa w przechowywaniu wspomnień z czasem zanika.

(B) Alternatywna teoria mnogich śladów pamięciowych, zakłada wzmocnienie lub utworzenie kolejnych połączeń hipokampalno-korowych za każdym razem, gdy wspomnienie

pamięciowe zostaje przywoływane. Wytworzenie połączeń korowo-korowych wspiera przypominanie pamięci o zdarzeniu. Podkreśla ona również jednocześnie zaangażowanie hipokampa i obszarów korowych przez cały okres trwania wspomnienia.

(C) Komórki współaktywowane w następstwie zadziałania danego bodźca stanowią engram. Proces ten określany jest kodowaniem engramu i odnosi się do wzmocnienia połączeń między jego komórkami. Konsolidacja pamięci pogłębia wzmocnienie połączeń, co pozwala na przywoływanie pamięci w późniejszym czasie. W wyniku konsolidacji, engram przechodzi w stan uśpienia, a przywołanie wrażenia pamięciowego go uaktywnia i częściowo destabilizuje, umożliwiając ponowną konsolidację (rekonsolidację) lub przebudowę/aktualizację (wygaszanie) śladu pamięciowego. Zaadaptowano z [29,30] oraz stworzono w Biorender.

Teoria ta oparła się na wczesnych badaniach nad amnezją wsteczną, w których stwierdzono, że uszkodzenie hipokampa upośledza pamięć wczesną i zazwyczaj oszczędza pamięć późną [31]. Ponadto, liczne badania wykorzystujące mapowanie genów odpowiedzi wczesnej, jak *c-fos* czy *zif-268* (ang. *Immediate Early Genes, IEGs*, które ulegają ekspresji specyficznemu po aktywacji neuronów), obrazowanie aktywności metabolicznej mózgu z użyciem deoksyglukozy, hamowanie danej struktury mózgu lub manipulacje specyficzne dla danego typu komórek, czy engramu, udowodniły, że przyśrodkowa kora przedczołowa miała większe znaczenie niż hipokamp w przypominaniu pamięci późnej [32–37].

1.1.2.2. Teoria mnogich śladów pamięciowych

Z czasem zgromadzono pewne dowody, które wydają się niezgodne z założeniami klasycznej teorii konsolidacji pamięci i zaproponowano alternatywną teorię mnogich śladów pamięciowych [25]. Głosi ona, że hipokamp nie tylko koduje informacje kontekstowe (o otoczeniu), ale także jest niezbędny do odtwarzania wspomnień niezależnie od ich wieku. Hipokampalna reprezentacja informacji działa z czasem jako wskazówka dla obszarów korowych, które są współaktywowane podczas kodowania tego wspomnienia i spaja je w jednorodną sieć hipokampalno-korową, która tworzy ślad pamięciowy. Utworzona sieć jest przebudowywana za każdym razem gdy pamięć jest przywoływana. W rezultacie powstaje wiele śladów neuronalnych kodujących informacje o początkowym doświadczeniu, co czyni je bardziej odpornymi na zaburzenia lub wymazanie. Ponadto, istnieje dynamiczna interakcja pomiędzy korowymi i hipokampalnymi reprezentacjami pamięci, dzięki której, w zależności od okoliczności każda z nich może przejąć dominację w momencie odtwarzania wspomnienia [21,38,39]. Dzięki tej teorii można wytłumaczyć dlaczego nowo nabyte, doświadczenia integrowane są z istniejącymi śladami pamięciowymi w sieci połączeń hipokampalno-korowymi, przez co są szybciej przyswajane [40]. Na jej poparcie wskazują

dane literaturowe nakreślające aktywną funkcję hipokampa w konsolidacji i przypominaniu pamięci niezależnie od jej wieku [41–43].

1.1.2.3. Podsumowanie

Obie teorie konsolidacji pamięci zakładają, że do konsolidacji śladu pamięciowego (pamięci epizodycznej) niezbędny jest hipokamp oraz obszary korowe. Ponadto, uważają one hipokamp za ośrodek łączący współaktywowane neurony korowe w hipokampalno-korowy engram, który dzięki wskazówkom hipokampa pozwala na przywołanie pamięci o danym zdarzeniu. Wciąż jednak istnieją obserwacje, które nie mogą zostać w pełni wytłumaczone żadną z powyższych teorii. Na przykład w hipokampie, nieustannie akumulowane są informacje kontekstowe, a przy okazji niezbędna jest jego aktywność związana z wyobraźnią i planowaniem [44]. W związku z tak dużym obciążeniem hipokampa, niektórzy naukowcy uważają, że jego rola jako permanentnego źródła wskazówek do odtwarzania wspomnień zapisanych w rozproszonej sieci hipokampalno-korowej jest mało prawdopodobna [29].

Ponadto wiele dowodów wskazuje na rolę przyśrodkowej kory przedczołowej w kodowaniu pamięci [45–48], a także przypominaniu wczesnej pamięci strachu [49,50]. Wymienione przypadki przemawiają zatem za koniecznością zaktualizowania obecnego spojrzenia na proces konsolidacji systemowej, uwzględniając nowo opisane role obszarów wzgórza w procesie przypominania pamięci późnej strachu, czy jego wygaszania [51,52]. Istnieją ku temu nieustanne próby, które opierają się na podstawie poprzednich hipotez, teorii i kolejnych dowodów doświadczalnych. Starają się one przede wszystkim opisać uniwersalne cechy konsolidacji systemowej [22,53]. Pośród tych cech należy wymienić cztery:

1. Hipokamp łączy neurony aktywowane podczas kodowania pamięci w rozproszoną reprezentację hipokampalną. Służy ona jako wskaźnik dla obszarów korowych, w których przechowywane są cechy i treść pamięci.
2. Hipokamp reprezentuje wspomnienia danego wydarzenia niezależnie od ich wieku, choć z upływem czasu obserwuje się wzmocnienie znaczenia obwodów korowych.
3. Konsolidacja pamięci nie jest jednokierunkowym procesem zależnym jedynie od czasu, lecz determinowana jest także przez proces zapominania i motywację.
4. Interakcja pomiędzy hipokampem, a korą mózgową jest dynamiczna i determinuje organizację i ekspresję pamięci długoterminowej.

Warto także dodać, że pomimo, iż neurony uważane są głównie typ komórek zaangażowanych w konsolidację i przechowywanie śladu pamięciowego, istnieje coraz

więcej dowodów na zaangażowanie także innych typów komórek w te procesy. Przykładem są astrocyty, które biorą udział w tworzeniu pamięci późnej, modulując połączenia hipokampalno-korowe w trakcie uczenia lub wykazując zmiany w ekspresji genów związanych z pamięcią późną [54–56], czy oligodendrocyty, których plastyczność w korze przedczołowej wspiera konsolidację pamięci [57].

1.2. Wygaszanie pamięci strachu

Strach i lęk są pierwotnymi, zachowanymi ewolucyjnie emocjami. Są one niezbędne zwierzętom do przetrwania gdyż umożliwiają szybką reakcję na zagrożenia środowiskowe [58]. Jednocześnie, nadmierny strach i lęk są cechami zaburzeń zachowania, które dotyczą miliony ludzi na całym świecie, takich jak fobie czy zespół stresu pourazowego (ang. *PTSD*, *Post Traumatic Stress Disorder*) [59–61]. Leczenia PTSD opiera się na terapii ekspozycyjnej polegającej na wygaszaniu strachu [62] czyli nabywaniu nowych informacji o zaistniałych sytuacjach w środowisku i wytworzeniu nowej neuronalnej reprezentacji tych bodźców (ślądu pamięciowego), które tłumią wcześniej wyuczony strach [63–68]. Fenomen wygaszania strachu możliwy jest dzięki modyfikacji pierwotnego ślądu pamięciowego odpowiadającego za reakcję strachu [7,69–71]. Oznacza to, że wygaszanie nie nosi znamion reakcji biernej, nie należy też go utożsamiać z zapominaniem, lecz jest aktywnym procesem uczenia się.

Wygaszanie strachu po raz pierwszy opisał Ivan Pavlov w 1927 roku przy użyciu paradygmatu warunkowania klasycznego, w którym bodźce warunkowe (ang. *conditioned stimuli*, CS, tj. dźwięk dzwonka, czy światło) były połączone z prezentacją bodźców bezwarunkowych (ang. *unconditioned stimuli*, US, tj. jedzenia lub kwasu). Po treningu asocjacyjnym zarówno US jak i CS wywoływał reakcję warunkową (ang. *Conditioned response*, CR, tj. ślinotok u psa). W swoich badaniach, Pavlov wykazał, że zaprzestanie kojarzenia US z CS (wielokrotnie wystawianie na działanie dzwonka przy braku jedzenia) osłabia CR [63]. Badacz ten zauważył również kilka przypadków, w których CR powróciła po wygaszeniu, włączając w to samorzutne jej odnowienie wraz z upływem czasu (ang. *spontaneous recovery*, SR) lub nawrót wygaszonej reakcji (ang. *reinstatement*), gdy US zostało ponownie zaprezentowane po wygaszeniu CR. Odnowienie CR obserwuje się również, gdy warunkowanie i wygaszanie są prowadzone w różnych kontekstach. Powrót do kontekstu warunkowania może ponownie ujawnić uwarunkowaną reakcję (ang. *renewal*). Wszystkie te trzy zjawiska opisano również w odniesieniu do wygaszania pamięci strachu i są dowodem na to, że wygaszanie uwarunkowanej reakcji nie prowadzi do wymazania wcześniej nabytej pamięci, a także, że pamięć wygaszania strachu jest mniej trwała od tej

wywołanej warunkowaniem strachu [72–79]. Nie ma jednego prostego wyjaśnienia, dlaczego pamięć wygaszenia jest tak nietrwała i zależna od czasu. Aby wydłużyć czas istnienia pamięci wygaszenia, stosuje się różne, niekiedy bardziej rozbudowane rodzaje treningu. Wykazano na przykład, że zwiększona liczba dni treningu wygaszenia poprawia stabilność pamięci wygaszenia, natomiast zmasowany typ treningu wygaszenia przyspiesza proces wygaszenia pamięci [80]. Wyższą stabilność pamięci wygaszenia można uzyskać również poprzez przeprowadzenie wygaszenia w wielu kontekstach [81], czy poprzedzenie treningu wygaszenia sesją przypominania uwarunkowanego strachu (ang. *recall*) [82,83].

Podsumowując, wygaszanie strachu jest procesem pozwalającym na adaptację zachowania zwierząt do zmieniającego się środowiska. Upośledzone wygaszenia pamięci strachu [84–86], czy wysoka stabilność pamięci strachu [34,87–89], są proponowane jako mechanizmy patologicznych wspomnień obserwowanych u osób z PTSD. Wciąż jednak niewiele wiadomo na temat mechanizmów komórkowych leżących u podstaw wygaszenia późnej pamięci strachu.

1.3. Zwierzęce modele wygaszania pamięci strachu

W laboratoriach najczęściej używane są protokoły wygaszania warunkowego strachu, które opierają się na warunkowaniu strachu zależnym od bodźców ogólnych (kontekstu) lub od dodatkowej wskazówki dźwiękowej, czy świetlnej. W pierwszym paradygmacie CS stanowi samo otoczenie treningowe (kontekst), który parowany jest z rażeniem prądem (US), natomiast podczas wygaszania strachu zwierzę eksponowane jest ponownie na ten kontekst bez prezentacji US. Jest to najprostsza forma asocjacji wykorzystywana do badania pamięci wygaszenia. W drugim paradygmacie zwierzę jest uczone kojarzenia wskazówki z bodźcem wywołującym strach (takim jak rażenie prądem lub podmuchem powietrza). W trakcie wygaszania CS jest prezentowane wielokrotnie bez US, najczęściej w innym kontekście środowiskowym, aby ułatwić zmianę asocjacji CS-US na CS pozbawionego US [90]. Wygaszanie uwarunkowanego strachu, podobnie do samego warunkowania strachu, w zależności od użytego paradygmatu, aktywuje różne obwody neuronalne charakterystyczne dla uczenia zależnego od bodźców ogólnych, czy od akustycznych [91,92].

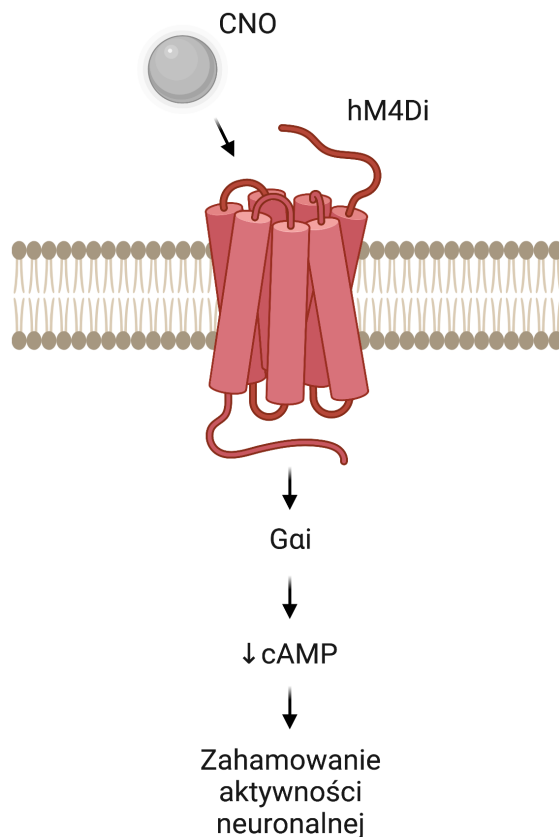
Zwierzęce modele wygaszania uwarunkowanego strachu są w dużej mierze podstawą badań PTSD. Na przykład, wygaszanie strachu zależnego zarówno od bodźców dźwiękowych, jak i ogólnych, jest upośledzone u myszy szczepu 129S1/SvImJ [93,94], czy szczurów szczepu Wistar, hodowanych by uzyskać osobniki wykazujące wysoki poziom

zachowań lękowych (ang. *HAB, High anxiety behavior*) [95]. Uważa się, że jest to użyteczny model odzwierciedlający jeden z aspektów PTSD, mianowicie trwałe wspomnienie traumatyczne, niepodatne na przebudowę [96]. Upośledzenie wygaszania strachu wykazują również różne linie myszy transgenicznych stworzone poprzez mutację genów (ang. *gene knock-out*). Pośród nich znajdują się geny kodujące transporter cynku ZnT3 [97], neksynę-1 [98], metabotropowe receptory glutaminianergiczne, mGluR5 i mGluR7 [99,100], neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego, BDNF (ang. *Brain-derived Neurotrophic Factor, BDNF*) [101–103], czy kinazę kalmodulinową zależną od wapnia typu drugiego, α CaMKII [104–106].

Badania na zwierzętach pozwoliły nam zrozumieć również, w jaki sposób wspomnienia związane ze strachem są nabywane, przechowywane i wygaszane. Ponadto, istnieje coraz więcej dowodów wskazujących na specyficzne obwody neuronalne obejmujące korę przedczołową, hipokamp, ciało migdałowate i obszary wzgórza, które modulują uczenie się i tłumienie strachu, o których traktują podrozdziały 1.4. i 1.5. niniejszej rozprawy.

W celu zbadania roli obszarów mózgu w procesach pamięciowych historycznie stosowano trwałe lezje tych struktur [107]. Aktywność neuronów monitorowano za pomocą elektrod wprowadzanych do mózgu zwierzęcia, nagrań EEG, lub mapowano za pomocą analizy ekspresji białek- markerów plastyczności, jakimi są geny odpowiedzi wczesnej (ang. *Immediate Early Genes, IEG*), w tym przede wszystkim *c-fos*. Manipulowano także aktywnością neuronów poprzez ich zahamowanie, czy pobudzenie za pomocą środków farmakologicznych [108]. Wraz z rozwojem technik badawczych w latach dwutysięcznych zaczęto wykorzystywać narzędzia optogenetyczne, chemogenetyczne (np. system DREADD, ang. *Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs*), czy fotometryczne. Optogenetyka pozwala na manipulację aktywnością neuronów z precyzją milisekund [109]. Jest to możliwe dzięki dostarczeniu światła do obszarów, do których uprzednio wprowadzono aktywowane światłem kanały jonowe, czy pompy protonowe [110]. Chemogenetyka jest mniej inwazyjną metodą, wydłużającą okres manipulacji do około 8 godzin. W metodzie tej aktywność neuronów regulowana jest przez sztuczny ligand (np. N-tlenek klozapiny, ang. *Clozapine-N-oxide, CNO*) oddziaływujący z wcześniej wprowadzonymi do komórek zmodyfikowanymi receptorami metabotropowymi (np. hM4Di - hamujący, hM3Dq - pobudzający) [111]. Mechanizm hamowania aktywności neuronów za pomocą DREADD został przedstawiony na **Rycinie 2**. Fotometria zaś, polega na obrazowaniu fluorescencji sensora wapnia (GCaMP) w komórkach [112]. Intensywność fluorescencji białka GCaMP (odzwierciedlająca poziom Ca^{2+} w komórce) może być mierzona w

komórkach mózgu *in vivo* z wykorzystaniem miniskopów montowanych na czaszce zwierzęcia lub mikroskopu dwufotonowego [113].



Rycina 2. Schemat przedstawiający działanie chemogenetycznego systemu DREADD

Genetycznie zmodyfikowany ludzki transmembranowy receptor muskarynowy dla acetylocholiny (hM4Di) aktywowany jest przez N-tlenek klozapiny (CNO). Aktywacja hM4Di powoduje obniżenie cyklicznego AMP w komórce, wywołane za pomocą białek Gi. W konsekwencji, prowadzi to do zablokowania spontanicznych wyładowań neuronu, w którym obecny jest ten receptor, rozumianych jako zahamowanie aktywności neuronalnej. Stworzono w Biorender.

Wykorzystując powyżej opisane narzędzia dokonano znacznego postępu w poznaniu obwodów neuronalnych zaangażowanych w regulację procesów pamięciowych [114–116]. Niemniej, większość tych badań skupiała się na pamięci wczesnej [51,88,117,118]. Jednocześnie, procesy komórkowe leżące u podłoża pamięci późnej pozostają mniej poznane.

Podsumowując, do niepodważalnych korzyści płynących z badań nad wygaszaniem uwarunkowanego strachu u zwierząt laboratoryjnych należy zaliczyć nakreślenie podobieństw neuroanatomicznych, neuroprzebieżnikowych i funkcjonalnych z tymi

obserwowanymi u ludzi cierpiących na PTSD [119]. Doświadczenia te zaowocowały opracowaniem nowych strategii farmakologicznych wspierających terapię behawioralną zaburzeń lękowych [120–122]. Lecz by badania nad wygaszeniem strachu u zwierząt miały większą wartość translacyjną niektóre z aspektów metodologicznych powinny ulec zmianie [123,124].

1.4. Obwody neuronalne zaangażowane w wygaszanie wczesnej pamięci strachu

Ciało migdałowe, kora przedczołowa, hipokamp, i pień mózgu są kluczowymi obszarami mózgu zaangażowanymi w procesy pamięciowe związane ze strachem oraz wygaszaniem wczesnej pamięci strachu [66,114,125,126].

Jądro podstawno-boczne ciała migdałowego (BLA) jest niezbędne do nabywania pamięci strachu [92,127–129], a także do kodowania, lecz nie konsolidacji pamięci wygaszania strachu [130–134]. Jedną z pierwszych prac ukazujących rolę BLA w wygaszaniu strachu opublikowano w 1992 roku. Zauważono wówczas, że zahamowanie aktywności BLA za pomocą antagonisty receptorów kwasu N-metylo-D-asparaginowego (ang. *N-methyl-D-aspartate*, NMDA), upośledza wygaszanie pamięci strachu [135]. W podobnym eksperymencie, udowodniono, że zahamowanie receptorów NMDA, lub aktywacja receptorów kwasu γ -aminomasłowego (ang. γ -aminobutyric acid, GABA) w BLA, lecz nie w środkowym jądrze ciała migdałowego (CeA), upośledza wygaszanie pamięci strachu [134,136]. Wykazano również, że formowanie i wygaszanie pamięci strachu, oraz pamięć nagrody, aktywują genetycznie odrębne populacje neuronów w BLA [133].

Kora infralimbiczna (IL), będąca częścią kory przedczołowej, jest jedną z najlepiej opisanych struktur należących do obwodów neuronalnych zaangażowanych w wygaszania pamięci strachu [115,118,137–144]. Zauważono, że aktywacja IL (poprzez śródczaszkową infuzję antagonisty receptorów GABA, pikrotoksyny) podczas wygaszania strachu zależnego od bodźców ogólnych przyspiesza tempo wygaszania [141]. Z kolei zahamowanie aktywności IL (poprzez infuzję agonisty receptorów GABA - muscimolu do IL) prowadziło do upośledzenia konsolidacji pamięci wygaszania [142]. Obserwacje te potwierdzono stosując zarówno manipulacje farmakologiczne jak i optogenetyczne [139]. Ponadto, dwukierunkowe projekcje pomiędzy IL a BLA są odpowiedzialne za hamowanie reakcji strachu w trakcie wygaszania [138,145]. Optogenetyczne zahamowanie projekcji BLA→IL w trakcie sesji wygaszania upośledza wygaszanie wczesnej pamięci strachu [146], podczas gdy zahamowanie szlaku IL→BLA skutkuje pogorszeniem retencji pamięci wygaszania [147].

Kolejnym elementem obwodów neuronalnych zaangażowanych w wygaszanie wczesnej pamięci strachu jest hipokamp, [79,105]. Aktywność hipokampa jest istotna dla

poprawnego nabywania i ekspresji, czy przywoływania pamięci wygaszania strachu [148,149]. Okazuje się, że podobne obserwacje poczyniono po inaktywacji mPFC, co podpowiada, że oba obszary kontrolują wygaszanie pamięci strachu zależnego od bodźców ogólnych [150]. Kora przedczołowa nie ma natomiast bezpośrednich połączeń z hipokampem i jak wykazano, może komunikować się z tą strukturą za pośrednictwem wzgórza [151]. Chemogenetyczne zahamowanie neuronów grzbietowej części hipokampa, projektujących do IL skutecznie blokuje wygaszanie strachu [152].

Coraz więcej badań wskazuje, że wygaszanie strachu zależne jest również od ośrodków wzgórzowych. Jak pokazują doświadczenia elektrofizjologiczne, wygaszanie strachu indukuje zmiany transmisji synaptycznej w neuronach jądra przyśrodkowego wzgórza (MD) [153] oraz jego projekcjach do przyśrodkowej kory przedczołowej (mPFC) [154]. Z kolei, MD unerwiane przez jądro wzgórka górnego (SC), gdy zastymulowane optogenetycznie w trakcie sesji wygaszania strachu ułatwiało jego wygaszenie [155]. Zaś chemogenetyczna lub optogenetyczna inaktywacja projekcji MD→CeA, MD→BLA, czy przednio-brzusznego jądra siatkowatego wzgórza (TRNrv) do MD zaburza wygaszanie strachu uwarunkowanego na bodźce dźwiękowe [155,156].

Zahamowanie projekcji mPFC do jądra łączącego wzgórza (RE) w trakcie wygaszania skutkuje zahamowaniem nabywania pamięci wygaszania [151]. Podobne skutki niesie zahamowanie aktywności samego RE w trakcie wygaszania [157]. Zaś zahamowanie projekcji RE→CA1 podczas sesji przypominania pamięci strachu, upośledza wygaszanie wczesnej pamięci strachu kolejnego dnia, sugerując że aktywność RE→CA1 przyczynia się do obniżenia ekspresji strachu i wywoływania wygaszania strachu zależnego od bodźców ogólnych [158]. Chemogenetyczne obniżenie aktywności jądra przykomorowego wzgórza (PV), czy jego projekcji IL→PV lub PV→CeL podczas przypominania wczesnej pamięci wygaszania powoduje jego upośledzenie [159]. Leżenie przednio-brzusznego jądra wzgórza (AV) za pomocą lidokainy zaburzyły wygaszanie wczesnej pamięci w teście unikania [160].

Wygaszanie strachu jest również wspierane przez brzuszno-boczną część istoty szarej okołowodociągowej (vlPAG) [161], korę śródwęchową (ENT) [162], czy przyśrodkowe jądro przegrody (MS) [163,164]. Niektóre prace sugerują również udział miejsca sinawego (LC) [165] i kory okołoczodołowej w wygaszaniu reakcji strachu [166], czy warstwy niepewnej [167]. Ostatnie doniesienia raportują również, że chemogenetyczne zahamowanie neuronów jądra przyśrodkowego ciała migdałowatego (MeA) projektujących do grzbietowo-przyśrodkowej części brzuszno-przyśrodkowego jądra podwzgórza (VMHdm) poprawia wygaszanie strachu u myszy wykazujących fenotyp znacznego upośledzenia wygaszania strachu [168].

1.5. Obwody neuronalne zaangażowane w wygaszanie późnej pamięci strachu

Jak wspomniano w podrozdziale 1.1.2., czas wpływa na reorganizację obwodów neuronalnych zaangażowanych w przechowywanie i przywoływanie wspomnień [35]. Wspomnienia mogą być również aktualizowane wraz z upływem czasu, tj. podlegać destabilizacji podczas ich przywoływania, rekonsolidacji, wygaszaniu, i zapominaniu [169].

Z doniesień analizujących obwody neuronalne zaangażowane w przetwarzanie późnej pamięci strachu dowiadujemy się, że BLA jest aktywowane zarówno przez przywoływanie jak i wygaszanie późnej pamięci strachu [117,170–172]. W szczególności lezja BLA z użyciem, NMDA, którą wykonano na dwa tygodnie przed sesją wygaszania, spowodowała upośledzenie przypominania pamięci strachu jak i wzmocnienie wygaszania tych wspomnień. Efekt lezji zaobserwowano nawet po upływie 500 dni od treningu, zarówno dla wygaszania pamięci strachu bodźców ogólnych, jak i dźwiękowych, [171]. Nowsza praca pokazuje, że wygaszanie późnej pamięci strachu (30 dni po treningu warunkowania) wywołuje podwyższenie aktywności BLA, mierzone jako wzrost poziomu białka c-Fos. Poziom białka c-Fos w BLA korelowała z aktywnością środkowej części wzgórza oraz grzbietowego i brzuszego hipokampa, lecz nie z aktywnością kory przedczołowej [117]. W kolejnym doniesieniu, Silva i wsp. (2021) zademonstrowali, że wejście z pola brzuszego nakrywki (ang. *ventral tegmental area*, VTA) do BLA reguluje wzrost poziomu c-Fos w BLA podczas późnego wygaszania strachu. Autorzy zauważyli również, że w trakcie wygaszania późnej pamięci strachu projekcje RE→BLA ulegają wzmocnieniu i indukują plastyczność neuronów BLA. Chemogenetyczne zahamowanie tych projekcji skutkuje upośledzeniem wygaszania późnej pamięci strachu, a ich aktywacja obniża poziom zamierania myszy w trakcie sesji wygaszania, co świadczy o przyspieszeniu procesu wygaszania strachu. Jednocześnie, badacze nie zaobserwowali by wygaszanie późnej pamięci strachu indukowało zmiany poziomu c-Fos w komórkach BLA unerwianych przez IL, ani by zahamowanie aktywności tych projekcji wpływało na wygaszanie późnej pamięci strachu [51].

Wygaszanie późnej pamięci strachu aktywuje korę prelimbiczną (PrL), przednią część kory przedniego zakrętu obręczy (CG), IL, i korę zapłatową (RSP), sytuując te obszary jako potencjalnie kluczowe w tym procesie [117]. Jak dalej wykazano, wewnątrzkomórkowy szlak sygnałowy angażujący NR2B/PKA/pCREB w RSC przyczynia się do wygaszania późnej pamięci strachu [173]. Ponadto wykazano, że zarówno zahamowanie aktywności BDNF i syntezy białek w IL, jak i zahamowanie aktywności IL za pomocą lidokainy, upośledza wygaszanie późnej pamięci strachu [118,140]. Co ciekawe, BDNF w PrL nie jest konieczny do wygaszania pamięci strachu [140]. Ponadto BDNF w brzusznej części hipokampa zwiększa pobudliwość komórek IL, wspierając w ten sposób pamięć wygaszania. Chemogenetyczne

zahamowanie połączeń neuronalnych z grzbietowego hipokampa do IL podczas sesji wygaszania zablokowano wygaszanie strachu po 8 dniach od jego warunkowania [152]. Natomiast, gdy inhibicja miała miejsce tuż po sesji wygaszania, upośledzono przypominanie późnej pamięci wygaszania strachu [174]. Ponadto, IL reguluje aktywność RE podczas wygaszania późnej pamięci strachu, a stymulacja optogenetyczna połączeń IL→RE skutkuje wzmocnieniem wygaszania [51].

Poza projekcjami brzusznej i grzbietowej części hipokampa do IL, niewiele wiadomo o jego wpływie na wygaszanie późnej pamięci strachu. W istocie, przypominanie pamięci późnej strachu oraz jego późne wygaszanie wywołuje podwyższone poziomy c-Fos w brzusznej części [117], oraz obniżone poziomy c-Fos w grzbietowej części hipokampa [175].

Badania obszarów przyśrodkowego wzgórza zaowocowały znacznym poszerzeniem wiedzy na temat obwodów neuronalnych zaangażowanych w przetwarzanie późnej pamięci strachu [51,52,176,177]. Wzgórze uczestniczy w przetwarzaniu silnych emocji niezależnie od ich wartości (pozytywne vs. negatywne), co sugerowano już 1997 roku, obserwując aktywację tego obszaru u ludzi wykazujących takie emocje jak smutek, lęk, czy szczęście [178]. Zmiany w aktywności wzgórza obserwuje się również u pacjentów z zaburzeniami lękowymi, w tym cierpiących na PTSD, którzy wykazywali obniżoną aktywność ośrodków wzgórzowych [179–181]. Zgodnie z metaanalizą przeprowadzoną przez Ramage i in. (2013) wzgórze pośredniczy w komunikacji korowej podczas przywoływania traumatycznych wspomnień z przeszłości [182]. Ponadto, zaburzenia wzgórzowych połączeń funkcjonalnych stanowią markery określające stopień nasilenia objawów PTSD, a także podatności na terapię ekspozycji stosowaną w leczeniu tej choroby [183].

Szczególnie ciekawym odkryciem jest wykazanie funkcji RE w regulacji wygaszania późnej pamięci strachu. Chemogenetyczne zahamowanie aktywności RE podczas wygaszania późnej pamięci zaburza proces wygaszania, a aktywacja RE ma skutek przeciwny [51]. Co ciekawe, autorzy tej pracy uzyskali podobne wyniki manipulując aktywnością projekcji RE→BLA. We wcześniejszej pracy Silva i wsp. (2018) zaobserwowali również silną indukcję ekspresji c-Fos w RE i PV po sesji wygaszania późnej pamięci strachu, przy czym aktywność PV silnie korelowała z RSC i RE. Ponadto, gdy chemogenetycznie aktywowano neurony PV w trakcie testu retencji wygaszania pamięci strachu zależnego od bodźców akustycznych, zauważono upośledzenie przypominania późnej pamięci wygaszania (uwaga: późna pamięć wygaszania rozumiana jest tutaj jako 7 dni od wygaszania do testu retencji) [159]. Ci sami autorzy osiągnęli podobny efekt stosując jednoczesne zahamowanie IL→PV i aktywację PV→CeL podczas przypominania późnej

pamięci strachu, co sugeruje istotną rolę obwodu IL→PV→CeL w tym procesie, podkreślając rolę obwodów korowo-wzgórzowych w wygaszaniu strachu.

Podłużne badania na myszach, oparte na obrazowaniu populacji neuronów w przednio-brzusznym jądrze wzgórza (AM) wykazały, że struktura ta odpowiada za wspieranie silnych wspomnień i poprzez komunikację z korą zakrętu obręczy (CG) aktywnie uczestniczy w konsolidacji późnej pamięci, w tym pamięci strachu [184]. Autorzy tej pracy, wykazali, że optogenetyczne zahamowanie projekcji AM→CG podczas klasycznego warunkowania strachu, upośledza przypominanie późnej, lecz nie wczesnej pamięci strachu. Jako, że badanie zostało wykonane u tych samych osobników, procedura behawioralna przypomina wygaszanie strachu, sugerując udział tych projekcji w wygaszaniu późnej pamięci strachu zależnej od bodźców ogólnych.

2. Cele pracy

Nadrzędnym założeniem niniejszej pracy było poznanie obwodów neuronalnych odpowiadających za wygaszanie reakcji związanej z późną pamięcią strachu zależnego od bodźców ogólnych.

Sformułowano następujące cele szczegółowe:

- Zbadać wpływ autofosforylacji izoformy α kinazy zależnej od wapnia i kalmoduliny typu II (α CaMKII) na efekty behawioralne zwierząt w trakcie wygaszania wczesnej i późnej pamięci strachu
- Określić jakie obszary aktywowane są przez wygaszanie wczesnej i późnej pamięci strachu
- Określić obszary mózgu, których aktywność w czasie wygaszania pamięci strachu jest regulowana przez autofosforylację α CaMKII;
- Zweryfikować rolę poszczególnych obszarów mózgu w wygaszaniu późnej pamięci strachu poprzez opisanie efektów behawioralnych chemogenetycznego hamowania ich aktywności
- Zweryfikować rolę połączeń neuronalnych między kluczowymi obszarami mózgu odpowiadającymi za wygaszanie późnej pamięci strachu poprzez opisanie efektów behawioralnych chemogenetycznego hamowania ich aktywności

3. Materiały i metody

3.1. Zwierzęta wykorzystane w doświadczeniach

Wykorzystano myszy obu płci z linii transgranicznej z mutacją Tg(α CaMKII-T286A)xTg(Thy1-EGFP), (dalej określane jako T286A^{+/-}) oraz ich rodzeństwa o genotypie typu dzikiego (WT, ang. *wild-type*). Myszy T286A^{+/-} uzyskano poprzez skrzyżowanie myszy z mutacją w domenie autofosforylacyjnej α CaMKII (α CaMKII-T286A) [185], z myszami heterozygotycznymi Thy1-EGFP(M) (Tg(Thy1-EGFP)MJrs/J) [186], i genotypowano jak opisano wcześniej [185,186]. Obecności białka zielonej fluorescencji (GFP) w części komórek mózgu (~10%), pozwala na analizę morfologiczną kolców dendrytycznych (analizy takie były wykonane przez innych członków zespołu, lecz nie są zawarte w niniejszej rozprawie). Tu fluorescencja GFP ułatwiła anatomiczne zdefiniowanie struktur stanowiących obszary analizy aktywności regionalnej. Zwierzęta T286A^{+/-} pochodziły z hodowli Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego Polskiej Akademii Nauk.

Ponadto użyto samce myszy C57BL/6J z hodowli Centrum Medycyny Doświadczalnej w Białymstoku lub zwierzętarni Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego Polskiej Akademii Nauk. Do doświadczeń użyto myszy w wieku 8-10 tygodni na początku procedury. Myszy utrzymywane były w pomieszczeniach hodowlanych z 12-godzinnym cyklem dobowym (12 godz. fazy jasnej / 12 godz. fazy ciemnej), stałej temperaturze (21-23°C) oraz stałej wilgotności powietrza (40-50%). Zwierzęta przetrzymywane były w grupach do pięciu osobników w klatce z dostępem do pożywienia i wody *ad libitum*. Wyjątkiem były zwierzęta przechodzące rekonwalescencję (około 7 dni) po operacji stereotaktycznej. Myszy te były przetrzymywane pojedynczo. Doświadczenia behawioralne przeprowadziłem w fazie jasnej cyklu dobowego zwierząt. Wszelkie procedury doświadczalne wykonałem zgodnie z wytycznymi i za zgodą I Lokalnej Komisji Etycznej do spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie (nr. zgód: LKE 932/2019, LKE 119/2016).

3.2 Wektory wirusowe

3.2.1. Wektory AAV

Wykorzystano trzy wektory wirusowe stowarzyszone z adenowirusami (AAV, ang. *adeno-associated virus*). Wektory AAV dzięki zdolności do transdukcji komórek dzielących się, umożliwiają stabilne wyrażanie niesionego genu w komórkach układu nerwowego [187]. Z uwagi na postawione w tej rozprawie hipotezy, zastosowany wektor powinien charakteryzować się umiarkowaną dyspersją, aby zakres transdukcji był przestrzennie

ograniczony. W związku z tym postanowiłem zastosować wektory wirusowe stowarzyszone z mozaiką adenowirusa o serotypie 2.1 [188,189]. Wszystkie wektory zastosowane w opisanych tu doświadczeniach podlegały jakościowej analizie poziomu ekspresji. Zwierzęta z niewystarczającą ekspresją wirusa w badanym obszarze mózgu (nie obejmowały większości objętości struktury mózgowej) lub ekspresja obejmująca inne obszary niż testowany zostawały wykluczane z analizy statystycznej.

Użyte wektory wirusowe:

1) hM4Di: koduje hamujący DREADD połączony był z białkiem czerwonej fluorescencji, mCherry. W eksperymentach użyto dwóch wariantów genu promotorowego kontrolującego wyrażanie ładunku wektora:

1a) ludzkiego genu synapsyny typu pierwszego (*hSyn1*), specyficznego dla neuronów (pAAV2.1-hSyn1-hM4Di(Gi)-mCherry). Oznaczenie używane dalej w tekście- hSyn1-hM4Di. Zastosowany w manipulacji aktywnością neuronów w V1, IL, RE oraz MS. Miano cząsteczek wirusowych dla tego wektora wynosiło: 4.59×10^9 pc/ μ l.

1b) genu *CaMKII2a*, specyficznego dla neuronów aktywujących (pAAV1/2- α CaMKII-hM4Di(Gi)-mCherry). Oznaczenie używane dalej w tekście- α CaMKII-hM4Di. Zastosowany w manipulacji aktywnością neuronów w RE oraz dCA1. Miano cząsteczek wirusowych wynosiło: 4.4×10^9 pc/ μ l.

2) Kontrolny wektor wirusowy kodujący mCherry pod promotorem *CaMKII2a* (pAAV1/2- α CaMKII-mCherry). Określany dalej jako mCherry. Zastosowany w manipulacji aktywnością neuronów w V1, IL, RE, MS oraz polu dCA1 hipokampa. Miano cząsteczek wirusowych wynosiło: 7.5×10^7 pc/ μ l.

Powyższe wektory AAV wyprodukowane zostały w Pracowni Modeli Zwierzęcych, w Instytucie Nenckiego. Sekwencje oraz mapy plazmidów dostępne są w repozytorium ADDGENE pod nr. katalogowymi #50475 (hSyn1-hM4Di), #50477 (α CaMKII-hM4Di), #114469 (mCherry).

3.2.2. Wektory AAV z ekspresją ładunku w systemie zależnym od rekombinazy Cre

W celu zbadania funkcji połączeń neuronalnych między dwoma obszarami mózgu zastosowałem system dwóch wektorów wirusowych: AAV zawierający gen receptora DREADD (hM4Di), zależny od rekombinazy Cre, tzw. DIO (*ang.* Double-floxed Inverse Orientation) oraz retroAAV kodujący rekombinazę Cre (rAAV-Cre). W AAV z DIO-hM4Di, gen

hM4Di ustawiony jest w orientacji antysensownej, uniemożliwiając jego ekspresję, i otoczony jest przez parę sekwencji loxP o przeciwnym zwrocie. Wektor rAAV-Cre, posiada zdolność do transdukcji aksonów komórek neuronalnych. Transdukcja komórki oboma wektorami pozwala na inwersję i ekspresję genu hM4Di (**Rycina 3**).

Zastosowano następujące wektory wirusowe:

1) retroAAV kodujący rekombinazę Cre połączoną z białkiem GFP. Wektor transdukuje aksony neuronów pobudzających (ssAAV-retro/2-mCaMKII α -EGF-2A-iCre-WPRE-SV40p(A)). Oznaczony jako rAAV-iCre. Mapę plazmidu odszukać można w repozytorium ADDGENE pod nr. katalogowym #24593. Miano cząsteczek wirusowych wynosiło: 3.6×10^9 pc/ μ l.

2) AAV kodujący hM4Di połączony z mCherry, z ekspresją ładunku zależną od Cre i ograniczoną do neuronów pobudzających (ssAAV-1/2-mCaMKII α -dlox-hM4D(Gi)-mCherry(rev)-dlox-WPRE-bGHp(A)). Oznaczony w tekście jako α CaMKII-DIO-hM4Di. Mapę plazmidu odszukać można w repozytorium ADDGENE pod nr. katalogowym #50461. Miano cząsteczek wirusowych wynosiło: 3.3×10^9 pc/ μ l.

3) AAV kodujący mCherry z ekspresją ładunku zależną od Cre i ograniczoną tylko do neuronów pobudzających (ssAAV-1/2-mCaMKII α -dlox-mCherry(rev)-dlox-WPRE-bGHp(A)). Oznaczony w tekście jako α CaMKII-DIO-mCherry. Miano cząsteczek wirusowych wynosiło: 3.4×10^9 pc/ μ l (VVFETH Zurich pod nr katalogowy #v425-1). Wektory wirusowe zakupione zostały w Viral Vector Facility Uniwersytetu w Zurychu.



Rycina 3. Schemat przedstawiający mechanizm działania ekspresji genu zależnej od dwoma parami heterotypowych sekwencji loxP o przeciwnym zwrocie. α CaMKII, promotor genu kinazy kalmodulinowej zależnej od wapnia; hSyn, promotor genu ludzkiej rekombinazy Cre. Wektor kodujący hM4Di-mCherry, którego sekwencja otoczona jest sekwencjami palindrowowymi. L-ITR, lewostronna sekwencja palindromowa; R-ITR prawostronna

sekwencja palindromowa; polyA, sekwencja poliadenylacji; WPRE, potranslacyjny element regulatorowy.

3.3. Operacje stereotaktyczne

Zwierzę było wprowadzane w stan znieczulenia ogólnego, poprzez podanie wziewnego anestetyku, izofluranu (Aerrane, Baxter; 5%- dawka indukcyjna, obniżana stopniowo, 0,8-1.5%- dawka podtrzymująca anestezję). Następnie, mysz umieszczana była w ramie stereotaktycznej (#51733, Stoelting, Wood Dale, IL, USA) i podawano jej podskórnie serię leków: analgetyk (winian butorfanolu, 2 mg/kg, Butomidol, Richter Pharma), lek przeciwzapalny, przeciwbólowy i przeciwgorączkowy (kwas tolfenamowy, 4 mg/kg, Tolfedine, Vetoquinol), oraz antybiotyk (enrofloksacyna, 5 mg/kg, Baytril, Bayer); oraz domięśniowo lek przeciwobrzękowy (deksametazon, 0,2 mg/kg, Dexasone, Scanvet Poland). Odpowiednie stężenia substancji aktywnych uzyskano poprzez przygotowanie ich roztworów w soli fizjologicznej (0,9% NaCl, Polpharma). By zapobiec powstawaniu zespołu suchego oka, aplikowano na oczy zwierzęcia żel z karbomerem, zastępujący płyn łzowy (2 mg/kg, Vidisic, Bausch&Lomb). Podczas całej procedury, temperatura ciała myszy utrzymywana była na stałym poziomie przy pomocy maty grzewczej. Przed wykonaniem nacięcia, skóra na głowie myszy była golona, oczyszczona i zdezynfekowana roztworem jodiny (3%, Solutio Iodi Spirituosa, Biowet Drwalew) oraz miejscowo znieczulona lidokainą w żelu (2 mg/g, Lignocainum typ U, Jelfa). Następnie, za pomocą ramion stereotaktycznych, ustalono punkty bregma i lambda na czaszce zwierzęcia. Koordynaty dla poszczególnych obszarów mózgu zostały wyznaczone na podstawie atlasu mózgu myszy [190] i zebrane w Tabeli 1. Wiertłem dentystycznym wywiercałem w czaszce jedno, dwa lub trzy jedno milimetrowe otwory, przez które wprowadzałem igłę ściętą bocznie, o grubości 34 G (NanoFil, NF34BV, WPI, Sarasota, USA) zamontowaną na strzykawce (NanoFil, 10 µl, WPI), w której znajdował się jeden z nośników wirusowych. Podczas każdej iniekcji końcówka igły opuszczana była o 0,1 mm poniżej miejsca iniekcji, celem wytworzenia przestrzeni i która miała zapobiec wypływowi zawiesiny wektorów w czasie wyciągania igły. Z tego samego względu, po zakończeniu infuzji igła pozostawała w miejscu przez 10 minut. Infuzja zawiesiny w objętości 0,150 µl do MS; 2 x 0,1 µl do IL; 2 x 200 µl do V1, 2 x 0,25 µl do RE oraz 0,5 µl na półkulę do CA1. prowadzona była w tempie 0,1 µl/min, z użyciem pompy infuzyjnej (WPI, Sarasota, USA, #UMP3) połączonej z kontrolerem (Micro4, WPI, Sarasota, USA). W zależności od procedury, rama stereotaktyczna wyposażona była w jedno lub dwa ramiona uzbrojone w pompy infuzyjne ze strzykawkami. Następnie, igłę wyprowadzano z mózgu, a skórę zszywałem nicią

chirurgiczną, (PGA USP 4-0, Atramat, #R2094-75). Po zakończeniu infuzji znieczulano skórę w miejscu szycia żelem z lidokainą (2 mg/g, Lignocainum typ U, Jelfa). Przez 7 dni po operacji, zwierzęta przechodziły okres rekonwalescencji w oddzielnych klatkach, w czasie której otrzymywały Baytril (5 mg/kg, iniekcja podskórna przez 7 dni), oraz Tolfedine (4 mg/kg, iniekcja podskórna przez 3 dni). Operacje wykonywano minimum 3 tygodnie przed rozpoczęciem treningu behawioralnego.

Tabela 1. Koordynaty operacyjne dla celowanych iniekcji śródczaszkowych (mm).

Region	Koordynaty		
	Przednio-tylne	Przyśrodkowo-boczne	Grzbietowo-brzuszne
V1	-0,30	±0,26	-0,075
IL	+0,185	±0,015	-0,17
CA1	-0,20	±0,14	-0,15
MS	+0,75	0,0	-0,41
RE	0,0	±0,01	-0,44

Analiza ekspresji wektorów wirusowych przeprowadzona została na co czwartym skrawku utrwalonej tkanki mózgowej (opis przygotowania preparatów histologicznych w podrozdziale 3.5.). Skrawki były nakładane na szkiełko podstawowe (Polysine, Menzel-Gläser, #J2800AMNZ) i zatapiane w medium zawierającym barwnik DAPI, znakujący jądra komórkowe (Fluoromount-G, Invitrogen, #00-4959-52). Preparaty, następnie obrazowano z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego, i weryfikowano sygnał pochodzący od egzogennych białek mCherry lub GFP. Stosunek liczby komórek zawierających białko mCherry lub GFP, do całkowitej liczby komórek (DAPI), posłużył jako miara wydajności transdukcji komórek badanego obszaru mózgu przez wektor wirusowy.

3.4. Warunkowanie i wygaszanie pamięci strachu zależnej od bodźców ogólnych

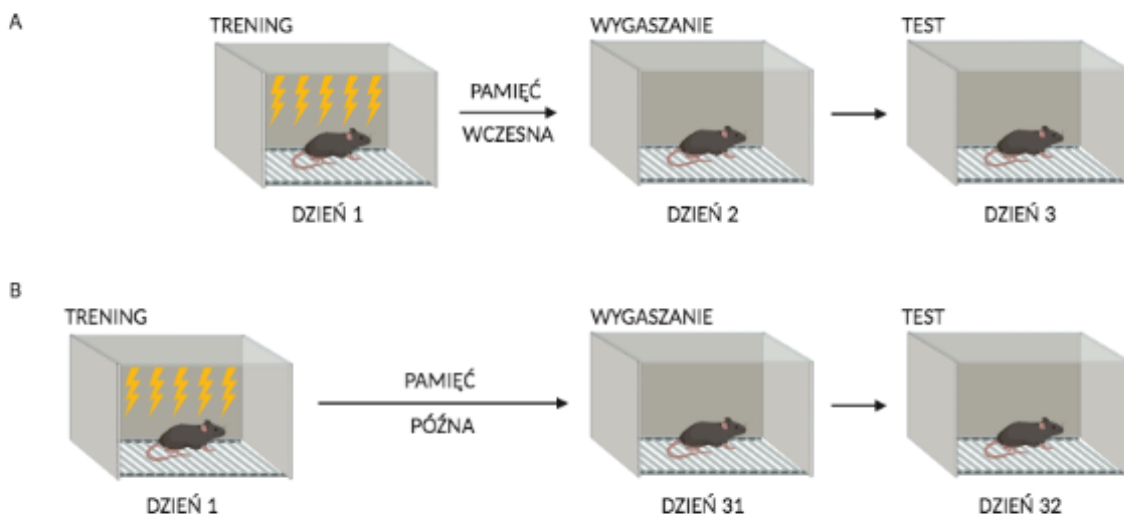
Myszy trenowane były w klatkach do warunkowania reakcji strachu (Med Associates Inc, St Albans, USA) umieszczonych w dźwiękoszczelnym pudle. Drzwiczki umiejscowione na jego froncie, posiadały zamontowaną od wewnętrznej strony kamerę wideo do nagrywania wnętrza klatki w świetle widzialnym oraz w podczerwonym. Klatki zbudowano z aluminiowych ścian bocznych i tylnej, ściany górnej z panelem świetlnym oraz frontowych drzwi z plexiglasu. Podłogę klatki stanowiła kratka z metalowych prętów, służących do rażenia myszy prądem elektrycznym. Przed każdym treningiem klatka była czyszczona 70% roztworem etanolu, a nawilżony nim arkusz ręcznika papierowego umieszczano pod podłogą z metalowych prętów.

W dniu sesji warunkowania lub wygaszania strachu, zwierzęta przenoszone były z pomieszczeń hodowlanych do pokoju behawioralnego na 30 minut przed treningiem, w celu aklimatyzacji. Następnie, w trakcie sesji treningowej, umieszczano zwierzę w klatce do warunkowania reakcji strachu, gdzie po 148 s od rozpoczęcia treningu, zwierzę rażone było prądem o natężeniu 0,7 mA, przez 2 s (US). Rażenie prądem powtarzane było pięciokrotnie, w 90 s. odstępach, zgodnie z protokołem opisanym wcześniej w pracy [105]. Mysz wracała do klatki domowej 30 sekund po ostatnim epizodzie rażenia prądem.

Po jednym (pamięć wczesna) lub 30 dniach (pamięć późna) od treningu zwierzęta poddano sesji wygaszania pamięci reakcji warunkowej. W tym celu ponownie wprowadzano je do klatek treningowych, tym razem pomijając rażenie prądem. W eksperymentach z użyciem myszy linii T286A , sesja wygaszania trwała 20 minut. W doświadczeniach z użyciem myszy C57BL/6J sesję wygaszania przedłużono do 30 minut by była skuteczna. Dzień po sesji wygaszania, testowano pamięć wygaszania. Myszy ponownie wkładano na 5 lub 30 minut do klatki treningowej pomijając rażenie prądem. Uproszczony schemat warunkowania i wygaszania pamięci strachu przedstawiono na **Rycinie 4**.

Do doświadczenia, w którym mapowano ekspresję c-Fos w mózgu myszy (więcej w podrozdziale 3.6.1.) wykorzystano trzy grupy kontrolne. Pierwszą grupę stanowiły zwierzęta zabrane bezpośrednio z klatki domowej (Naive), drugą myszy eksponowane na klatkę treningową z pominięciem rażenia prądem (Kontekst), natomiast w trzeciej zwierzęta sperfundowano 26 godzin po treningu warunkowania (bez sesji wygaszania, 5US).

W czasie wszystkich sesji treningowych mierzono czas, który zwierzę spędziło zamierając, to znaczy w bezruchu z wyłączeniem ruchów oddechowych. Pomiar ten przeprowadzano automatycznie przy użyciu oprogramowania (Video Freeze, Med Associates), gdy zwierzę pozostawało w bezruchu przez czas dłuższy niż 0,5 s. Procent czasu zamierania użyty został jako miara zachowanej pamięci strachu.



Rycina 4. Schemat eksperymentalny warunkowania i wygaszania uwarunkowanej reakcji strachu zależnej od bodźców ogólnych.

Zwierzęta poddane zostały treningowi warunkowania, podczas którego dochodziło do asocjacji bodźców bezwarunkowych (pięciokrotne, delikatne drażnienie elektryczne) z bodźcami ogólnymi (kontekst klatki treningowej). Kolejnego dnia (A: pamięć wczesna) lub po 30 dniach (B: pamięć późna) myszy zostały poddane treningowi wygaszania pamięci strachu, a dzień później testowano poziom retencji pamięci wygaszania tejże reakcji. Stworzono w Biorender.

Testowano również wpływ CNO na zachowanie zwierząt przechodzących trening wygaszania późnej pamięci strachu. Myszy C57BL/6J przeszły trening warunkowania. CNO (0; 0,5; 3 lub 10 mg/kg; Enzo Life Sciences, #BML-NS105-0005; rozpuszczone w soli fizjologicznej; 0,9% NaCl, Polpharma) podano dootrzewnowo na 30 minut przed sesją wygaszania późnej pamięci strachu. W kolejnych doświadczeniach roztwór CNO (3 mg/kg) podawano dootrzewnowo 30 minut przed rozpoczęciem sesji wygaszania pamięci strachu.

3.5. Perfuzja przezsercowa

Zwierzęta znieczulano za pomocą dootrzewnowego zastrzyku z mieszaniny ketmiany (90 mg/kg, Biowet Puławy) i ksylazyny (7,5 mg/kg, nazwa handlowa: Sedazin, Biowet Puławy), a następnie uśpiono poprzez dootrzewnowe podanie pentobarbitalu sodu (50 mg/kg, nazwa handlowa: Morbital, Biowet Puławy). Gdy zwierzęta weszły w stan głębokiego uśpienia (brak reakcji na szczypanie ogona/łap), otwierano im klatkę piersiową, rozszczelniano prawy przedsionek serca oraz wprowadzano igłę do lewej komory. Przez igłę wtłoczono zimny roztwór zbuforowanej soli fizjologicznej (0,01M, PBS, ang. *phosphate*

buffered saline, 60 ml w tempie 15 ml/min, 4°C, Medicago, #09-9400-100), a następnie paraformaldehyd (4% PFA, 60 ml w tempie 15 ml/min, 4°C, Sigma-Aldrich, #158127). Po zakończeniu perfuzji zwierzę dekapitowano, a mózg wyjmowano z czaszki. Wyizolowane mózgi utrwalano dodatkowo w 4% roztworze PFA w PBS, w temperaturze 4°C, przez 24 godziny. Następnie tkankę przekładano do 30% roztworu sacharozy (POCH, #772090110) w PBS pełniącego funkcję krioprotekcyjną i przechowywano 3 dni, w 4°C. Mózgi krojono na kriostacie żyłkowym (CM1950, Leica GmbH, Niemcy) w płaszczyźnie czołowej, uzyskując skrawki o grubości 45 µm. Skrawki przechowywano w temperaturze -20°C, w roztworze krioprotekcyjnym, PBSAF (PBS, 30% sacharoza (POCH, #772090110), 15% glikol etylenowy (BioShop, #ETH001.4), 0,05% NaN₃ (POCH, #792770426)).

3.6. Immunofluorescencyjna detekcja białek na skrawkach mózgu

3.6.1. Białko c-Fos

W celu przeprowadzenia barwień immunofluorescencyjnych używano co szóstego skrawka z całego przekroju mózgu. Skrawki płukano 3 x 6 min. w roztworze PBS, i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej w roztworze blokującym (PBS, 3% surowica ośla, (NDS, Jackson ImmunoResearch, #017-000-121), 0,3% Triton X-100 (BioShop, #TRX506.100)). Następnie, skrawki inkubowano w roztworze blokującym uzupełnionym o przeciwciało pierwszorzędowe, rozpoznające antygeny białka c-Fos (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, sc-52 dla doświadczenia, w którym mapowano 24 obszary mózgu lub Synaptic Systems #226 003 dla pozostałych eksperymentów) przez noc w 37°C. Drugiego dnia, skrawki płukano 3 x 6 min. w roztworze TBS (PBS, 0,3% Triton X-100) i dalej inkubowano z przeciwciałem drugorzędowym związanym z barwnikiem fluorescencyjnym, Alexa Fluor 594 (Invitrogen A-11062) przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Po inkubacji z przeciwciałem drugorzędowym tkankę płukano 3 x 6 min. roztworem PBS, naciągnięto na szkiełka mikroskopowe (Thermo Scientific, #AGAA000080) i zatopiono w medium Fluoromount-G z DAPI (Invitrogen, #00-4959-52).

3.6.2. Białka reporterowe mCherry i GFP

W celu wzmocnienia sygnału fluorescencyjnego pochodzącego z neuronów transdukowanych wektorami kodującymi białka reporterowe związane z receptorami DREADD (mCherry), czy też z rekombinazą Cre (GFP), wykorzystano przeciwciała wykrywające antygeny tych białek. Skrawki mózgu płukano 3 x 6 min. w roztworze PBS, a następnie inkubowany przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej, w roztworze blokującym (PBS, surowica ośla, (3%, NDS, Jackson ImmunoResearch, #017-000-121), Triton X-100

(0,3%, BioShop, #TRX506.100)). Kolejno, skrawki inkubowano w roztworze blokującym uzupełnionym o przeciwciało/a (w zależności od eksperymentu wybarwiano dodatkowo jedynie mCherry lub mCherry i GFP) pierwszorzędowe specyficzne dla białka GFP (1:500, Abcam #ab13970) i/lub mCherry (1:500, Abcam, #ab167453) przez noc w 4°C. Drugiego dnia, skrawki płukano 3 x 6 min. w roztworze TBS (PBS, 0,3% Triton X-100) i inkubowano z przeciwciałem drugorzędowym związanym z barwnikiem fluorescencyjnym Alexa Fluor488 dla białka GFP (1:500, Invitrogen, #A-11039) i/lub Alexa Fluor594 dla białka mCherry (1:500, Invitrogen, #A-11062) przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Po inkubacji z przeciwciałem drugorzędowym skrawki płukano 3 x 6 min. roztworem PBS oraz nakładano na szkiełka mikroskopowe (Thermo Scientific, #AGAA000080) i zatopiono w medium Fluoromount-G z DAPI (Invitrogen, #00-4959-52).

3.7. Obrazowanie i analiza zdjęć mikroskopowych

Preparaty z barwieniem immunofluorescencyjnym fotografowano z użyciem mikroskopów konfokalnych. Informacje na temat użytych mikroskopów, obiektów i fluoroforów zawarte są w **Tabeli 2**. Dla każdego zwierzęcia zrobiono średnio 6 mikrofotografii każdego z analizowanych regionów mózgu. Wszystkie zdjęcia analizowane były w programie Fiji ImageJ. Analiza gęstości komórek wyrażających białko c-Fos przeprowadzona została za pomocą stworzonego w naszym laboratorium makro dla programu Fiji ImageJ, którego autorami są Dr Kacper Łukasiewicz i Mgr inż. Kamil F. Tomaszewski (**Rozdział 8. - Suplement**).

3.8. Analiza statystyczna

Do analiz statystycznych wykorzystano program GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, USA) lub arkusz kalkulacyjny Excel (Microsoft Office 2013, USA). Różnice pomiędzy badanymi grupami uznawano za istotne dla $P < 0,05$. Wielkości grup doświadczalnych podane są w części Wyniki. Testy statystyczne użyte w niniejszej pracy zostały zawarte w opisie wyników i/lub opisach do rycin. W analizach danych prezentujących rozkład normalny i równe wariancje wykorzystano test t-Studenta oraz dwuczynnikową analizę wariancji (ANOVA), lub analizę modeli mieszanych z powtórzonymi pomiarami, a hipotezy testowane *a priori* poddawano testom dla powtórzonych pomiarów metodą Sidaka lub Dunneta. Korekcje na wielokrotne porównania wykonano jeśli wszystkie możliwe pary były porównywane w danym eksperymencie. Korelacje analizowano z użyciem

testu istotności korelacji Pearsona. Wszelkie analizy poprzedzał test na rozkład normalny danych (test Komogorova-Smirnova z ustaleniem wartości P metodą Dallala-Wilkinsona-Lilliefora), będący podstawą do użycia testów parametrycznych.

3.9. Wykorzystane programy graficzne

Wszelkie ilustracje graficzne użyte w niniejszej pracy zostały wykonane w programie BioRender (www.biorender.com) oraz Power Point (Microsoft Office 21., Redmont, USA).

Eksperyment / Czynność	Mikroskop	Powiększenie obiektywu	Fluorofory i ich zastosowanie	Długość fali świetlnej wzbudzającej fluorescencję	Zakres długości fali świetlnej, w której zbierano sygnał fluorescencyjny
Mapowanie aktywności obszarów mózgu (Podrozdział: 4.2.)	Leica SP5	10x	Alexa-488 (białko GFP)	488 nm	500-550 nm
			Alexa-594 (białko c-Fos)	594 nm	604-630 nm
Walidacja systemu DREADD (Podrozdział: 4.3.1.)	Leica SP8	40x	Alexa-488 (białko c-Fos)	488 nm	498-550 nm
			Alexa-594 (białko reporterowe mCherry) receptor DREADD	594 nm	604-630 nm
			DAPI (jądra komórek)	405 nm	415-470 nm
Szacowanie zakresu transdukcji neuronów (Podrozdziały: 4.4.-4.7., 4.9.)	Zeiss Spinning Disc	10x	Alexa-594 (białko reporterowe mCherry) receptor DREADD	594 nm	604-630 nm
			DAPI (jądra komórek)	405 nm	415-470 nm
Szacowanie zakresu transdukcji neuronów RE projektujących do MS (Podrozdział: 4.8.)	Olympus VS1100	10x	Alexa-488 (iCre związane z GFP)	488 nm	500-550 nm
			Alexa-594 (białko reporterowe mCherry) receptor DREADD	594 nm	604-630 nm
			DAPI (jądra komórek)	405 nm	415-470 nm

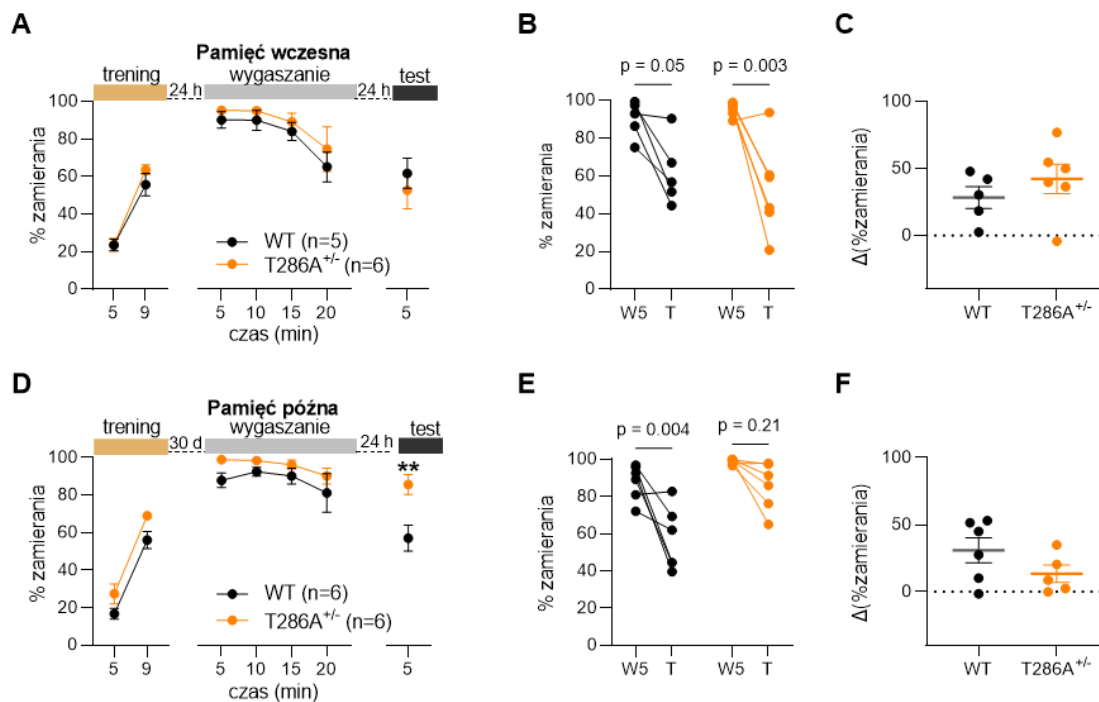
Tabela 2. Zestawienie użytych fluoroforów, ich zastosowanie oraz zestawienie podstawowych parametrów wykorzystanych do ich obrazowania, w zależności od wykonywanego zadania badawczego.

4. Wyniki

4.1. Wpływ autofosforylacji reszty treoninowej w pozycji 286 α CaMKII (T286- α CaMKII) na wygaszanie pamięci strachu

By określić funkcję autofosforylacji T286- α CaMKII w regulacji wygaszania pamięci strachu użyto myszy typu dzikiego (WT) (n=5) i heterozygoty (n=6) linii transgenicznej T286A (T286A^{+/-}) [185,186]. Zwierzęta poddano treningowi klasycznego warunkowania strachu (5x 0,75 mA przez 1 s.) [104] (patrz: podrozdział 3.4, **Rycina 4**) połączonego z sesją wygaszania pamięci strachu, 1 dzień (pamięć wczesna) lub 30 dni (pamięć późna) po treningu warunkowania, i testem pamięci wygaszania, która odbyła się jeden dzień po sesji wygaszania.

W czasie treningu warunkowania strachu zaobserwowano wzrost częstości reakcji zamierania u myszy obu genotypów w czasie ekspozycji na kolejne US co świadczy o powstawaniu pamięci strachu nowego kontekstu. Poziom zamierania był także podwyższony u myszy obu genotypów po ekspozycji na ten kontekst dzień później, co świadczy o powstaniu wczesnej pamięci strachu, i obniżał się w czasie sesji wygaszania, co świadczy o powstawaniu pamięci wygaszania strachu. Nie zauważono istotnych statystycznych różnic w poziomach zamierania myszy obu genotypów w trakcie wygaszania, a także podczas testu pamięci wygaszania (**Rycina 5A**). Zarówno myszy WT, jak i T286A^{+/-}, nabyły i skonsolidowały pamięć wygaszania (**Rycina 5B-C**).



Rycina 5. Konsolidacja późnej pamięci wygaszania strachu jest upośledzona u myszy T286A^{+/-}.

(A) Górny panel: oś eksperymentu, dolny panel: poziomy zamierania myszy WT (czarny kolor linii i kropek) i T286A^{+/-} (pomarańczowy kolor linii i kropek) podczas zadań behawioralnych. Myszy poddano treningowi klasycznego warunkowania strachu (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami, efekt treningu: $F_{1,9} = 193,6$, $P < 0,001$, efekt genotypu: $F_{1,9} = 0,699$, $P = 0,29$). Po 24 godzinach, zwierzęta przeszły sesję wygaszania pamięci strachu (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami, efekt treningu: $F_{1,11} = 7,297$, $P = 0,02$, efekt genotypu: $F_{1,9} = 1,255$, $P = 0,29$). Następnego dnia przeprowadzono test retencji pamięci wygaszania pamięci strachu (dwuczynnikowy test t-Studenta dla prób niezależnych WT vs. T286A^{+/-}: $t = 0,678$, $df = 9$, $P = 0,52$).

(B) Zarówno zwierzęta WT jak i T286A^{+/-} nabyły i skonsolidowały pamięć wygaszania strachu (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami, efekt treningu: $F_{1,9} = 24,59$, $P < 0,001$, wielokrotne porównania metodą Sidaka dla T286A^{+/-}: $P = 0,003$, WT: $P = 0,05$, efekt genotypu: $F_{1,9} = 0,083$, $P < 0,78$).

(C) Poziom skonsolidowanej pamięci nie różnił się między genotypami (dwustronny test t-Studenta dla prób niezależnych: $t = 0,988$, $df = 9$, $P = 0,35$).

(D) Górny panel: oś eksperymentu, dolny panel: poziomy zamierania myszy WT (czarny kolor linii i kropek) i T286A^{+/-} (pomarańczowy kolor linii i kropek) podczas zadań behawioralnych. Myszy poddano treningowi klasycznego warunkowania strachu, w którym zwierzęta T286A^{+/-} i WT nabyły pamięć uwarunkowaną strachem (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami, efekt treningu: $F_{1,10} = 184,6$, $P < 0,001$, efekt genotypu: $F_{1,10} = 6,561$, $P = 0,03$). Po 30 dniach, zwierzęta przeszły sesję wygaszania późnej pamięci strachu (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami, efekt treningu: $F_{1,13} = 2,065$, $P = 0,17$, efekt genotypu: $F_{1,10} = 3,968$, $P = 0,07$). Myszy T286A^{+/-} zamierały dłużej niż WT w teście retencji pamięci wygaszania pamięci strachu, wykazując upośledzenie konsolidacji późnej pamięci

wygaszania (dwustronny test t-Studenta dla prób niezależnych WT vs. T286A^{+/-}: $t = 3,271$, $df = 10$, $P = 0,008$).

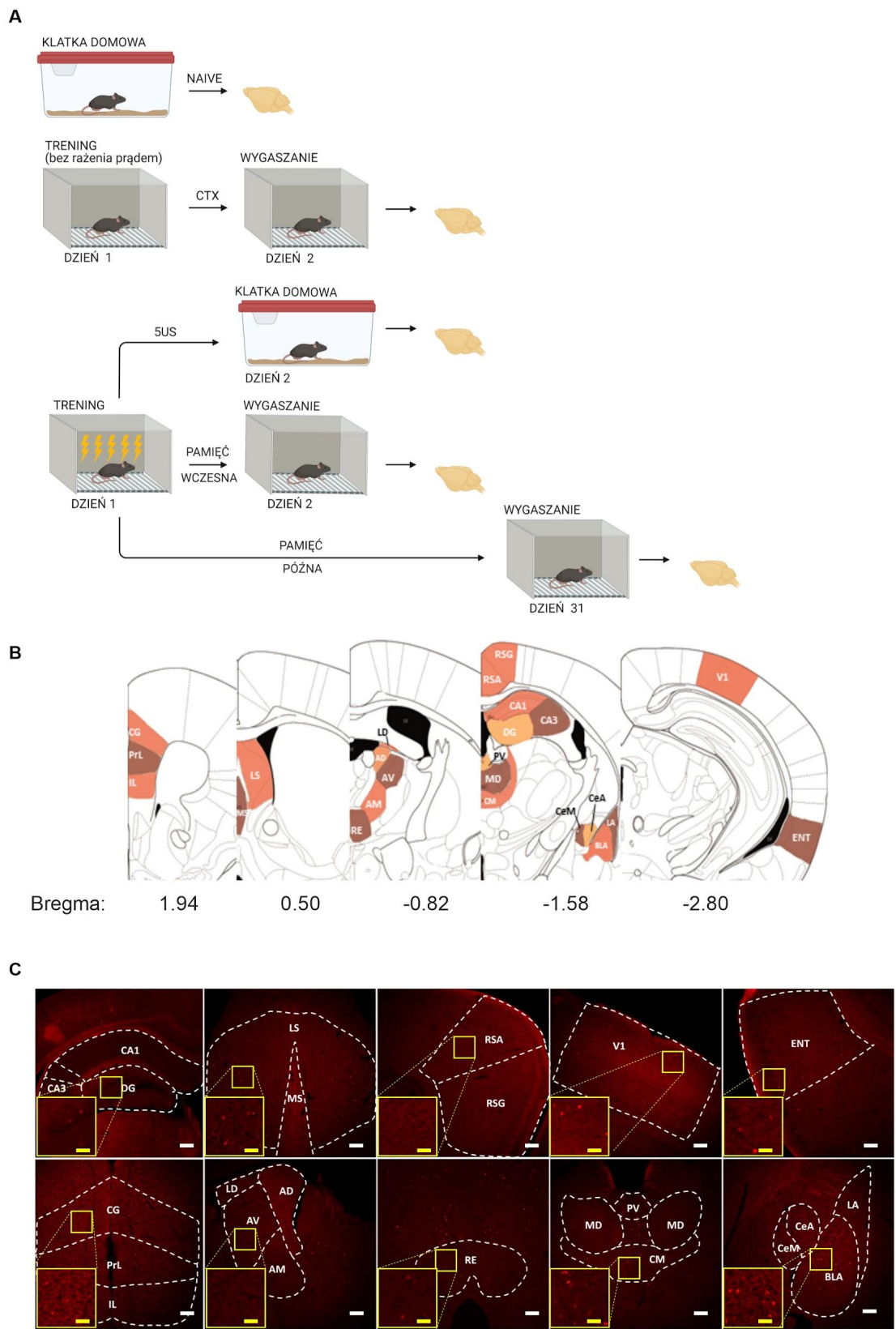
(E) W przeciwieństwie do myszy T286A^{+/-} zwierzęta kontrolne WT zamierały mniej w teście retencji aniżeli na początku wygaszania (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami, efekt treningu: $F_{1,10} = 16,91$, $P = 0,002$, efekt genotypu: $F_{1,10} = 22,55$, $P < 0,001$, wielokrotne porównania metodą Sidaka dla T286A^{+/-}: $P = 0,11$, WT: $P = 0,002$).

(F) Poziom skonsolidowanej pamięci nie różnił się jednak między genotypami (dwustronny test t-Studenta dla prób niezależnych WT vs. T286A^{+/-}: $t = 1,489$, $df = 9$, $P = 0,17$) Liczba zwierząt poddanych procedurze zawarta została w legendach do wykresów. Dane przedstawione zostały jako średnia \pm błąd standardowy (SEM);

W kolejnym doświadczeniu testowano wygaszanie późnej pamięci strachu przez myszy WT i T286A^{+/-}. Zwierzęta obu genotypów nabyły pamięć uwarunkowaną strachem, obserwowaną jako wzrost poziomu zamierania na koniec treningu. Gdy zwierzęta eksponowano na kontekst treningowy 30 dni później, myszy obu genotypów wykazały wysoki poziom zamierania, świadczący o tym że mutacja nie miała wpływu na przechowywanie i odtworzenie późnej pamięci strachu. W czasie sesji wygaszania poziom zamierania myszy WT, lecz nie T286A^{+/-} obniżał się, a podczas testu pamięci wygaszania myszy linii T286A^{+/-} zamierały istotnie dłużej aniżeli myszy WT. Niniejsze doświadczenie wskazuje, iż myszy T286A^{+/-} mają upośledzone wygaszanie późnej pamięci strachu zależnego od bodźców ogólnych. Oznacza to, że autofosforylacja T286- α CaMKII zaangażowana jest w wygaszanie późnej pamięci strachu.

4.2. Mapowanie aktywności mózgu podczas wygaszania wczesnej i późnej pamięci strachu

By poznać obszary mózgu zaangażowane w wygaszanie pamięci strachu, analizowano aktywność wybranych obszarów mózgu u myszy WT i T286A^{+/-}. Wykorzystano w tym celu barwienie immunofluorescencyjne na skrawkach mózgu z użyciem specyficznych przeciwciał wykrywających białko c-Fos, które jest markerem plastyczności neuronalnej [191–193]. W doświadczeniu użyto pięciu grup myszy dla każdego genotypu (**Rycina 6A**): 1/ wygaszanie późne (myszy sperfundowane po wygaszaniu pamięci późnej); 2/ wygaszanie wczesne (myszy sperfundowane po wygaszaniu pamięci wczesnej); 3/ naive (zwierzęta zabrane z klatki domowej i sperfundowane); 4/ kontekst (myszy eksponowane dwa razy na kontekst treningowy, z pominięciem rażenia ich prądem); 5/ 5US (myszy sperfundowano 26 godzin po treningu warunkowania strachu).



Rycina 6. Plan eksperymentu z wykazem struktur mózgu myszy poddanych analizie gęstości białka c-Fos w mózgach myszy WT oraz T286A^{+/-}

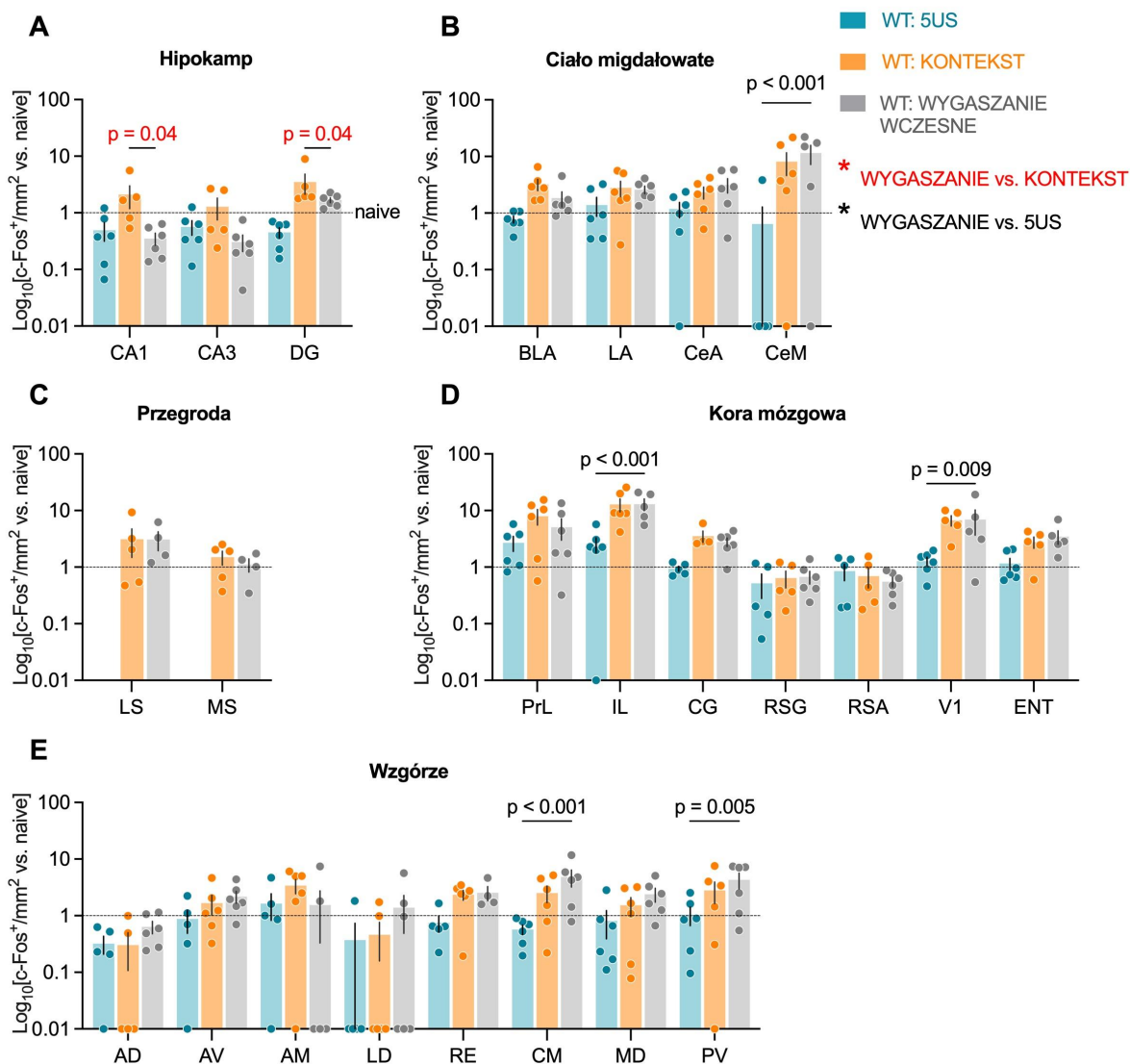
(A) W eksperymencie wykorzystano trzy grupy kontrolne: Naive, Kontekst, 5US oraz dwie grupy eksperymentalne testujące wygaszanie wczesnej i późnej pamięci strachu zależnej od bodźców ogólnych. Pełen opis grup eksperymentalnych znajduje się w podrozdziale 3.4.

(B) Reprezentacja anatomiczna testowanych struktur mózgowych (zaadaptowano z Paxinos i Frankiln 2019) wraz z ich położeniem względem bregmy (w mm).

(C) Mikrofotografie reprezentujące obraz sygnału c-Fos wraz z obrysem badanych obszarów mózgu u wybranych myszy (na podstawie Paxinos i Franklin 2019) WT z grupy eksperymentalnej testującej pamięć wygaszania pamięci strachu. W żółtej ramce przedstawiono 3x powiększenie obrazu. Poziome słupki wyznaczają skalę, przy czym kolor biały to 100 μm , kolor żółty, to 30 μm .

Myszy sperfundowano 90 minut od początku ostatniej ekspozycji na klatkę treningową. W tym punkcie czasowym po aktywacji neuronalnej obserwuje się szczytowy poziom białka c-Fos w pobudzonych komórkach, co pozwala na jego detekcję [194]. Poziom białka c-Fos (gęstość komórek c-Fos⁺) został przeanalizowany w 24 obszarach mózgu: w grzbietowym hipokampie (CA1, CA3 i DG), przegrodzie (LS i MS), korze mózgowej (PrL, IL, CG, RSG, RSA, V1, ENT), wzgórzu (AD, AV, AM, LD, CM, RE, MD, PV) oraz ciele migdałowatym (BLA, LA, CeA, CeM) (**Rycina 6B-C**).

Pomiar gęstości komórek c-Fos⁺ w mózgach myszy WT z grup 5US, Kontekst i wygaszanie wczesne, wykazał wpływ treningu na ekspresję białka c-Fos w hipokampie, korze mózgowej, wzgórzu i ciele migdałowatym. Efektu takiego nie zaobserwowano w przegrodzie. Ze względu na uszkodzenie mózgow i niewystarczającą liczbę zwierząt (n = 3) grupa 5US została wykluczona z analizy w jądrach przegrody. Istotnie niższy poziom białka c-Fos był w CA1 i DG (P = 0,04 dla obu struktur) u myszy po wygaszaniu wczesnej pamięci strachu w porównaniu z grupą Kontekst (**Rycina 7A**). Istotnie wyższy poziom c-Fos był w CeM (P < 0,001), IL (P < 0,001), V1 (P = 0,009), CM (P < 0,001) i PV (P = 0,005) po wygaszaniu pamięci strachu w porównaniu z grupą 5US (**Rycina 7B, D, E**).



Rycina 7. Wzór ekspresji białka c-Fos w badanych obszarach mózgu myszy WT w trakcie warunkowania strachu (5US), ekspozycji na bezpieczny kontekst eksperymentalny (Kontekst) i wygaszanie reakcji związanej z wczesną pamięcią strachu (PAMIĘĆ Wczesna/WYGASZANIE Wczesne).

Powyższe dane przedstawiają gęstość komórek c-Fos⁺.

(A) Wygaszanie wczesnej pamięci strachu indukuje niższą ekspresję c-Fos niż dwukrotne wystawienie zwierząt na otoczenie treningowe. Kwantyfikacja gęstości sygnału c-Fos w Hipokampie (dwukierunkowa ANOVA, interakcja trening × struktura: $F_{4, 28} = 4,481$, $P = 0,006$, efekt treningu na ekspresję c-Fos: $F_{2, 14} = 4,144$, $P = 0,04$, efekt struktury na ekspresję c-Fos: $F_{2, 28} = 13,05$, $P < 0,001$).

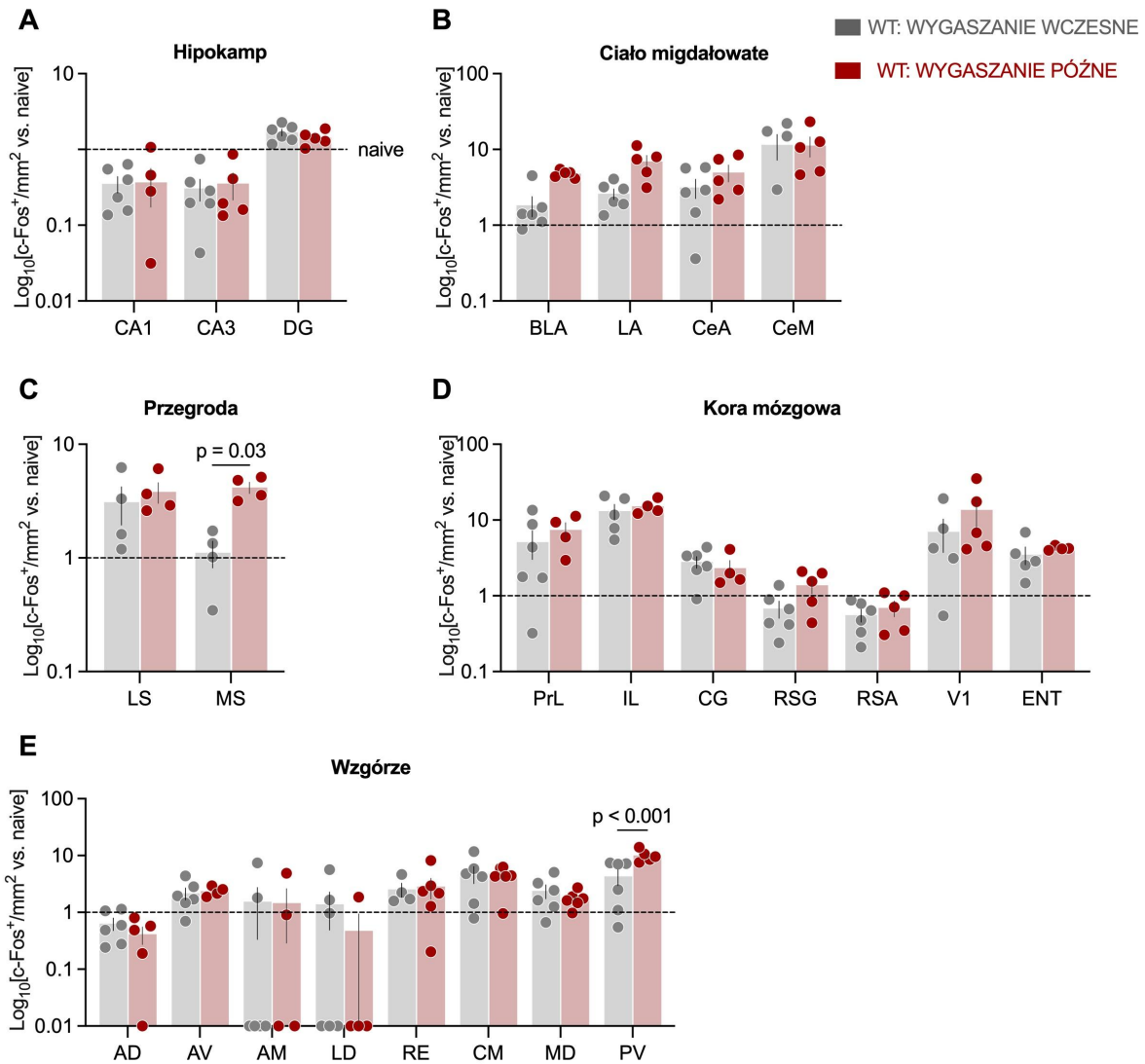
(B) Poziom ekspresji c-Fos uległ zwiększeniu w CeM po wygaszaniu wczesnej pamięci strachu względem treningu warunkowania strachu, lecz nie w stosunku do grupy kontekst. Kwantyfikacja gęstości sygnału c-Fos w Ciele migdałowatym (dwukierunkowa ANOVA, interakcja trening × struktura: $F_{6, 44} = 2,58$, $P = 0,03$, efekt treningu na ekspresję c-Fos: $F_{2, 15} = 5,092$, $P < 0,02$, efekt struktury na ekspresję c-Fos: $F_{3, 44} = 7,098$, $P < 0,001$).

(C) Kwantyfikacja gęstości sygnału c-Fos w Przegrodzie (dwukierunkowa ANOVA, interakcja trening \times struktura: $F_{1,7} = 0,025$, $P = 0,88$, efekt treningu na ekspresję c-Fos: $F_{1,7} = 0,042$, $P = 0,84$, efekt struktury na ekspresję c-Fos: $F_{1,7} = 2,43$, $P = 0,16$).

(D) Wygaszanie wczesnej pamięci strachu aktywowało ekspresję c-Fos w IL i V1 względem treningu warunkowania strachu. Kwantyfikacja gęstości sygnału c-Fos w Korze mózgowej (dwukierunkowa ANOVA, interakcja trening \times struktura: $F_{12,78} = 3,041$, $P = 0,002$, efekt treningu na ekspresję c-Fos: $F_{2,15} = 4,606$, $P = 0,03$, efekt struktury na ekspresję c-Fos: $F_{6,78} = 18,15$, $P < 0,001$).

(E) Wygaszanie wczesnej pamięci strachu aktywowało ekspresję c-Fos w CM i PV względem treningu warunkowania strachu. Kwantyfikacja gęstości sygnału c-Fos we Wzgórzach (dwukierunkowa ANOVA, interakcja trening \times struktura: $F_{14,97} = 1,824$, $P = 0,05$, efekt treningu na ekspresję c-Fos: $F_{2,15} = 3,048$, $P = 0,08$, efekt struktury na ekspresję c-Fos: $F_{7,97} = 4,779$, $P < 0,001$). Dane zostały znormalizowane do grupy NAIVE i przedstawione jako średnia \pm błąd standardowy (SEM), kropki są natomiast średnią gęstości c-Fos dla każdego zwierzęcia; wartości P z porównań pamięć wczesna vs. Kontekst zaznaczono kolorem czerwonym, z porównań pomiędzy grupą pamięci wczesnej vs. 5US kolorem czarnym; dane przedstawiają wyniki post-testów metodą Sidaka. Dla pamięci wczesnej (CA1, CA3, DG: $n = 6$; LS, MS: $n = 4$; PrL, IL, CG, RSG, RSA, V1, ENT $n = 5-6$; AD, AV, AM, LD, RE, CM, MD, PV: $n = 4-6$; BLA, LA, CeA, CeM: $n = 5-6$), dla grupy Kontekst (CA1, CA3, DG: $n = 5$; LS, MS: $n = 5$; PrL, IL, CG, RSG, RSA, V1, ENT $n = 4-6$; AD, AV, AM, LD, RE, CM, MD, PV: $n = 5-6$; BLA, LA, CeA, CeM: $n = 6$) i dla grupy 5US (CA1, CA3, DG: $n = 6$; LS, MS: grupa została wykluczona ze względu na niewystarczającą ilość zwierząt; PrL, IL, CG, RSG, RSA, V1, ENT $n = 5-6$; AD, AV, AM, LD, RE, CM, MD, PV: $n = 4-6$; BLA, LA, CeA, CeM: $n = 6$) zwierząt na grupę.

Dane literaturowe wskazują, że sieć obszarów mózgu zaangażowanych w przywoływanie wspomnień zmienia się wraz z upływem czasu [26,35]. W celu zbadania wpływu czasu na różnice w aktywacji regionów mózgu podczas wygaszania pamięci strachu, porównałem poziom białka c-Fos w mózgach myszy WT zabitych po wygaszaniu pamięci wczesnej i późnej (**Rycina 8**). Zaobserwowałem, że czas jaki upłynął od treningu wpływa na ekspresję c-Fos jedynie w przegrodzie (**Rycina 8C**). Nie zauważyłem, natomiast efektu czasu na zmianę poziomu białka c-Fos w pozostałych obszarach mózgu, tj. hipokampie, korze mózgowej, wzgórzach i ciele migdałowatym (**Rycina 8A, B, D, E**). Dalsza analiza wykazała również interakcję między strukturą mózgu a czasem we wzgórzach (**Rycina 8E**), lecz nie w pozostałych, badanych obszarach mózgu myszy WT. Istotnie podniesiony poziom białka c-Fos zaobserwowano w MS ($P = 0,03$) oraz PV ($P < 0,001$) po wygaszaniu pamięci późnej w porównaniu z wygaszaniem pamięci wczesnej (**Rycina 8C, E**).



Rycina 8. Wzór ekspresji białka c-Fos w badanych obszarach mózgu myszy WT wywołany wygaszaniem wczesnej i późnej pamięci strachu.

Powyższe dane przedstawiają gęstość komórek c-Fos⁺

(A) Kwantyfikacja gęstości sygnału c-Fos w Hipokampie (dwukierunkowa ANOVA, interakcja czas × struktura: $F_{2, 27} = 0,66$, $P = 0,52$, efekt czasu: $F_{1, 27} = 0,29$, $P = 0,59$, efekt struktury: $F_{2, 27} = 49,51$, $P < 0,001$).

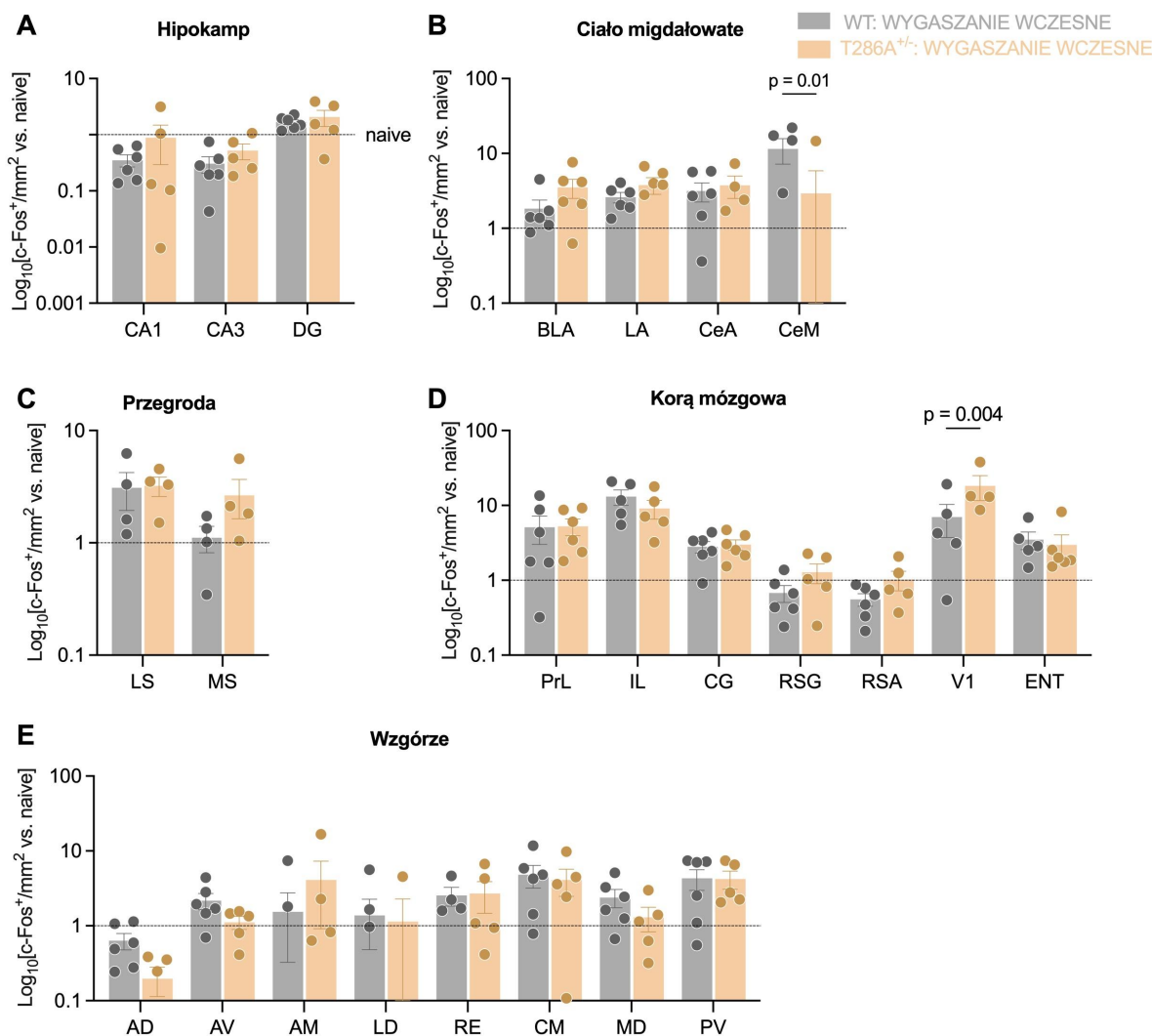
(B) Kwantyfikacja gęstości sygnału c-Fos w Ciele migdałowatym (dwukierunkowa ANOVA, interakcja czas × struktura: $F_{3, 35} = 0,482$, $P = 0,7$, efekt czasu: $F_{1, 35} = 2,663$, $P = 0,11$, efekt struktury: $F_{3, 35} = 7,048$, $P < 0,001$).

(C) Wygaszanie późnej pamięci strachu indukuje wyższy poziom ekspresji c-Fos w MS niż wygaszanie pamięci wczesnej strachu. Kwantyfikacja gęstości sygnału c-Fos w Przegrodzie (dwukierunkowa ANOVA, interakcja czas × struktura: $F_{1, 12} = 2,43$, $P = 0,14$, efekt czasu: $F_{1, 12} = 6,365$, $P = 0,03$, efekt struktury: $F_{1, 12} = 1,169$, $P = 0,3$).

(D) Kwantyfikacja gęstości sygnału c-Fos w Korze mózgowej (dwukierunkowa ANOVA, interakcja czas × struktura: $F_{6, 56} = 0,598$, $P = 0,73$, efekt czasu: $F_{1, 56} = 2,209$, $P = 0,14$, efekt struktury: $F_{6, 56} = 10,29$, $P < 0,001$).

(E) Wygaszanie pamięci wczesnej strachu indukuje wyższy poziom ekspresji c-Fos w PV niż wygaszanie pamięci wczesnej strachu. Kwantyfikacja gęstości sygnału c-Fos we Wzgórzu (dwukierunkowa ANOVA, interakcja czas \times struktura: $F_{7,70} = 2,706$, $P = 0,02$, efekt czasu: $F_{1,70} = 1,079$, $P = 0,3$, efekt struktury: $F_{7,70} = 11,05$, $P < 0,001$). Dane zostały znormalizowane do grupy Naive i przedstawione jako średnia \pm błąd standardowy (SEM); kropki są natomiast średnią gęstości c-Fos dla każdego zwierzęcia, post-testy przeprowadzono metodą Sidaka. Dla pamięci wczesnej (CA1, CA3, DG: $n = 6$; LS, MS: $n = 4$; PrL, IL, CG, RSG, RSA, V1, ENT $n = 5-6$; AD, AV, AM, LD, RE, CM, MD, PV: $n = 4-6$; BLA, LA, CeA, CeM: $n = 5-6$) i dla pamięci późnej (CA1, CA3, DG: $n = 5$; LS, MS: $n = 4$; PrL, IL, CG, RSG, RSA, V1, ENT $n = 4-5$; AD, AV, AM, LD, RE, CM, MD, PV: $n = 4-6$; BLA, LA, CeA, CeM: $n = 5$) zwierząt na grupę.

Analiza ekspresji białka c-Fos w mózgach myszy WT i T286A^{+/-} zabitych po sesji wygaszania pamięci wczesnej wykazała istotny wpływ obszaru mózgu na gęstość komórek c-Fos⁺ w hipokampie i we wzgórzu (**Rycina 9A, E**); interakcję pomiędzy genotypem a strukturą w ciele migdałowatym (**Rycina 9B**) i korze mózgowej (**Rycina 9D**) oraz brak wpływu badanych czynników i interakcji na gęstość komórek c-Fos⁺ w przegrodzie (**Rycina 9C**). Nie zaobserwowałem wpływu genotypu na poziom białka c-Fos w żadnym z badanych obszarów mózgu. U myszy T286A^{+/-} test *post hoc* metodą Sidaka ujawniły zwiększoną gęstość komórek c-Fos⁺ w V1 ($P = 0,004$) (**Rycina 9D**) oraz obniżoną w CeM ($P = 0,01$) (**Rycina 9B**), w porównaniu z grupą WT.



Rycina 9. Wzór ekspresji białka c-Fos w badanych obszarach mózgu myszy WT i T286A^{+/-} wywołany wygaszaniem wczesnej pamięci strachu.

Powyższe dane przedstawiają gęstość komórek c-Fos⁺

(A) Kwantyfikacja gęstości sygnału c-Fos w Hipokampie (dwuczynnikowa ANOVA interakcja genotyp × struktura: $F_{2, 27} = 0,105$, $P = 0,9$, efekt genotypu: $F_{1, 27} = 1,795$, $P = 0,192$, efekt struktury: $F_{1, 27} = 10,39$, $P < 0,001$).

(B) Późne wygaszanie pamięci strachu indukuje niższy poziom ekspresji c-Fos w CeM względem wygaszania wczesnej pamięci strachu. Kwantyfikacja gęstości sygnału c-Fos w Ciele migdałowatym (dwuczynnikowa ANOVA, interakcja genotyp × struktura: $F_{3, 36} = 3,4$, $P = 0,03$, efekt genotypu: $F_{1, 36} = 0,952$, $P = 0,34$, efekt struktury: $F_{3, 36} = 2,482$, $P = 0,08$).

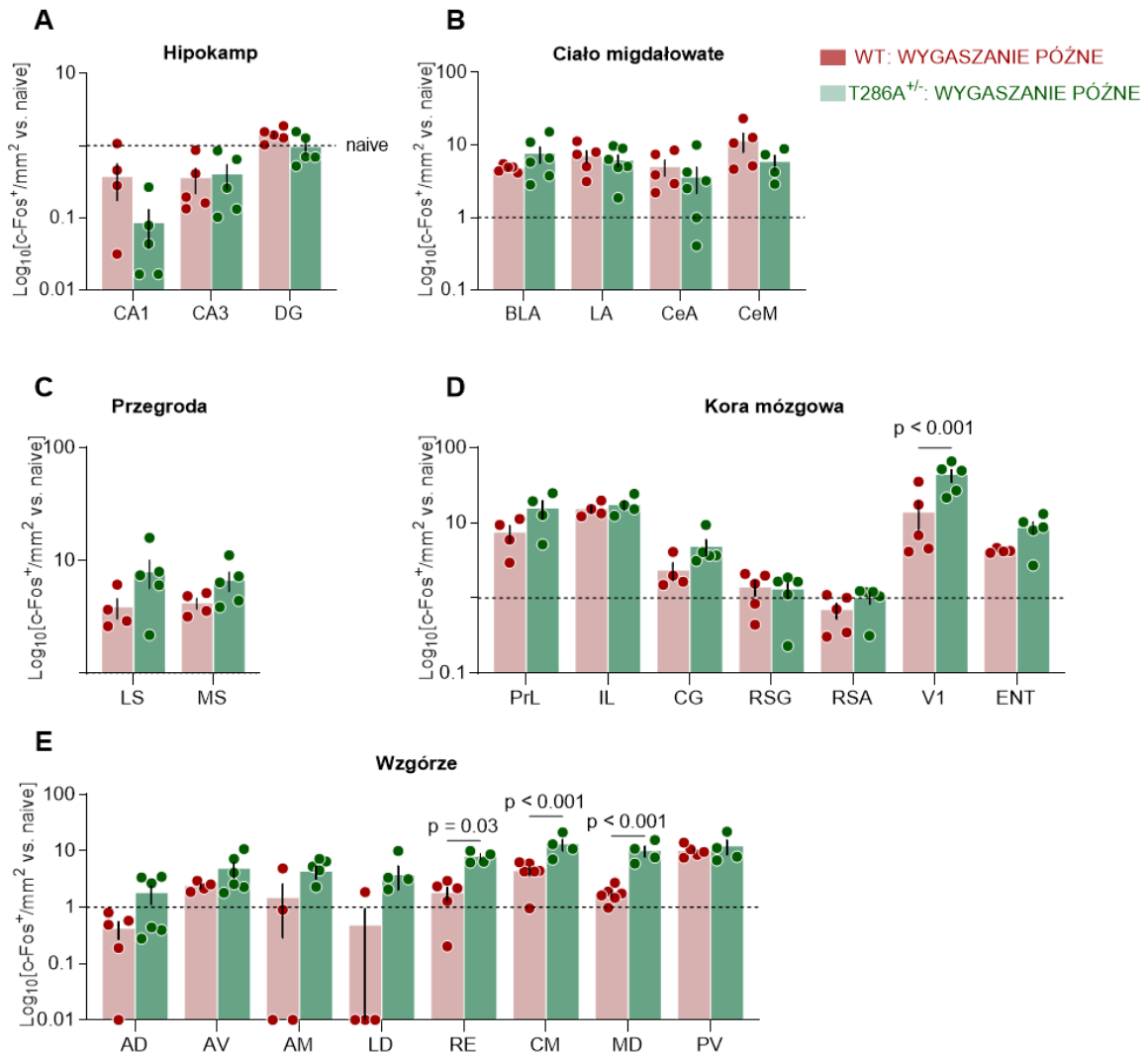
(C) Kwantyfikacja gęstości sygnału c-Fos w Przegrodzie (dwuczynnikowa ANOVA, interakcja genotyp × struktura: $F_{1, 12} = 0,707$, $P = 0,42$, efekt genotypu: $F_{1, 12} = 0,989$, $P = 0,34$, efekt struktury: $F_{1, 12} = 2,303$, $P = 0,16$).

(D) Późne wygaszanie pamięci strachu indukuje wyższy poziom ekspresji c-Fos w V1 względem wygaszania wczesnej pamięci strachu. Kwantyfikacja gęstości sygnału c-Fos w

Korze mózgowej (dwukierunkowa ANOVA, genotyp \times struktura: $F_{6,62} = 2,427$, $P = 0,04$, efekt genotypu: $F_{1,62} = 1,28$, $P = 0,26$, efekt struktury: $F_{6,62} = 10,58$, $P < 0,001$)

(E) Kwantyfikacja gęstości sygnału c-Fos we Wzgórzu (dwukierunkowa ANOVA interakcja genotyp \times struktura: $F_{7,69} = 0,461$, $P = 0,86$, efekt genotypu: $F_{1,69} = 0,035$, $P = 0,85$, efekt struktury: $F_{7,69} = 2,667$, $P = 0,02$). Dane zostały znormalizowane do grupy WT NAIVE i przedstawione jako średnia \pm błąd standardowy (SEM), kropki są natomiast średnią gęstości c-Fos dla każdego zwierzęcia, post-testy przeprowadzono metodą Sidaka. Dla myszy WT (CA1, CA3, DG: $n = 6$; LS, MS: $n = 4$; PrL, IL, CG, RSG, RSA, V1, ENT $n = 5-6$; AD, AV, AM, LD, RE, CM, MD, PV: $n = 4-6$; BLA, LA, CeA, CeM: $n = 5-6$) i dla myszy T286A^{+/-} (CA1, CA3, DG: $n = 5$; LS, MS: $n = 4$; PrL, IL, CG, RSG, RSA, V1, ENT $n = 4-6$; AD, AV, AM, LD, RE, CM, MD, PV: $n = 5-6$; BLA, LA, CeA, CeM: $n = 4-6$) zwierząt na grupę.

Analiza ekspresji białka c-Fos w mózgach myszy WT i T286A^{+/-} zabitych po sesji wygaszania pamięci późnej wykazała istotny wpływ struktury na gęstość komórek c-Fos⁺ w hipokampie (**Rycina 10A**); istotny wpływ genotypu i struktury, oraz istotną interakcję pomiędzy tymi czynnikami w korze mózgowej i wzgórzu (**Rycina 10D-E**). W ciele migdałowatym i przegrodzie nie zaobserwowano wpływu żadnego z czynników na poziom ekspresji c-Fos (**Rycina 10B-C**). Jak wykazały testy post hoc, u myszy genotypu T286A^{+/-} zaobserwowano wyższe niż u WT poziomy gęstości komórek c-Fos⁺ w V1 ($P < 0,001$), RE ($P = 0,03$), CM ($P < 0,001$) oraz MD ($P < 0,001$) (**Rycina 6D-E**).



Rycina 10, Wzór ekspresji białka c-Fos w badanych obszarach mózgu myszy WT i T286A^{+/-} wywołany wygaszaniem reakcji związanej z późną pamięcią strachu.

Powyższe dane przedstawiają gęstość komórek c-Fos⁺

(A) Kwantyfikacja gęstości sygnału c-Fos w Hipokampie dwuczynnikowa ANOVA, interakcja genotyp × struktura: $F_{2, 24} = 1,507$, $P = 0,24$, efekt genotypu: $F_{1, 24} = 3,672$, $P = 0,07$, efekt struktury: $F_{2, 24} = 23,07$, $P < 0,001$),

(B) Kwantyfikacja gęstości sygnału c-Fos w Ciele migdałowatym (dwuczynnikowa ANOVA: interakcja genotyp × struktura: $F_{3, 34} = 1,753$, $P = 0,17$, efekt genotypu: $F_{1, 34} = 1,013$, $P = 0,32$, efekt struktury: $F_{3, 34} = 1,943$, $P = 0,14$).

(C) Kwantyfikacja gęstości sygnału c-Fos w Przegrodzie (interakcja genotyp × struktura: $F_{1, 14} = 0,292$, $P = 0,60$, efekt genotypu: $F_{1, 14} = 4,568$, $P = 0,05$, efekt struktury: $F_{1, 14} = 0,092$, $P = 0,77$).

(D) Wygaszanie pamięci późnej strachu indukowało wyższy poziom ekspresji c-Fos w V1 u myszy T286A^{+/-} względem WT. Kwantyfikacja gęstości sygnału c-Fos w Korze mózgowej (dwuczynnikowa ANOVA dla kory mózgowej: interakcja genotyp × struktura: $F_{6, 50} = 5,347$, $P < 0,001$, efekt genotypu: $F_{1, 50} = 13,97$, $P < 0,001$, efekt struktury: $F_{6, 50} = 19,1$, $P < 0,001$),

(E) Wygaszanie pamięci późnej strachu indukowało wyższy poziom ekspresji c-Fos w RE, CM i MD u myszy T286A^{+/-} względem WT. Kwantyfikacja gęstości sygnału c-Fos we Wzgórzu (dwukierunkowa ANOVA, interakcja genotyp × struktura: $F_{7, 62} = 2,279$, $P = 0,04$, efekt genotypu: $F_{1, 62} = 40,10$, $P < 0,001$, efekt struktury: $F_{7, 62} = 12,30$, $P < 0,001$). Dane zostały znormalizowane do grupy WT Naive i przedstawione jako średnia ± błąd standardowy (SEM), kropki są natomiast średnią gęstości c-Fos dla każdego zwierzęcia; post-testy przeprowadzono metodą Sidaka. Dla myszy WT (CA1, CA3, DG: n = 5; LS, MS: n = 4; PrL, IL, CG, RSG, RSA, V1, ENT n = 4-5; AD, AV, AM, LD, RE, CM, MD, PV: n = 4-6; BLA, LA, CeA, CeM: n = 5) i dla myszy T286A^{+/-} (CA1, CA3, DG: n = 5; LS, MS: n = 5; PrL, IL, CG, RSG, RSA, V1, ENT n = 4-6; AD, AV, AM, LD, RE, CM, MD, PV: n = 4-6; BLA, LA, CeA, CeM: n = 4-6) zwierząt na grupę.

Podsumowując, uzyskane dane pokazują, że wygaszanie wczesnej pamięci strachu wiąże się z indukcją ekspresji białka c-Fos w korze (IL, V1), wzgórzu (CM), i ciele migdałowatym (CeM) w porównaniu z poziomem ekspresji obserwowanym u zwierząt poddanych tylko treningowi warunkowania klasycznego bez sesji wygaszania. Poza hipokampem nie zaobserwowano różnic między grupą poddaną treningowi wygaszania a grupą kontrolną "Kontekst".

Aktywność większości badanych obszarów mózgu myszy WT nie różniła się znacząco między grupami które przeszły wygaszanie pamięci wczesnej i późnej. Zaobserwowano jedynie podwyższony poziom białka c-Fos w PV i MS u myszy po wygaszaniu pamięci późnej, w porównaniu z wygaszaniem pamięci wczesnej. Zebrane dane pokazują również, że wzór aktywności analizowanych obszarów mózgu po wygaszaniu pamięci wczesnej nie różnił się istotnie pomiędzy myszami WT i T286A^{+/-}. Zaobserwowano jedynie podwyższony poziom białka c-Fos w V1 i obniżony w CeM u myszy T286A^{+/-}. Sugeruje to, że podczas wygaszania wczesnej pamięci strachu aktywność obu tych struktur jest regulowana przez autofosforylację αCaMKII.

Ponadto, myszy charakteryzujące się upośledzeniem wygaszania późnej pamięci uwarunkowanego strachu (T286A^{+/-}) prezentują wyższą aktywność kory sensorycznej (V1) i wzgórza (RE, CM i MD). Sugeruje to, iż struktury te są zaangażowane w wygaszanie późnej pamięci strachu, a ich aktywność regulowana jest przez autofosforylację αCaMKII.

4.3. Walidacja metody chemogenetycznego hamowania aktywności komórek nerwowych

Technika DREADD pozwala na manipulację aktywnością komórek nerwowych u swobodnie poruszających się zwierząt. Umożliwia to określenie funkcji wybranego obszaru

mózgu, lub obwodu neuronalnego, w regulacji zachowania zwierząt [195]. W kolejnym etapie rozprawy doktorskiej postanowiłem wykorzystać tę technikę do zweryfikowania funkcji obszarów mózgu o podwyższonej aktywności w czasie wygaszania pamięci strachu w tym procesie.

Na wstępie zweryfikowałem skuteczność techniki manipulacji chemogenetycznej *in vivo*. Po pierwsze testowałem czy aktywacja hamujących receptorów DREADD (hM4Di) hamuje aktywność neuronów, po drugie testowałem czy ligand receptorów hM4Di, CNO, wpływa na powstawanie i wygaszanie długotrwałej pamięci strachu w sytuacji gdy w mózgu nie ma receptorów DREADD .

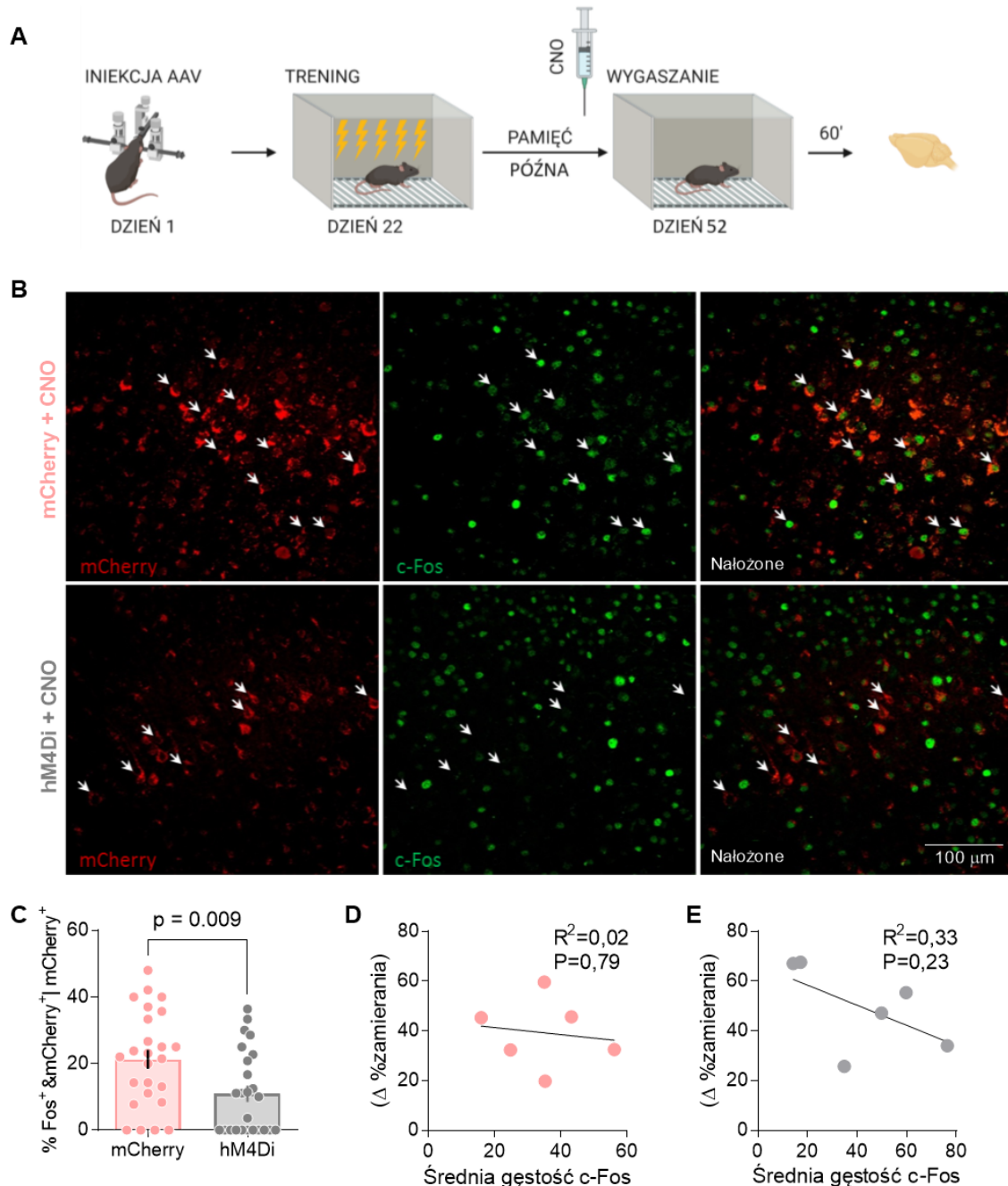
4.3.1. Immunofluorescencyjna walidacja systemu DREADD i jego wpływu na hamowanie aktywności neuronów w myszach linii C57BL/6J

W celu zweryfikowania czy system DREADD hamuje aktywność neuronów, myszy C57BL/6J poddano operacji stereotaktycznej w czasie której wprowadzono obustronnie do V1 wektory wirusowe kodujące hamujący receptor DREADD, hM4Di (hSyn1-hM4Di-mCherry), lub w grupie kontrolnej wektor zawierający jedynie mCherry. Po 3 tygodniach (czas pozwalający na optymalną ekspresję wprowadzonych wektorów wirusowych) zwierzęta przeszły trening warunkowania klasycznego. Dwadzieścia cztery godziny później myszy otrzymały dootrzewnowy zastrzyk CNO (3 mg/kg masy ciała) i przeprowadzono sesję wygaszania pamięci strachu (Patrz: rozdział 3.4.). Zwierzęta uśmiercono i ich mózgi wypreparowano 60 min. po zakończeniu sesji wygaszania. Skrawki utrwalonych mózgow użyto do immunofluorescencyjnej detekcji białka c-Fos z użyciem specyficznych przeciwciał (**Rycina 11A**).

Komórki c-Fos⁺ i mCherry⁺ wykryte za pomocą barwienia immunofluorescencyjnego liczone były w V1 na minimum 4 skrawkach na zwierzę. Mikrofotografie przedstawiające sygnał fluorescencyjny białka mCherry, c-Fos oraz nałożonych obu barwień przedstawiono na **Rycinie 11B**. Aktywność komórek transdukowanych wektorami wirusowymi oszacowano według następującego równania: liczba komórek wykazujących ekspresję c-Fos⁺&mCherry⁺/liczba komórek mCherry⁺. Po podaniu CNO, zaobserwowano obniżoną częstość ekspresji c-Fos wśród komórek transdukowanych wirusem hSyn1-hM4Di w porównaniu z komórkami transdukowanymi wirusem kontrolnym (**Rycina 11C**). Ponadto, porównałem zmianę zachowania zwierząt w trakcie sesji wygaszania (Δ %zamierania) ze średnim poziomem gęstości białka c-Fos w V1 (**Rycina 11D-E**). W tym celu obliczyłem różnicę poziomów zamierania pomiędzy 5. a 30, minutą sesji wygaszania, a jej wynik skorelowałem ze średnią gęstością komórek c-Fos⁺ w V1. Wykreślona prosta regresji opisująca korelację w obu

grupach wykazała brak zależności pomiędzy zmianą w zamieraniu zwierząt a poziomem ekspresji c-Fos (Rycina 11E).

Zebrane obserwacje dowodzą, że CNO istotnie obniża aktywność komórek wykazujących ekspresję receptora hM4Di.



Rycina 11. Immunofluorescencyjna walidacja techniki DREADD i jej wpływu na hamowanie aktywności neuronów w myszach linii C57BL/6J.

(A) Oś czasu eksperymentu: myszom C57BL/6J wprowadzono wektor wirusowy (kontrolny mCherry lub hSyn1-hM4Di-mCherry) do V1. Po upływie 3 tygodni, zwierzęta przeszły trening klasycznego warunkowania strachu, by 30 dni później poddać je treningowi wygaszania strachu wywołanego warunkowaniem klasycznym. Trening wygaszania został poprzedzony dootrzewnowym podaniem ligandu CNO. W 60 min. od zakończenia procedury, zwierzęta skrwawiono w wyniku perfuzji przezsercowej i pobrano tkankę mózgową.

(B) Sygnał mCherry (w pierwszej kolumnie) oznaczony kolorem czerwonym, c-Fos (w drugiej kolumnie) kolorem zielonym. Kolumna trzecia reprezentuje kolokalizację obu sygnałów. Sygnał immunofluorescencyjny dla komórek posiadających konstrukt mCherry (pierwszy rząd) oraz komórek posiadających konstrukt hSyn1-hM4Di-mCherry (drugi rząd). Białe strzałki wskazują niektóre komórki wykazujące ekspresję białka reporterowego mCherry i służą jako pomoc w nawigowaniu między kanałami mikrofotografii.

(C) Podanie CNO przed rozpoczęciem sesji wygaszania obniża prawdopodobieństwo wystąpienia kolokalizacji sygnału c-Fos w neuronach wykazujących ekspresję hSyn1-hM4Di-mCherry w V1, po wygaszaniu późnej pamięci strachu. Test t Studenta dla prób niezależnych, $t = 2,102$, $df = 49$, $P = 0,04$. $N = 6/25$ (mCherry), $6/26$ (hSyn1-hM4Di-mCherry) zwierząt/fotografii na grupę.

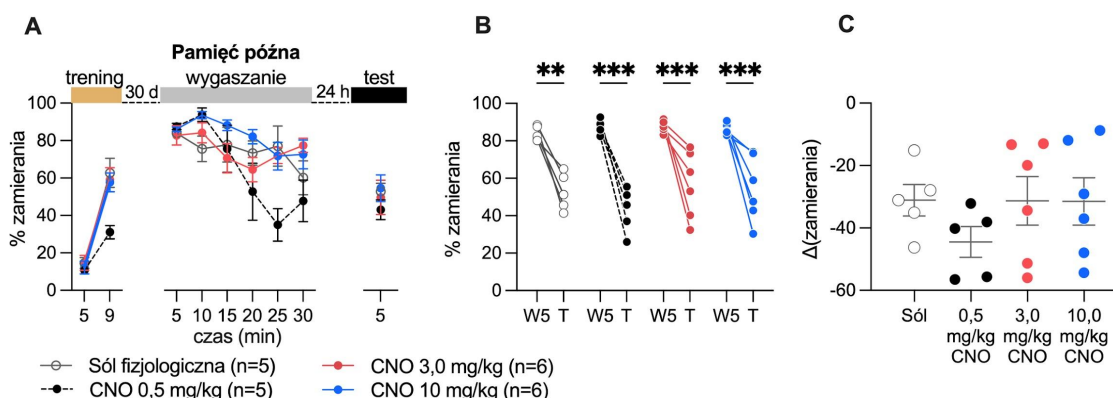
(D) Korelacja pomiędzy zmianą w poziomie zamierania (zamieranie na koniec sesji wygaszania - zamieranie na początku sesji wygaszania ; Δ %zamierania) a średnią gęstością c-Fos w grupie zwierząt mCherry (test istotności korelacji Pearsona: $r = -0,1429$, $P = 0,79$)

(E) Korelacja pomiędzy zmianą w poziomie zamierania, a średnią gęstością c-Fos w grupie zwierząt hSyn-hM4Di-mCherry (test istotności korelacji Pearsona: $r = -0,575$, $P = 0,23$).

4.3.2. Ocena wpływu CNO na zachowanie zwierząt podczas treningu wygaszania pamięci strachu

Wbrew pierwotnym założeniom CNO nie jest związkiem obojętnym farmakologicznie [196,197]. W czasie przechodzenia przez barierę krew-mózg CNO jest metabolizowany do klozapiny - antagonisty receptorów serotoninerdycznych i dopaminergicznych. CNO może zatem wpływać zarówno na aktywność neuronów jak i zachowanie zwierząt także bez receptorów DREADD [196,197]. W związku z tym zdecydowałem się przetestować wpływ CNO na zachowanie zwierząt podczas treningu wygaszania pamięci strachu. Zbadałem 3 dawki CNO: 0.5, 3 i 10 mg/kg (rozpuszczone w soli fizjologicznej), porównywane do grupy kontrolnej, w której myszy otrzymały zastrzyk soli fizjologicznej. Myszy C57BL/6J poddano treningowi warunkowania klasycznego. Po 30 dniach, podano im dootrzewnowo roztwór CNO, lub soli fizjologicznej, i po 30 minutach przeprowadzono sesję wygaszania. 24 godziny później przeprowadzono test pamięci wygaszania (Patrz: **podrozdział 3.4.**). Nie zauważyłem wpływu CNO na zachowanie myszy ani w czasie sesji wygaszania ani w teście wygaszania. Oznacza to, że CNO w żadnej z badanych dawek nie upośledza wygaszania pamięci strachu.

Na podstawie powyższych obserwacji oraz literatury podjąłem decyzję o zastosowaniu CNO w dawce 3 mg/kg w kolejnych doświadczeniach.



Rycina 12. Dawka CNO nie wpływa na skuteczność wygaszanie późnej pamięci strachu zależnego od bodźców ogólnych.

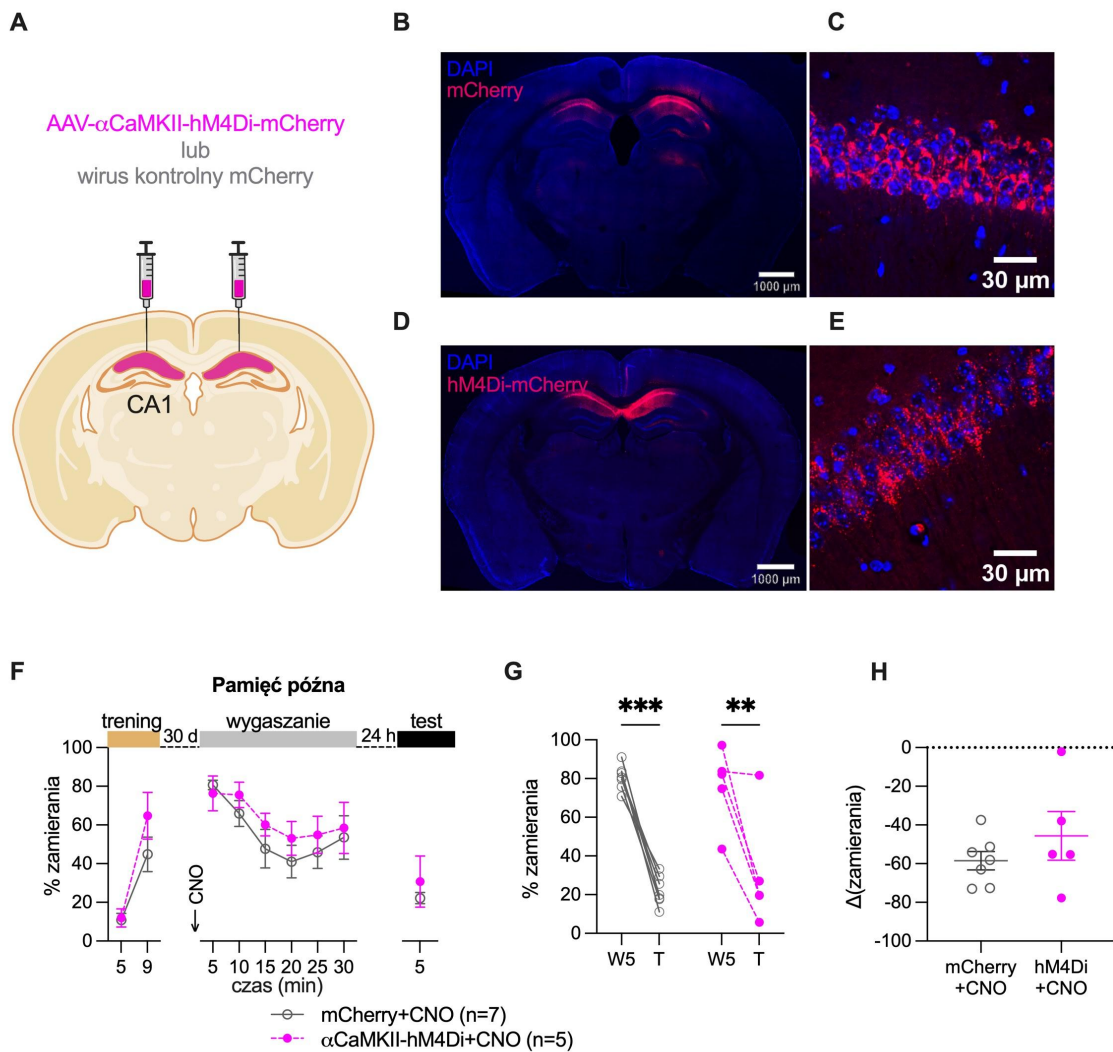
(A) Górny panel wykresu przedstawia oś czasu eksperymentu, dolny panel poziomy zamierania myszy C57BL/6J podczas treningu warunkowania klasycznego, treningu wygaszania i testu retencji pamięci wygaszania. Test wpływu dawki CNO został przeprowadzony na nieoperowanych myszach C57BL/6J, które na 30 min przed rozpoczęciem sesji wygaszania otrzymały dootrzewnowo iniekcję z CNO rozpuszczonego w soli fizjologicznej, lub w przypadku grupy kontrolnej samej soli fizjologicznej. Grupa myszy, w której badano CNO w dawce 0,5 mg/kg, w porównaniu do grupy kontrolnej (Sól fizjologiczna) i pozostałych dawek CNO (3 i 10 mg/kg) wykazała istotnie niższy poziom kodowanej pamięci uwarunkowanej strachem (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami, interakcja trening × dawka CNO: $F_{3, 19} = 5,908$, $P = 0,005$, efekt treningu $F_{1, 19} = 244,3$, $P < 0,001$, efekt dawki: $F_{3, 19} = 3,463$, $P = 0,04$, efekt różnicy między zwierzętami: $F_{19, 19} = 2,729$, $P = 0,02$). Zauważono istotnie statystyczny wpływ dawki na poziom zamierania zwierząt w trakcie sesji wygaszania pamięci związanej z późną pamięcią strachu (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami, interakcja trening × dawka CNO: $F_{15, 95} = 2,822$, $P = 0,001$, efekt treningu $F_{3, 19} = 2,593$, $P < 0,001$, efekt dawki: $F_{3, 19} = 3,463$, $P = 0,08$, efekt różnicy między zwierzętami: $F_{19, 95} = 2,845$, $P < 0,001$). Różnic nie zauważono natomiast w teście retencji pamięci wygaszania (jednoczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami, efekt dawki: $F_{3, 19} = 0,426$, $P = 0,74$).

(B-C) Zarówno zwierzęta kontrolne jak i traktowane CNO nabyły i skonsolidowały pamięć wygaszania strachu (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami, efekt treningu: $F_{1, 18} = 104$, $P < 0,001$, wielokrotne porównania metodą Sidaka dla grupy kontrolnej: $P = 0,001$, 0,5 mg/kg: $<0,001$, 3 mg/kg: $<0,001$ i 10 mg/kg: $<0,001$), a zmiana w poziomie zamierania nie różniła się istotnie statystycznie między grupami (jednoczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami: $F_{3, 18} = 0,8892$, $P = 0,47$). Liczba zwierząt poddanych procedurze zawarta została w legendach do wykresów. Dane przedstawione zostały jako średnia ± błąd standardowy (SEM); ** $P < 0,005$, *** $P < 0,001$

4.4. Rola grzbietowego pola CA1 w wygaszaniu późnej pamięci strachu

Zarówno nabywanie jak i wygaszanie pamięci bodźców ogólnych zależą od hipokampa [92,198–200]. Jednak udział hipokampa w przetwarzaniu późnej pamięci jest tematem badań naukowych od wielu lat [26,29,38,201]. Ponieważ w pierwszym przeprowadzonym przeze mnie eksperymencie zauważyłem, że gęstość komórek c-Fos⁺ jest obniżona w CA1 i DG po wygaszaniu pamięci strachu, w porównaniu z grupą Kontekst, w kolejnym doświadczeniu testowałem rolę neuronów pola CA1 hipokampa w wygaszaniu późnej pamięci strachu. W tym celu zastosowałem wektor wirusowy kodujący hM4Di pod promotorem genu *CaMKII2a*, który wprowadziłem do grzbietowej części pola CA1 (dCA1) myszy C57BL/6J. W grupie kontrolnej użyto wektor wirusowy mCherry (**Rycina 13A-E**). Zwierzęta obu grup wykazały wysoki poziom zamierania w końcowej fazie treningu. Myszy otrzymały zastrzyk CNO 30 minut przed sesją wygaszania. Zwierzęta z obu grup doświadczalnych miały wysoki poziom zamierania na początku sesji wygaszania i poziom ten spadł na koniec sesji. Nie stwierdzono wpływu wirusa na poziom zamierania podczas sesji wygaszania pamięci strachu. Nie zauważono też wpływu wirusa na poziom zamierania w czasie testu, ani na zmianę poziomu zamierania w czasie testu w porównaniu z sesją wygaszania (**Rycina 13F-H**).

Obserwacje te sugerują, iż chemogenetyczne zahamowanie komórek glutaminianergicznym dCA1 nie wpływa na przywoływanie i wygaszanie późnej pamięci strachu.



Rycina 13. Inaktywacja neuronów pobudzających w CA1 nie wpływa na wygaszanie reakcji związanej z późną pamięcią strachu.

(A) AAV- α CaMKII-hM4Di-mCherry (α CaMKII-hM4Di) lub wirus kontrolny (mCherry) zostały podane bilateralnie do CA1 samców myszy C57BL/6J. Stworzono w Biorender.

(B) Mikrofotografia reprezentująca neurony CA1 transdukowane wirusem kontrolnym wraz z powiększeniem skanu (C), kolorem niebieskim oznaczono kanał DAPI, kolorem czerwonym kanał mCherry

(D) Mikrofotografia reprezentująca neurony dCA1 transdukowane wirusem α CaMKII-hM4Di wraz z powiększeniem skanu (E).

(F) Górny panel: oś eksperymentu, dolny panel: poziomy zamierania zwierząt podczas treningu myszy α CaMKII-hM4Di oraz kontrolnych mCherry. Myszy obu grup nabyły pamięć strachu w trakcie treningu klasycznego warunkowania strachu (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami, efekt treningu: $F_{1, 10} = 41,54$, $P < 0,001$). Po 30 dniach CNO (3 mg/kg) zostało podane na 30 minut przed sesją wygaszania, w której nie zaobserwowano różnic w poziomie zamierania między grupą α CaMKII-hM4Di a grupą myszy kontrolnych mCherry (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami, α CaMKII-hM4Di vs. mCherry: $F_{1, 10} = 0,526$. $P = 0,48$, efekt treningu: $F_{5, 50} = 9,091$, $P < 0,001$). Następnego dnia

przeprowadzono test konsolidacji pamięci wygaszania reakcji strachu (dwustronny test t-Studenta dla prób niezależnych α CaMKII-hM4Di vs. kontrola mCherry: $t = 0,745$, $df = 10$, $P = 0,47$).

(G-H) Zarówno zwierzęta kontrolne mCherry jak i α CaMKII-hM4Di nabyły i skonsolidowały pamięć wygaszania strachu (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami, efekt treningu: $F_{1,10} = 76,94$, $P < 0,001$, wielokrotne porównania metodą Sidaka dla α CaMKII-hM4Di: $P = 0,001$ i mCherry: $P < 0,001$), a zmiana w poziomie zamierania nie różniła się istotnie statystycznie między grupami (dwustronny test t-Studenta dla prób niezależnych α CaMKII-hM4Di vs. mCherry: $t = 1,084$, $df = 10$, $P = 0,30$). Liczba zwierząt poddanych procedurze zawarta została w legendach do wykresów. Dane przedstawione zostały jako średnia \pm błąd standardowy; ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

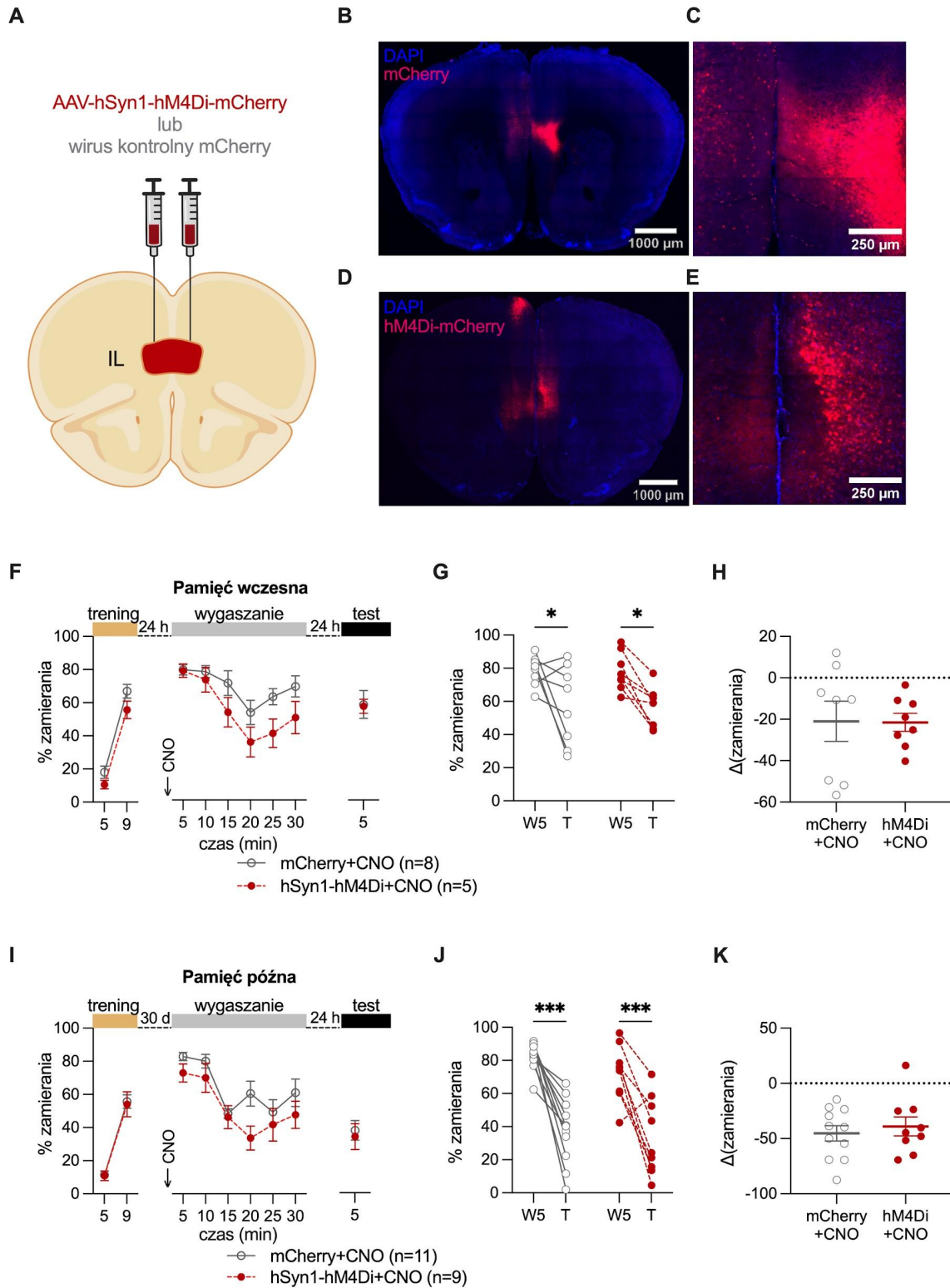
4.5. Rola kory IL w wygaszaniu pamięci strachu

Wcześniejsze prace wykazały, że kora infralimbiczna (IL) jest zaangażowana w wygaszanie pamięci strachu [114,118,139,140]. Zgodnie z tymi obserwacjami w eksperymencie, w którym analizowałem aktywność mózgu w czasie wygaszania pamięci strachu (patrz: **podrozdział 4.2.**), zaobserwowałem istotny wzrost gęstości komórek c-Fos+ w IL w grupie poddanej sesji wygaszania w porównaniu z grupą poddaną jedynie treningowi klasycznego warunkowania strachu. By zweryfikować czy IL reguluje wygaszanie strachu wykorzystałem samce myszy C57BL/6J, którym stereotaktycznie wprowadziłem do IL wektory wirusowe hSyn1-hM4Di lub kontrolne, mCherry (**Rycina 14A-E**). Po 3 tygodniach, zwierzęta przeszły trening warunkowania klasycznego, w którym początkowo wykazały niski poziom zamierania (5 min). Poziom zamierania znacząco wzrósł w czasie treningu. Po 24 godzinach myszom podano CNO (3 mg/kg) i 30 minut później przeszły sesję wygaszania strachu. Na początku sesji wygaszania poziom zamierania był wysoki, wskazując, że myszy były zdolne do przywołania wczesnej pamięci strachu. Następnego dnia przeprowadzono test pamięci wygaszania. W obu grupach doświadczalnych poziom zamierania był niższy niż na początku sesji wygaszania (**Rycina 14F-G**). Nie zauważono różnicy między grupami eksperymentalnymi w poziomie zamierania ani w czasie testu, ani w spadku częstości zamierania w czasie testu w porównaniu z sesją wygaszania (**Rycina 14H**).

Następnie, testowałem rolę IL w wygaszaniu późnej pamięci strachu. W tym celu użyłem nowej grupy myszy, którym podałem do IL wirusy hSyn1-hM4Di lub mCherry. Obie grupy zwierząt wykazały wysoki poziom zamierania na koniec sesji treningowej świadczący o nabywaniu pamięci strachu. Trzydzieści dni później podano im dootrzewnowo roztwór CNO (3 mg/kg) i po 30 minutach rozpoczęła się sesja wygaszania. W czasie sesji wygaszania poziomy zamierania myszy hSyn1-hM4Di nie różniły się istotnie od grupy mCherry. Podobnie,

nie zaobserwowano różnic w poziomach zamierania tych dwóch grup w teście (**Rycina 14I-J**). Nie było też różnic między grupami w spadku częstości zamierania w czasie testu, w porównaniu z sesją wygaszania (**Rycina 14K**).

Powyższe obserwacje nie potwierdzają wcześniejszych doniesień [114,118,139,140] i sugerują, że aktywność IL nie była konieczna w przeprowadzonych testach do wygaszenie wczesnej i późnej pamięci strachu.



Rycina 14. Chemogenetyczne zahamowanie neuronów IL nie wpływa na wygaszenie pamięci strachu.

(A) AAV-hSyn1-hM4Di-mCherry (hSyn1-hM4Di) lub wirus kontrolny (mCherry) zostały podane bilateralnie do IL samców myszy C57BL/6J. Stworzono w Biorender.com.

(B) Mikrofotografia reprezentująca neurony IL transdukowane wirusem kontrolnym wraz z powiększeniem skanu; kolorem niebieskim oznaczono kanał DAPI, kolorem czerwonym kanał mCherry (C).

(D) Mikrofotografia reprezentująca neurony IL transdukowane wirusem hSyn1-hM4Di. (E) 4x powiększenie skanu. (F) Górny panel: oś eksperymentu, dolny panel: poziomy zamierania zwierząt podczas treningu myszy hSyn1-hM4Di oraz kontrolnych mCherry. Myszy obu grup nabyły pamięć strachu w trakcie treningu klasycznego warunkowania strachu (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami, efekt treningu: $F_{1,14} = 238.1$, $P < 0,001$). Po 24 godzinach, CNO (3 mg/kg) zostało podane na 30 minut przed sesją wygaszania, w której poziomy zamierania myszy hSyn1-hM4Di nie różniły się istotnie statystycznie od poziomów zwierząt mCherry (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami, hSyn1-hM4Di vs. mCherry: $F_{1,14} = 2,844$, $P = 0,11$, efekt treningu: $F_{5,70} = 17,36$, $P < 0,001$). Następnego dnia przeprowadzono test retencji pamięci wygaszania reakcji strachu (dwustronny test t-Studenta dla prób niezależnych $t = 0,112$, $df = 14$, $P = 0,91$).

(G-H) Zarówno zwierzęta kontrolne mCherry jak i hSyn1-hM4Di nabyły i skutecznie skonsolidowały pamięć wygaszania (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami, efekt wygaszania: $F_{1,14} = 16$, $P = 0,001$, efekt wirusa: $F_{1,14} = 0,022$, $P = 0,88$; wielokrotne porównania metodą Sidaka: mCherry: 0,03; hSyn1-hM4Di: 0,02). Zmiana w poziomie zamierania nie różniła się istotnie statystycznie między grupami (dwustronny test t-Studenta dla prób niezależnych hSyn1-hM4Di vs. mCherry: $t = 0,047$, $df = 14$, $P = 0,96$).

(I) Górny panel: oś eksperymentu, dolny panel: poziomy zamierania zwierząt podczas treningu myszy hSyn1-hM4Di oraz kontrolnych mCherry. Myszy obu grup nabyły pamięć strachu w trakcie treningu klasycznego warunkowania strachu (dwustronny ANOVA z powtarzanymi pomiarami, efekt treningu: $F_{1,36} = 97,46$, $P < 0,001$). Po 30 dniach CNO (3 mg/kg) zostało podane 30 minut przed sesją wygaszania, w której zaobserwowano wpływ treningu, lecz nie wirusa na poziom zamierania zwierząt w trakcie wygaszania (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami, efekt treningu: $F_{3,55} = 15,09$, $P < 0,001$, hSyn1-hM4Di vs. mCherry: $F_{1,18} = 2,974$, $P = 0,1$). Następnego dnia przeprowadzono test retencji pamięci wygaszania reakcji strachu (dwustronny test t-Studenta dla prób niezależnych hSyn1-hM4Di vs. kontrola mCherry: $t = 0,8972$, $df = 13$, $P = 0,39$).

(J-K) Zarówno zwierzęta kontrolne mCherry jak i hSyn1-hM4Di nabyły i skonsolidowały pamięć wygaszania strachu (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami, efekt wygaszania: $F_{1,18} = 59,31$, $P < 0,001$, wielokrotne porównania metodą Sidaka dla mCherry i hSyn1-hM4Di: $P < 0,001$), a zmiana w poziomie zamierania nie różniła się istotnie statystycznie między grupami (dwustronny test t-Studenta dla prób niezależnych hSyn1-hM4Di vs. mCherry: $t = 0,569$, $df = 18$, $P = 0,58$). Liczba zwierząt poddanych procedurze zawarta została w legendach do wykresów. Dane przedstawione zostały jako średnia \pm błąd standardowy (SEM); * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$.

4.6. Rola MS w regulacji wygaszania pamięci strachu

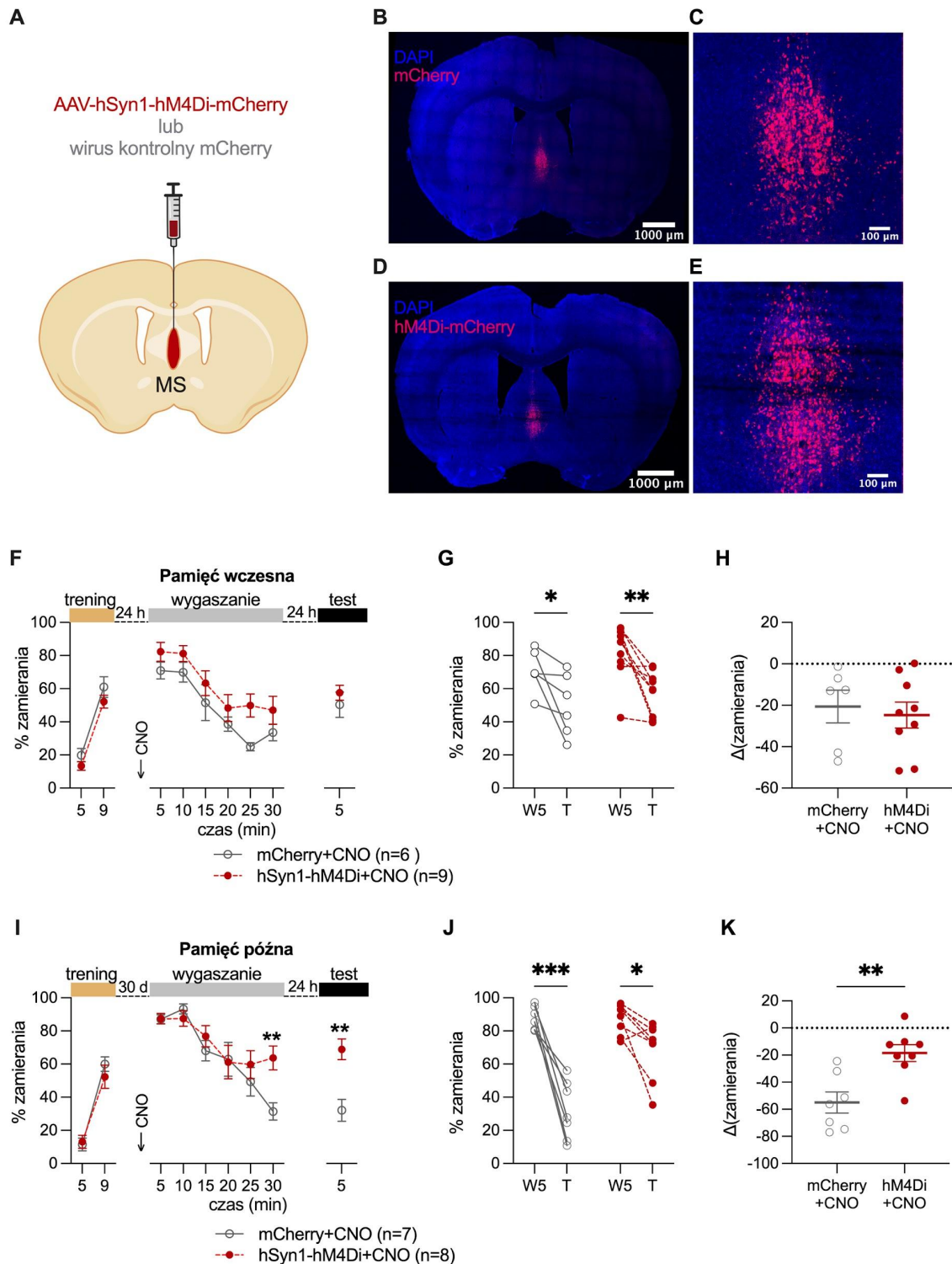
Wcześniejsze prace pokazały, że MS jest zaangażowane w warunkowanie strachu zależnego od bodźców dźwiękowych [202] oraz ogólnych [203], a także w wygaszanie wczesnej pamięci strachu [204]. Ze względu na wcześniejsze doniesienia oraz fakt, iż poziom

białka c-Fos w MS był wyższy po wygaszaniu pamięć późnej u myszy WT, w porównaniu z wygaszaniem pamięci wczesnej, postanowiłem przetestować rolę MS w wygaszaniu wczesnej i późnej pamięci strachu.

Zwierzętom podano wektory wirusowe hM4Di, lub mCherry, do MS i poddano je treningowi warunkowania i wygaszania pamięci strachu (**Rycina 15A-E**). CNO podano przed sesją wygaszania. Nie zaobserwowano wpływu wirusa, ani interakcji pomiędzy wirusem a treningiem na poziom zamierania, ani podczas treningu, ani w czasie sesji wygaszania wczesnej pamięci strachu. W teście pamięci wygaszania również nie zauważono różnic między grupami doświadczalnymi (**Rycina 15F**). Myszy, niezależnie od użytego wirusa, obniżyły poziom zamierania w czasie testu w porównaniu z początkiem sesji wygaszania (**Rycina 15G**), i zmiana tak była podobna w obu grupach doświadczalnych (**Rycina 15H**).

Następnie zweryfikowałem rolę neuronów MS w wygaszaniu późnej pamięci strachu. Zwierzęta obu grup doświadczalnych przeszły trening warunkowania klasycznego. W przeciwieństwie do pamięci wczesnej, podczas wygaszania pamięci późnej, zaobserwowano wpływ interakcji pomiędzy wirusem a treningiem na poziom zamierania. Ponadto, myszy hSyn1-hM4Di zamierały istotnie dłużej podczas testu pamięci wygaszania niż grupa mCherry (**Rycina 15I**). Dalsza analiza wykazała, że zarówno myszy hSyn1-hM4Di jak i mCherry wygaszyły pamięć późną strachu (**Rycina 15J**), jednak zmiana poziomu zamierania była mniejsza w grupie hSyn1-hM4Di niż mCherry (**Rycina 15K**).

Podsumowując, przeprowadzone doświadczenia wykazały, że aktywność MS nie jest konieczna do wygaszanie wczesnej pamięci strachu. Natomiast zahamowanie MS w czasie wygaszania późnej pamięci strachu upośledza ten proces. Dane te potwierdzają, że układy neuronalne zaangażowane w wygaszanie pamięci strachu zmieniają się z czasem i sugerują unikatowy udział MS w wygaszaniu późnej pamięci strachu.



Rycina 15. MS bierze udział w wygaszaniu później, lecz nie wczesnej, pamięcią strachu.

(A) AAV-hSyn1-hM4Di-mCherry (hSyn1-hM4Di) lub wirus kontrolny (mCherry) zostały podane bilateralnie do MS samców myszy C57BL/6J. Stworzono w Biorender.

(B) Mikrofotografia reprezentująca neurony MS transdukowane wirusem kontrolnym wraz z powiększeniem skanu; kolorem niebieskim oznaczono kanał DAPI, kolorem czerwonym kanał mCherry **(C)**.

(D-E) Mikrofotografia reprezentująca neurony MS transdukowane wirusem hSyn1-hM4Di wraz z powiększeniem skanu.

(F) Górny panel: oś eksperymentu, dolny panel: poziomy zamierania zwierząt podczas treningu myszy hSyn1-hM4Di oraz kontrolnych mCherry. Myszy obu grup nabyły pamięć strachu w trakcie treningu klasycznego warunkowania strachu (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami, efekt treningu: $F_{1,13} = 171,8$, $P < 0,001$). Po 24 godzinach, CNO (3 mg/kg) zostało podane na 30 minut przed sesją wygaszania, w której poziom zamierania myszy hSyn1-hM4Di nie różnił się istotnie od poziomu zwierząt mCherry (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami, hSyn1-hM4Di vs. mCherry: $F_{1,13} = 4,012$, $P = 0,07$). Następnego dnia przeprowadzono test retencji pamięci wygaszania reakcji strachu (dwustronny test t-Studenta dla prób niezależnych hSyn1-hM4Di vs. mCherry: $t = 0,8838$, $df = 13$, $P = 0,39$).

(G-H) Zarówno zwierzęta kontrolne mCherry jak i hSyn1-hM4Di nabyły i skutecznie skonsolidowały pamięć wygaszania (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami, efekt wygaszania: $F_{1,13} = 54,92$, $P < 0,001$; wielokrotne porównania metodą Sidaka: hSyn1-hM4Di, $P = 0,03$; mCherry, $P < 0,001$), a zmiana w poziomie zamierania nie różniła się istotnie statystycznie między grupami (dwustronny test t-Studenta dla prób niezależnych hSyn1-hM4Di vs. mCherry: $t = 0,4060$, $df = 13$, $P = 0,69$). **(I)** Górny panel: oś eksperymentu, dolny panel: poziomy zamierania zwierząt podczas treningu myszy hSyn1-hM4Di oraz kontrolnych mCherry. Myszy obu grup nabyły pamięć strachu w trakcie treningu klasycznego warunkowania strachu (dwustronny ANOVA z powtarzanymi pomiarami, efekt treningu: $F_{1,12} = 109,6$, $P < 0,001$). Po 30 dniach CNO (3 mg/kg) zostało podane 30 minut przed sesją wygaszania, w której zaobserwowano istotną interakcję wirusa i treningu na poziom zamierania zwierząt w trakcie wygaszania (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami, hSyn1-hM4Di vs. mCherry: $F_{1,13} = 1,262$, $P = 0,28$; efekt treningu: $F_{5,65} = 19,68$, $P < 0,001$; interakcja wirus \times trening: $F_{5,65} = 3,030$, $P = 0,02$). Zwierzęta wykazywały niższy poziom konsolidacji pamięci wygaszania niż kontrolne mCherry (dwustronny test t-Studenta dla prób niezależnych hSyn1-hM4Di vs. kontrola mCherry: $t = 4,052$, $df = 13$, $P = 0,001$).

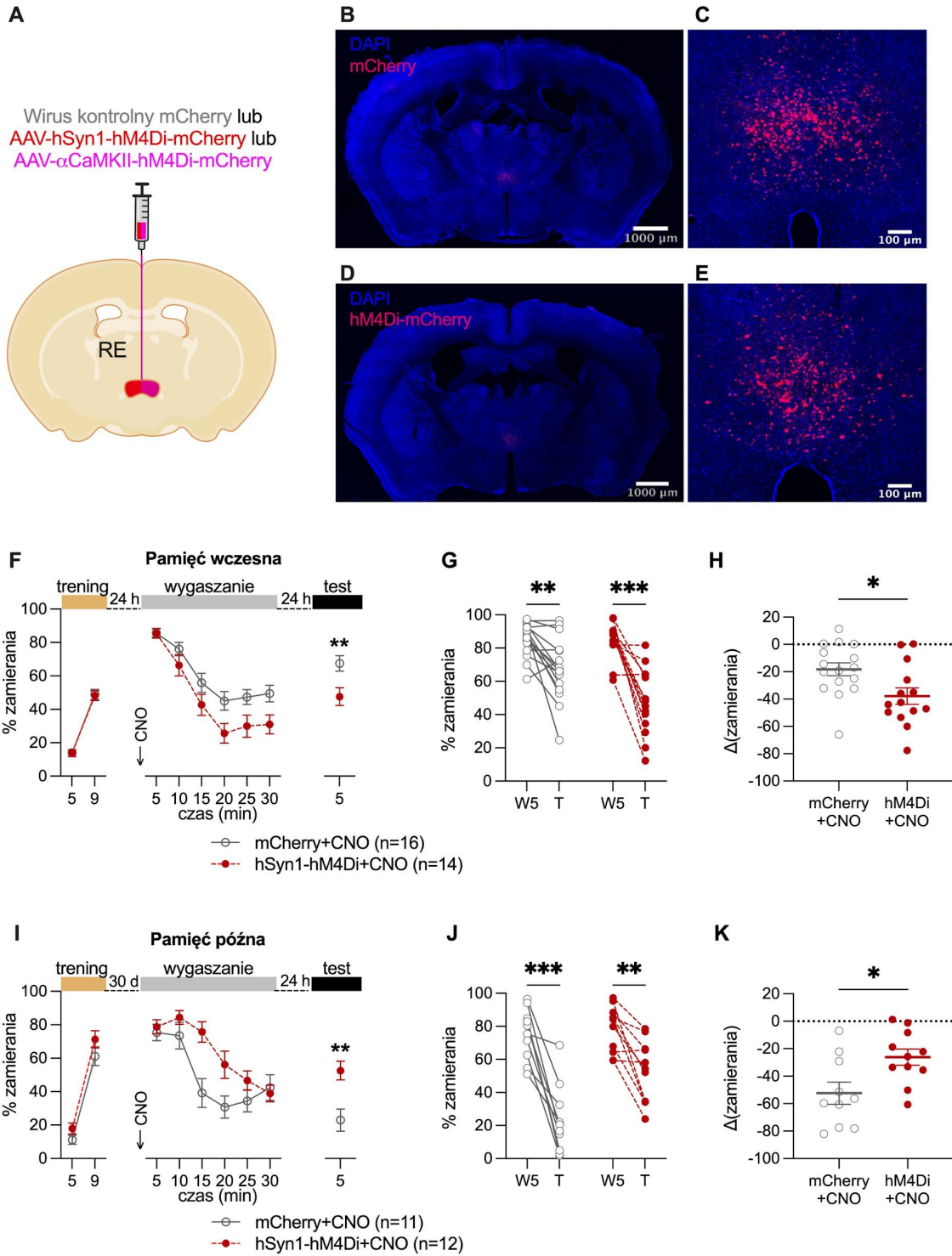
(J-K) Zarówno zwierzęta kontrolne mCherry jak i hSyn1-hM4Di nabyły i skonsolidowały pamięć wygaszania strachu (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami, efekt treningu: $F_{1,13} = 54,92$, $P < 0,001$; wielokrotne porównania metodą Sidaka: hSyn1-hM4Di, $P = 0,03$; mCherry, $P < 0,001$), a zmiana w poziomie zamierania okazała się być istotnie mniejsza niż w grupie mCherry (dwustronny test t-Studenta dla prób niezależnych hSyn1-hM4Di vs. mCherry: $t = 3,681$, $df = 13$, $P = 0,003$). Liczba zwierząt poddanych procedurze zawarta została w legendach do wykresów. Dane przedstawione zostały jako średnia \pm błąd standardowy; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ i *** $P < 0,001$.

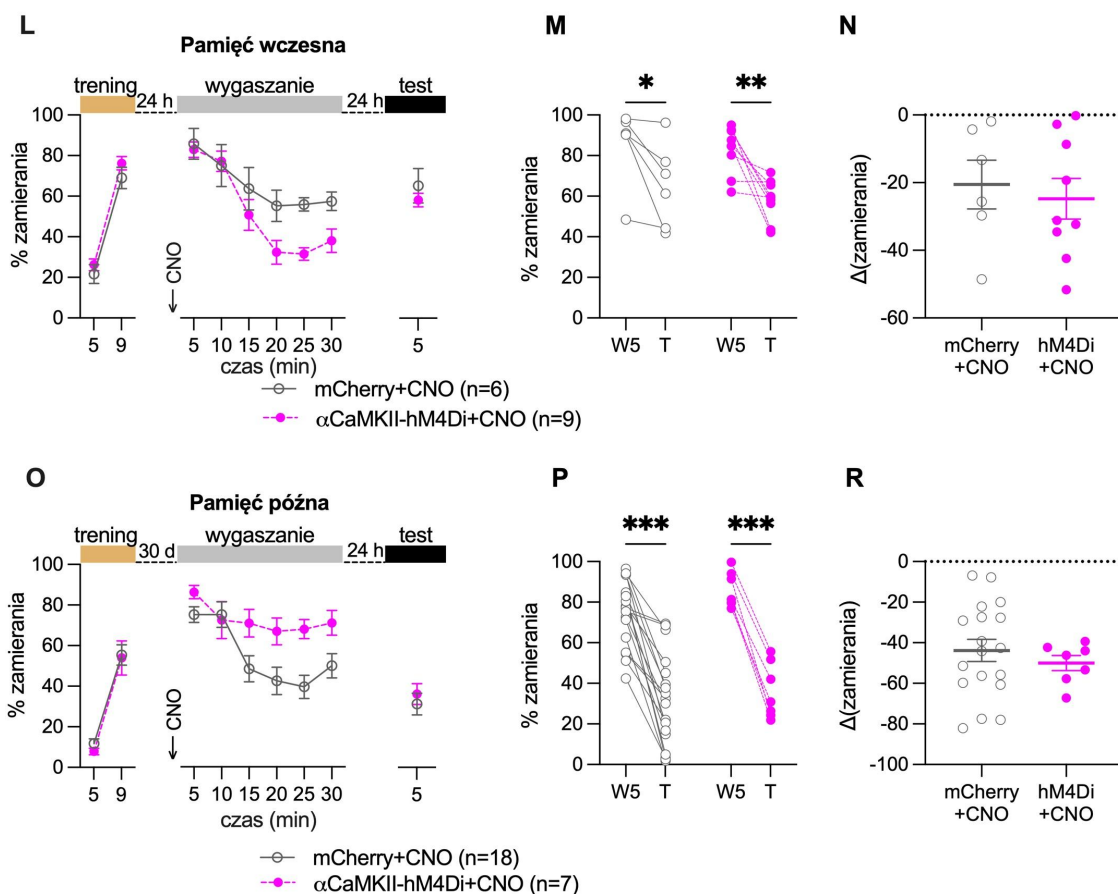
4.7. Rola RE w regulacji wygaszania pamięci strachu

Udział RE w przetwarzaniu zarówno wczesnej jak i późnej pamięci jest coraz lepiej udokumentowany [117,151,157,205,206]. W szczególności, wcześniejsze badania wykazały, że RE pełni ważną rolę w konsolidacji pamięci strachu zależnej od bodźców ogólnych [207–209], czy w konsolidacji późnej pamięci przestrzennej [210]. Mapowanie aktywności mózgu za pomocą analizy gęstości komórek c-Fos⁺ nie wykazało różnic w aktywności RE między myszami WT poddanych treningowi wygaszania strachu a zwierzętami z grup kontrolnych. Jednak, zaobserwowałem podwyższoną aktywność RE u myszy T286A^{+/-} po wygaszaniu późnej pamięci strachu, w porównaniu z myszami WT zabitymi w tym samym punkcie czasowym. Obserwacja ta sugeruje, że RE jest zaangażowane w przetwarzanie informacji w czasie wygaszania późnej pamięci strachu. Dlatego też w kolejnym etapie rozprawy doktorskiej postanowiłem zbadać udział tej struktury w wygaszaniu zarówno późnej jak i wczesnej pamięci strachu.

By testować udział RE w wygaszaniu pamięci strachu wektory wirusowe kodujące hM4Di, lub mCherry, podano do RE. Użyto dwóch typów wektorów hM4Di z receptorem wyrażanym pod promotorem *hSyn*, jak w poprzednich eksperymentach, lub pod promotorem *CaMK2a* pozwalającym na transdukcję tylko komórek glutaminianergicznymi (**Rycina 16A-E**). Dwadzieścia jeden dni po operacji myszy poddano treningowi warunkowania strachu. Test wygaszania pamięci strachu przeprowadzono 1 lub 30 dni po treningu. CNO podano 30 minut przed sesją wygaszania.

We wszystkich grupach eksperymentalnych zwierzęta wykazały wzrost poziomu zamierania w czasie sesji treningowej. Ponadto, wysoki poziom zamierania obserwowany na początku wygaszania wczesnej pamięci strachu obniżył się w trakcie sesji wygaszania. Analiza zachowania myszy hSyn1-hM4Di i myszy kontrolnych wykazała istotny wpływ wirusa oraz treningu na poziom zamierania podczas sesji wygaszania pamięci wczesnej. Zahamowanie aktywności neuronów RE u myszy hSyn1-hM4Di powodowało wzmocnienie wygaszania wczesnej pamięci strachu. W teście pamięci wygaszania, myszy te utrzymały niższy poziom zamierania niż myszy mCherry (**Rycina 16F**). Choć obie grupy myszy wygaszyły wczesną pamięć strachu (**Rycina 16G**), zmiana ta była większa u myszy hSyn1-hM4Di niż mCherry (**Rycina 16H**). Wyniki te sugerują, że aktywność RE hamuje wygaszanie wczesnej pamięci strachu.





Rycina 16. NR dwukierunkowo, zależnie od czasu moduluje wygaszanie reakcji związanej ze strachem; wybiórcze zahamowanie aktywności neuronów pobudzających nie wpływa na konsolidację pamięci wygaszania reakcji związanej ze strachem.

(A) AAV-hSyn1-hM4Di-mCherry (hSyn1-hM4Di) lub AAV-αCaMKII-hM4Di-mCherry (αCaMKII-hM4Di) lub wirus kontrolny (mCherry) zostały podane bilateralnie do RE samców myszy C57BL/6J. Stworzono w Biorender.com.

(B) Mikrofotografia reprezentująca neurony RE transdukiowane wirusem kontrolnym wraz z powiększeniem skanu; kolorem niebieskim oznaczono kanał DAPI, kolorem czerwonym kanał mCherry (C).

(D-E) Mikrofotografia reprezentująca neurony RE transdukiowane wirusem hSyn1-hM4Di wraz z powiększeniem skanu.

(F) Górny panel: oś eksperymentu, dolny panel: poziomy zamierania zwierząt podczas treningu myszy hSyn1-hM4Di oraz kontrolnych mCherry. Myszy obu grup nabyły pamięć strachu w trakcie treningu klasycznego warunkowania strachu (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami, efekt treningu: $F_{1,32} = 509.3$, $P < 0,001$). Po 24 godzinach, CNO (3 mg/kg) zostało podane na 30 minut przed sesją wygaszania, w której poziom zamierania myszy hSyn1-hM4Di był istotnie niższy od poziomu zwierząt mCherry (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami, hSyn1-hM4Di vs. mCherry: $F_{1,28} = 6,795$, $P = 0,01$; efekt treningu: $F_{5,140} = 49,18$, $P < 0,001$). Myszy hSyn1-hM4Di wykazały wyższy poziom retencji pamięci wygaszania niż kontrolne mCherry (dwustronny test t-Studenta dla prób niezależnych hSyn1-hM4Di vs. mCherry: $t = 2,821$, $df = 28$, $P = 0,009$).

(G-H) Obie grupy myszy hSyn1-hM4Di i kontrolne mCherry skutecznie skonsolidowały pamięć wygaszania (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami, hSyn1-hM4Di vs. mCherry: $F_{1, 28} = 5,648$, $P = 0,02$, interakcja wirus \times trening: $F_{1, 28} = 6,809$, $P = 0,01$ efekt treningu: $F_{1, 28} = 55,67$, $P < 0,001$), a zmiana w poziomie zamierania była większa w grupie hSyn1-hM4Di niż mCherry (dwustronny test t-Studenta dla prób niezależnych hSyn1-hM4Di vs. mCherry: $t=2,609$, $df=28$, $P = 0,01$).

(I) Górny panel: oś eksperymentu, dolny panel: poziomy zamierania zwierząt podczas treningu myszy hSyn1-hM4Di oraz kontrolnych mCherry. Myszy obu grup nabyły pamięć strachu w trakcie treningu klasycznego warunkowania strachu (dwustronny ANOVA z powtarzanymi pomiarami, efekt treningu: $F_{1, 38} = 141,2$, $P < 0,001$). hSyn1-hM4Di vs. mCherry: $F_{1, 38} = 3,787$, $P = 0,06$). Po 30 dniach CNO (3 mg/kg) zostało podane 30 minut przed sesją wygaszania, w której zaobserwowano wpływ treningu i wirusa na poziom zamierania zwierząt w trakcie wygaszania, a także interakcję pomiędzy tymi dwoma czynnikami (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami, hSyn1-hM4Di vs. mCherry: $F_{1, 19} = 5,374$, $P = 0,032$, efekt treningu: $F_{5, 95} = 23,57$, $P < 0,001$, interakcja wirus \times trening: $F_{5, 38} = 3,923$, $P = 0,003$). Zwierzęta hSyn1-hM4Di wykazywały niższy poziom retencji pamięci wygaszania niż kontrolne mCherry (dwustronny test t-Studenta dla prób niezależnych hSyn1-hM4Di vs. kontrola mCherry: $t = 3,428$, $df = 19$, $P = 0,003$).

(J-K) Zarówno zwierzęta kontrolne mCherry jak i hSyn1-hM4Di nabyły i skonsolidowały pamięć wygaszania strachu (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami, interakcja wirus \times trening: $F_{1, 19} = 7,162$, $P = 0,01$, efekt treningu: $F_{1, 19} = 64,22$, $P < 0,001$, hSyn1-hM4Di i mCherry: $F_{1, 19} = 8,074$, $P = 0,01$, wielokrotne porównania metodą Sidaka: mCherry, $P < 0,001$; hSyn1-hM4Di, $P = 0,002$), a zmiana w poziomie zamierania okazała się być istotnie mniejsza w grupie mCherry niż w hSyn1-hM4Di (dwustronny test t-Studenta dla prób niezależnych hSyn1-hM4Di vs. mCherry: $t = 2,676$, $df = 19$, $P = 0,01$).

(L) Górny panel: oś eksperymentu, dolny panel: poziomy zamierania zwierząt podczas treningu myszy α CaMKII-hM4Di oraz kontrolnych mCherry. Myszy obu grup nabyły pamięć strachu w trakcie treningu klasycznego warunkowania strachu (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami, efekt treningu: $F_{1, 13} = 413,4$, $P < 0,001$). Po 24 godzinach, CNO (3 mg/kg) zostało podane na 30 minut przed sesją wygaszania, w której poziom zamierania myszy α CaMKII-hM4Di był istotnie niższy od poziomu zwierząt mCherry (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami, α CaMKII-hM4Di vs. mCherry: $F_{1, 13} = 4,731$, $P < 0,05$, efekt treningu: $F_{5, 65} = 22,52$, $P < 0,001$). Myszy α CaMKII-hM4Di wykazały podobny poziom retencji pamięci wygaszania do zwierząt kontrolnych mCherry (dwustronny test t-Studenta dla prób niezależnych α CaMKII-hM4Di vs. mCherry: $t = 0,895$, $df = 13$, $P = 0,39$).

(M-N) Obie grupy myszy, α CaMKII-hM4Di i mCherry skutecznie skonsolidowały pamięć wygaszania strachu (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami, wpływ wygaszania na poziom zamierania: $F_{1, 13} = 23,06$, $P < 0,001$; wielokrotne porównania metodą Sidaka: mCherry, $P = 0,03$; α CaMKII-hM4Di, $P = 0,002$), natomiast zmiana w poziomie zamierania nie różniła się istotnie pomiędzy grupami (dwustronny test t-Studenta dla prób niezależnych α CaMKII-hM4Di vs. mCherry: $t = 0,445$, $df = 13$, $P = 0,66$).

(O) Górny panel: oś eksperymentu, dolny panel: poziomy zamierania zwierząt podczas treningu myszy α CaMKII-hM4Di oraz kontrolnych mCherry. Myszy obu grup nabyły pamięć strachu w trakcie treningu klasycznego warunkowania strachu (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami, efekt treningu: $F_{1, 23} = 151,5$, $P < 0,001$). Po 30 dniach CNO (3 mg/kg) zostało podane 30 minut przed sesją wygaszania, w której zaobserwowano wpływ

zarówno wirusa jak i treningu na poziom zamierania zwierząt w trakcie wygaszania (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami, α CaMKII-hM4Di vs. mCherry: $F_{1,23} = 5,543$, $P = 0,03$, efekt treningu: $F_{5,115} = 7,632$, $P < 0,001$). Zwierzęta wykazywały niższy poziom konsolidacji pamięci wygaszania niż kontrolne mCherry (dwustronny test t-Studenta dla prób niezależnych α CaMKII-hM4Di vs. mCherry: $t = 0,5342$, $df=23$, $P = 0,60$).

(P-R) Zarówno zwierzęta kontrolne mCherry jak i α CaMKII-hM4Di nabyły i skonsolidowały pamięć wygaszania strachu (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami, efekt treningu: $F_{1,23} = 104,9$, $P < 0,001$; wielokrotne porównania metodą Sidaka: $P < 0,001$ dla obu grup: mCherry i α CaMKII-hM4Di), a zmiana w poziomie zamierania nie różniła się istotnie pomiędzy grupami (dwustronny test t-Studenta dla prób niezależnych α CaMKII-hM4Di vs. mCherry: $t = 0,6771$, $df = 23$, $P = 0,51$). Liczba zwierząt poddanych procedurze zawarta została w legendach do wykresów. Dane przedstawione zostały jako średnia \pm błąd standardowy (SEM); * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ i *** $P < 0,001$.

W kolejnym doświadczeniu testowałem rolę neuronów RE w wygaszaniu późnej pamięci strachu. Zwierzęta obu grup doświadczalnych (mCherry i hSyn1-hM4Di) zwiększyły poziom zamierania w czasie treningu. W czasie sesji wygaszania myszy miały wysoki poziom zamierania na początku sesji, i poziom zamierania spadł w trakcie sesji. Zaobserwowano istotny wpływ treningu, lecz nie wirusa, na poziom zamierania zwierząt w trakcie wygaszania. Ponadto myszy hM4Di miały wyższy poziom zamierania niż myszy mCherry w czasie testu (**Rycina 16I**). Obie grupy obniżyły poziom zamierania w czasie testu w porównaniu z początkiem sesji wygaszania (**Rycina 16J**), jednak myszy z grupy mCherry wykazywały większą zmianę zachowania niż myszy hM4Di (**Rycina 16K**). Wyniki te sugerują, że aktywność RE przyspiesza wygaszanie późnej pamięci strachu.

By zbadać rolę komórek glutaminianergicznycych w RE w regulacji wygaszania pamięci strachu w kolejnych dwóch doświadczeniach użyłem wirusów hM4Di pod promotorem *CaMK2a* (CaMKII-hM4Di). Dwadzieścia cztery godziny po odbytych treningu warunkowania strachu myszy poddane zostały treningowi wygaszania. W czasie sesji wygaszania myszy CaMKII-hM4Di zamierały istotnie mniej niż kontrolne. Jednakże podczas testu pamięci wygaszania poziomy zamierania nie różniły się między zwierzętami obu grup (**Rycina 16L**). Dalsza analiza wykazała, że myszy z obu grup obniżyły poziom zamierania w czasie testu w porównaniu z początkiem sesji wygaszania (**Rycina 16M**), i nie zaobserwowano różnic między grupami doświadczalnymi (**Rycina 16N**). Wyniki te wskazują że komórki glutaminianergiczne RE hamują wygaszanie pamięci strachu w czasie sesji, lecz nie mają wpływu na konsolidację pamięci wygaszania.

Druga grupa myszy po podaniu wektorów wirusowych CaMKII-hM4Di do RE przeszła trening warunkowania i sesję wygaszania późnej pamięci strachu. Nie zaobserwowano istotnych różnic w zachowaniu myszy w czasie treningu czy na początku sesji wygaszania.

Natomiast analiza statystyczna zachowania myszy w czasie sesji wygaszania wskazała istotną interakcję między czasem i wirusem na poziom zamierania. W czasie sesji wygaszania zaobserwowałem istotne obniżenie poziomu zamierania u myszy kontrolnych, i brak istotnych zmian u myszy CaMKII-hM4Di (**Rycina 16O**). Dalsza analiza wykazała, że obie grupy obniżyły poziom zamierania mierzony w czasie testu w porównaniu z początkiem sesji wygaszania (**Rycina 16P**). Nie zauważyłem istotnych różnic między grupami doświadczalnymi (**Rycina 16R**). Wyniki te wskazują że komórki glutaminianergiczne RE są niezbędne do wygaszania późnej pamięci strachu w czasie sesji, lecz nie do konsolidacji pamięci wygaszania.

Podsumowując, uzyskane dane wskazują, że nieselektywne zahamowanie aktywności neuronów RE w trakcie wygaszania wczesnej pamięci strachu promuje proces wygaszania, podczas gdy zahamowanie komórek glutaminianergicznych RE w tym samym punkcie czasowym promuje wygaszanie w czasie sesji lecz nie ma wpływu na konsolidację pamięci wygaszania. Ponadto nieselektywne zahamowanie aktywności neuronów RE w trakcie wygaszania późnej pamięci strachu upośledza proces wygaszania, podczas gdy zahamowanie komórek glutaminianergicznych RE upośledza wygaszanie w czasie sesji lecz nie ma wpływu na konsolidację pamięci wygaszania. Dane te wskazują, że rola RE w procesie wygaszania pamięci strachu zmienia się w czasie, oraz że w regulacji wygaszania pamięci strachu biorą udział zarówno neurony glutaminianergiczne, jak i nie-glutaminianergiczne RE.

4.8. Rola projekcji RE→MS w regulacji wygaszania pamięci strachu

Przeprowadzone przeze mnie doświadczenia wskazały na istotną rolę MS i RE w wygaszaniu późnej pamięci strachu. Ponadto dane literaturowe opisują występowanie w MS zakończeń aksonów pochodzących z RE [211,212]. Natomiast MS najprawdopodobniej nie unerwia RE [213]. Dlatego też w kolejnych etapach mojej rozprawy doktorskiej zdecydowałem się odpowiedzieć na następujące pytania badawcze:

- Czy projekcje z RE do MS (RE→MS) są zaangażowane w wygaszanie pamięci strachu?
- Czy funkcja projekcji RE→MS w regulowaniu wygaszania pamięci strachu zmienia się w czasie?

W tym celu użyłem dwóch wektorów wirusowych:

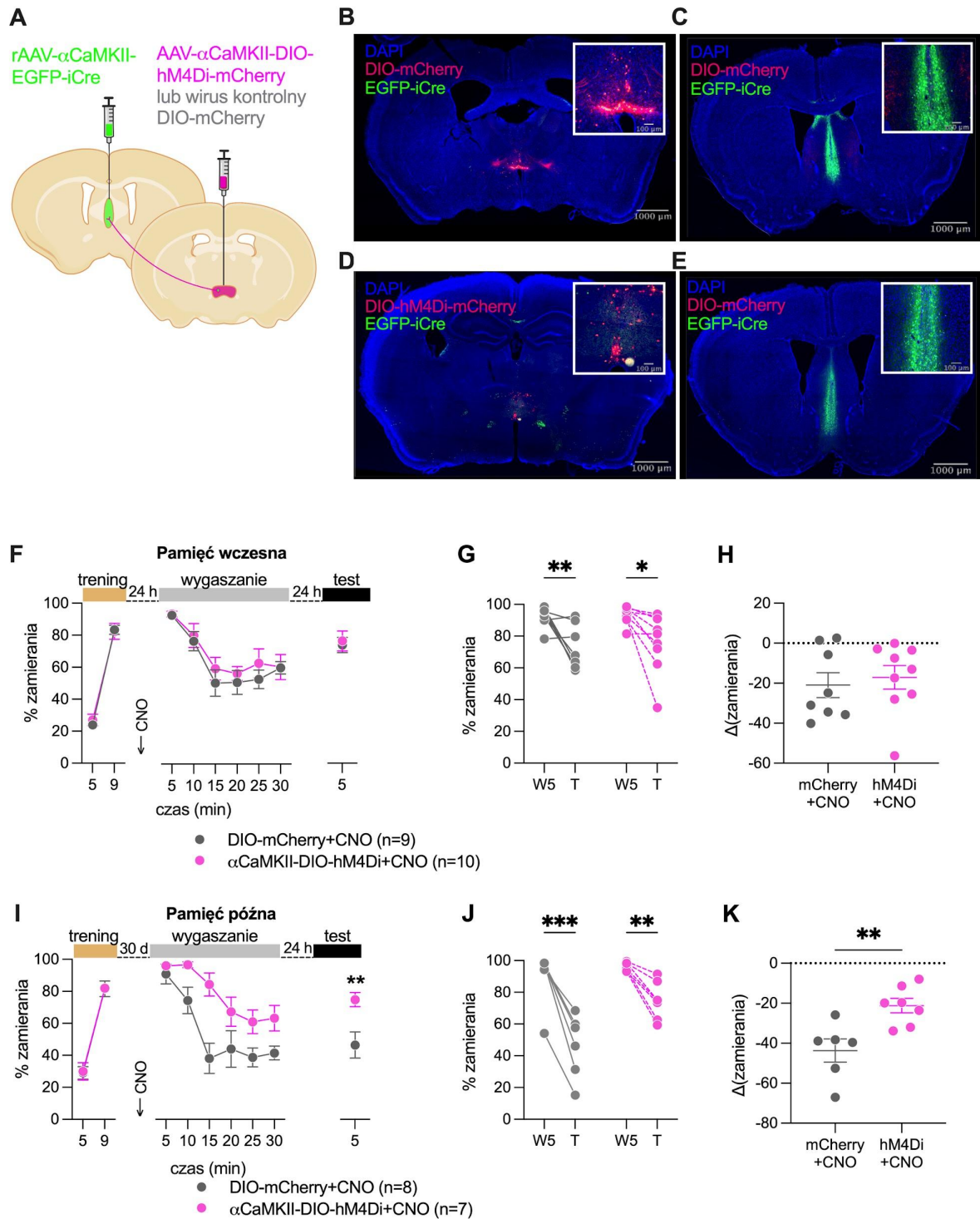
- do MS podałem retro AAV1/2 (rAAV1/2) transdukujący zakończenia aksonalne i kodujący rekombinazę Cre (rAAV-iCre);
- do RE podałem AAV1/2 kodujący receptor DREADD aktywowany przez rekombinazę Cre (CaMKII-DIO-hM4Di) lub wektor kontrolny kodujący mCherry (DIO-mCherry).

Połączenie tych dwóch wirusów w jednej komórce pozwoliło na selektywną modulację aktywności komórek RE unerwiających MS (**Rycina 17A-E**).

Myszy przeszły trening warunkowania klasycznego. Poziom zamierania nie różnił się między grupami doświadczalnymi. Po 24 godzinach myszy poddano treningowi wygaszania wczesnej pamięci strachu, uprzednio podając CNO (3 mg/kg, 30 min przed sesją). Analiza zachowania zwierząt nie wykazała różnic w poziomie zamierania między grupami hM4Di i mCherry ani podczas wygaszania ani w trakcie testu pamięci wygaszania (**Rycina 17F**). Zwierzęta z obu grup obniżyły poziom zamierania w czasie testu w porównaniu z początkiem sesji wygaszania (**Rycina 17G**), i nie zauważyłem istotnych różnic między grupami (**Rycina 17H**).

Również w eksperymencie testującym rolę RE→MS w wygaszaniu późnej pamięci strachu, myszy nabyły pamięć warunkowaną strachem. Trzydzieści dni później zwierzęta poddano treningowi wygaszania późnej pamięci strachu uprzednio podając CNO (3 mg/kg, 30 min przed sesją). U myszy hM4Di zaobserwowano istotnie wyższy poziom zamierania w czasie sesji wygaszania niż u grupy kontrolnej mCherry. Różnica ta utrzymała się także w teście kolejnego dnia (**Rycina 17I**). W toku dalszej analizy wykazałem, że myszy obu grup wygaszały późną pamięć strachu (**Rycina 17J**), jednak zmiana poziomu zamierania w czasie testu w porównaniu z sesją wygaszania była większa w grupie mCherry (**Rycina 17K**).

Uzyskane wyniki wskazują na występowanie pobudzających połączeń neuronalnych pomiędzy RE i MS oraz ich zdeterminowane czasem zaangażowanie w wygaszanie reakcji strachu zależnego od bodźców ogólnych. Podobnie do efektu zaobserwowanego podczas hamowania aktywności neuronów w MS i w RE, wyhamowanie projekcji RE→MS skutkuje upośledzeniem wygaszania późnej pamięci strachu. Sugeruje to, że projekcje RE→MS odgrywają istotną rolę w regulacji pamięci strachu nabytego na długo przed wygaszaniem, lecz nie mają wpływu na regulację pamięci wczesnej.



Rycina 17. Neurony pobudzające projektujące z RE do MS modulują wygaszanie reakcji związanej z późną pamięcią strachu.

(A) AAV- α CaMKII-DIO-hM4Di-mCherry (α CaMKII-DIO-hM4Di) lub wirus kontrolny (DIO-mCherry) zostały podane bilateralnie do RE, a rAAV- α CaMKII-EGFP-iCre (rAAV-iCre) do MS samców myszy C57BL/6J. Stworzono w Biorender.

(B i D) Mikrofotografia reprezentująca neurony RE projektujące do MS, transdukowane wirusem kontrolnym wraz z powiększeniem skanu; kolorem niebieskim oznaczono kanał DAPI, kolorem czerwonym kanał mCherry, kolorem zielonym kanał EGFP.

(C i E) Mikrofotografia reprezentująca neurony MS transdukowane wirusem rAAV-iCre wraz z powiększeniem skanu.

(F) Górny panel: oś eksperymentu, dolny panel: poziomy zamierania zwierząt podczas treningu myszy α CaMKII-DIO-hM4Di oraz kontrolnych DIO-mCherry. Myszy obu grup nabyły pamięć strachu w trakcie treningu klasycznego warunkowania strachu (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami, α CaMKII-DIO-hM4Di vs. DIO-mCherry: $F_{1,15} = 0,056$, $P = 0,82$, efekt treningu: $F_{1,15} = 414,0$, $P < 0,001$). Po 24 godzinach, CNO (3 mg/kg) zostało podane na 30 minut przed sesją wygaszania, w której poziom zamierania myszy α CaMKII-DIO-hM4Di nie różnił się istotnie od poziomu zwierząt DIO-mCherry (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami, α CaMKII-DIO-hM4Di vs. DIO-mCherry: $F_{1,15} = 0,6485$, $P = 0,43$, efekt treningu: $F_{5,75} = 18,58$, $P < 0,001$). Następnego dnia przeprowadzono test retencji pamięci wygaszania pamięci strachu (dwustronny test t-Studenta dla prób niezależnych α CaMKII-DIO-hM4Di vs. DIO-mCherry: $t = 0,3184$, $df = 16$, $P = 0,75$).

(G-H) Zarówno zwierzęta kontrolne mCherry jak i α CaMKII-DIO-hM4Di nabyły i skutecznie skonsolidowały pamięć wygaszania (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami, efekt treningu: $F_{1,15} = 19,68$, $P < 0,001$, wielokrotne porównania metodą Sidaka: DIO-mCherry: $P = 0,009$, α CaMKII-DIO-hM4Di: $P = 0,02$), a zmiana w poziomie zamierania nie różniła się istotnie statystycznie między grupami (dwustronny test t-Studenta dla prób niezależnych α CaMKII-DIO-hM4Di vs. DIO-mCherry: $t = 0,448$, $df = 15$, $P = 0,66$).

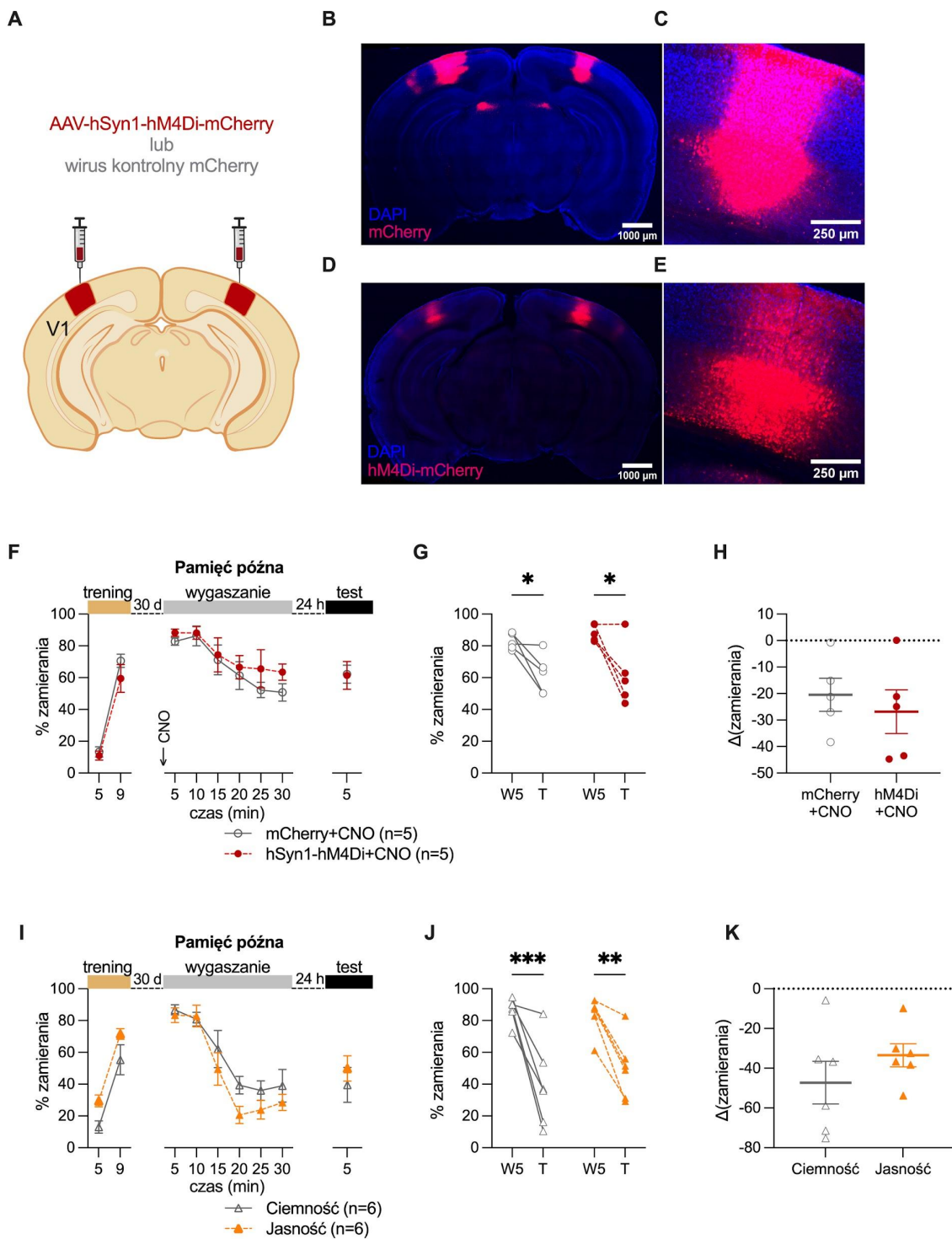
(I) Górny panel: oś eksperymentu, dolny panel: poziomy zamierania zwierząt podczas treningu myszy α CaMKII-DIO-hM4Di oraz kontrolnych DIO-mCherry. Myszy obu grup nabyły pamięć strachu w trakcie treningu klasycznego warunkowania strachu (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami, α CaMKII-DIO-hM4Di vs. DIO-mCherry: $F_{1,11} = 0,019$, $P = 0,89$, efekt treningu: $F_{1,11} = 201,3$, $P < 0,001$). Po 30 dniach CNO (3 mg/kg) zostało podane 30 minut przed sesją wygaszania, w której zaobserwowano wpływ zarówno wirusa jak i treningu na poziom zamierania zwierząt w trakcie wygaszania (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami, α CaMKII-DIO-hM4Di vs. DIO-mCherry: $F_{1,11} = 14,74$, $P = 0,003$, efekt treningu: $F_{5,55} = 12,30$, $P < 0,001$; interakcja: $F_{5,55} = 1,325$, $P = 0,27$). Zwierzęta α CaMKII-DIO-hM4Di wykazywały niższy poziom konsolidacji pamięci wygaszania niż kontrolne DIO-mCherry który utrzymał się do testu kolejnego dnia (dwustronny test t-Studenta dla prób niezależnych α CaMKII-DIO-hM4Di vs. DIO-mCherry: $t = 3,190$, $df = 11$, $P = 0,009$).

(J-K) Zarówno zwierzęta kontrolne DIO-mCherry jak i α CaMKII-DIO-hM4Di nabyły i skonsolidowały pamięć wygaszania strachu dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami, efekt treningu: $F_{1,11} = 95,32$, $P < 0,001$, efekt wirusa: $F_{1,11} = 5,704$, $P = 0,04$, interakcja: $F_{1,11} = 11,51$, $P = 0,006$. wielokrotne porównania metodą Sidaka: DIO-mCherry: $P < 0,001$, α CaMKII-DIO-hM4Di: $P = 0,001$), a zmiana w poziomie zamierania okazała się być istotnie mniejsza niż w grupie DIO-mCherry (dwustronny test t-Studenta dla prób niezależnych α CaMKII-DIO-hM4Di vs. DIO-mCherry: $t = 3,392$, $df = 11$, $P = 0,006$). Liczba zwierząt poddanych procedurze zawarta została w legendach do wykresów. Dane przedstawione zostały jako średnia \pm błąd standardowy; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ i *** $P < 0,001$,

4.9. Rola V1 w regulacji wygaszania późnej pamięci strachu

Mimo iż V1 jest głównym obszarem korowym przetwarzającym bodźce wzrokowe [214,215] jak dotąd nie ma jest doniesień dotyczących roli V1 w regulacji wygaszania pamięci strachu zależnej od bodźców ogólnych. Co ciekawe, zarówno podczas wygaszania wczesnej jak i późnej pamięci strachu, zaobserwowałem wysoką aktywność V1 (**Rycina** 7D, 9D, 10D). Chcąc zweryfikować udział V1 w wygaszaniu reakcji strachu wykorzystałem samce myszy C57BL/6J, którym stereotaktycznie wprowadziłem wektory wirusowe hSyn1-hM4Di, lub wektor kontrolny, do V1 (**Rycina** 18A). Po 3 tygodniach, zwierzęta przeszły trening warunkowania klasycznego. Po 30 dniach od treningu myszom podano roztwór CNO (3 mg/kg), i 30 minut później zwierzęta przeszły sesję wygaszania późnej pamięci strachu. Na początku sesji wygaszania (5 min) poziom zamierania był wysoki, sugerując, że myszy pamiętały sesję warunkowania. Analiza wariancji ujawniła istotny wpływ czasu oraz brak wpływu wirusa na poziom zamierania, wskazując, że zahamowanie V1 nie miało wpływu ani na przywołanie ani na wygaszanie długotrwałej pamięci strachu. Następnego dnia przeprowadzono test pamięci wygaszania. Nie zaobserwowano różnic w poziomie zamierania pomiędzy grupami (**Rycina** 18F). Dane te wskazują, że zahamowanie aktywności V1 nie wpływa na wygaszanie późnej pamięci strachu (**Rycina** 18G-H).

Warthen i wsp. (2011) pokazali, że oświetlenie klatki wzmacnia warunkowanie reakcji strachu. Autorzy wykorzystali dźwięk jako bodziec warunkowy, podczas gdy w modelu stosowanym w niniejszej rozprawie bodźcem warunkowym jest kontekst klatki treningowej. Dlatego w kolejnym doświadczeniu testowałem wpływ oświetlenia klatki treningowej na zachowanie zwierząt podczas warunkowania i wygaszania pamięci strachu (**Rycina** 18I). Analizując zachowanie zwierząt podczas treningu zauważyłem, że niezależnie od oświetlenia poziom zamierania myszy wzrósł na koniec treningu. Poziom zamierania pozostał wysoki na początku, i zmniejszył się na końcu sesji wygaszania, niezależnie od warunków oświetlenia. W teście pamięci wygaszania analiza statystyczna nie wykazała różnic w ilości czasu spędzonego w zamieraniu między grupami doświadczalnymi. Oświetlenie klatki treningowej wzmacnia nabywanie uwarunkowanego bodźcami ogólnymi strachu na poziom zamierania zwierząt, lecz nie ma wpływu na jego wygaszanie ani na poziom zamierania zwierząt podczas testu retencji pamięci wygaszania strachu.



Rycina 18. Nieselektywne zahamowanie neuronów w V1 wpływa na wygaszanie reakcji związanej z późną pamięcią strachu; oświetlenie klatki treningowej nie wpływa na wygaszanie późnej pamięci strachu.

(A) AAV-hSyn1-hM4Di-mCherry (hSyn1-hM4Di) lub wirus kontrolny (mCherry) zostały podane bilateralnie do V1 samców myszy C57BL/6J. Stworzono w Biorender.com.

(B) Mikrofotografia reprezentująca neurony V1 transdukowane wirusem kontrolnym wraz z powiększeniem skanu **(C)**.

(D) Mikrofotografia reprezentująca neurony V1 transdukowane wirusem hSyn-hM4Di.

(E) 4x powiększenie skanu; kolorem niebieskim oznaczono kanał DAPI, kolorem czerwonym kanał mCherry.

(F) Górny panel: oś eksperymentu, dolny panel: poziomy zamierania zwierząt podczas treningu myszy hSyn1-hM4Di oraz kontrolnych mCherry. Myszy przeszły trening klasycznego warunkowania strachu (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami, hSyn1-hM4Di vs. mCherry: $F_{1,8} = 1,385$, $P = 0,27$, efekt treningu na poziom zamierania zwierząt: $F_{1,8} = 118,5$, $P < 0,001$). Po 30 dniach CNO (3 mg/kg) zostało podane 30 minut przed sesją wygaszania i nie zauważono różnic pomiędzy grupami zwierząt (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami, efekt treningu: $F_{3,27} = 10,84$, $P < 0,001$, hSyn1-hM4Di vs. kontrola mCherry: $F_{1,8} = 0,9664$ $P = 0,35$). Następnego dnia przeprowadzono test retencji pamięci wygaszania pamięci strachu (dwustronny test t-Studenta dla prób niezależnych hSyn1-hM4Di vs. mCherry: $t = 0,073$, $df = 8$, $P = 0,94$).

(G) Obie grupy zwierząt skutecznie nabyły i skonsolidowały pamięć wygaszania (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami, efekt treningu: $F_{1,8} = 20,982$, $P = 0,002$, hSyn1-hM4Di vs. mCherry: $F_{1,8} = 0,178$, $P = 0,68$; wielokrotne porównania metodą Sidaka: mCherry: $P < 0,05$, hSyn1-hM4Di: $P = 0,01$).

(H) Poziom skonsolidowanej pamięci wygaszania nie różnił się istotnie statystycznie pomiędzy badanymi grupami (dwustronny test t-Studenta dla prób niezależnych: $t = 0,614$, $df = 8$, $P = 0,56$). Liczba zwierząt poddanych procedurze zawarta została w legendach do wykresów. Dane przedstawione zostały jako średnia \pm błąd standardowy (SEM); * $P < 0,05$.

(I) Górny panel wykresu przedstawia oś czasu eksperymentu, dolny panel poziomy zamierania myszy C57BL/6J podczas treningu warunkowania klasycznego, treningu wygaszania i testu retencji pamięci wygaszania. W doświadczeniu zastosowano oświetlenie klatki światłem białym (Jasność) lub jego braku (Ciemność). Oświetlenie klatki treningowej wzmacnia nabywanie uwarunkowanego bodźcami ogólnymi strachu na poziom zamierania zwierząt (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami, efekt treningu: $F_{1,10} = 161,8$, $P < 0,001$, efekt oświetlenia: $F_{1,10} = 5,020$, $P < 0,05$). Nie wpływa jednak na wygaszanie reakcji związanej z późną pamięcią strachu (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami, efekt treningu: $F_{3,31} = 48,33$, $P < 0,001$, efekt oświetlenia: $F_{1,10} = 1,572$, $P = 0,24$), ani na poziom zamierania zwierząt podczas testu retencji pamięci wygaszania strachu (dwustronny test t-Studenta dla prób niezależnych: $t = 0,7627$, $df = 10$, $P = 0,46$).

(J-K) Obie grupy zwierząt skutecznie nabyły i skonsolidowały pamięć wygaszania (dwuczynnikowa ANOVA z powtarzanymi pomiarami, efekt treningu: $F_{1,10} = 43,59$, $P < 0,001$, Jasność vs. Ciemność: $F_{1,10} = 0,1693$, $P = 0,69$; wielokrotne porównania metodą Sidaka: Jasność: $P = 0,006$, Ciemność: $P < 0,001$), której poziom nie różnił się istotnie statystycznie pomiędzy badanymi grupami (dwustronny test t-Studenta dla prób niezależnych: $t = 1,128$, $df = 10$, $P = 0,29$). Liczba zwierząt poddanych procedurze zawarta została w legendach do wykresów. Dane przedstawione zostały jako średnia \pm błąd standardowy; ** $P < 0,005$, *** $P < 0,001$.

5. Dyskusja

Celem niniejszej rozprawy była identyfikacja obszarów mózgu specyficznie zaangażowanych w wygaszanie wczesnej i/lub późnej pamięci strachu. W tym celu analizowałem ekspresję białka c-Fos wywołaną wygaszaniem wczesnej i późnej pamięci strachu zależnego od bodźców ogólnych. Wykazałem, że wygaszanie wczesnej pamięci strachu, w porównaniu z grupą 5US, aktywuje ekspresję białka c-Fos w ciele migdałowatym (CeM), korze (V1, IL), i wzgórzu (CM oraz PV), a także obniża ekspresję c-Fos w hipokampie (CA1 i DG). Wygaszanie późnej pamięci strachu, w porównaniu z wygaszaniem wczesnej pamięci, wiąże się z podwyższonym poziomem c-Fos we wzgórzu (MS i PV).

Ponadto, badałem rolę autofosforylacji α CaMKII w pozycji 286 w wygaszaniu strachu i regulacji aktywności obwodów neuronalnych zaangażowanych w wygaszanie strachu. Wykazałem, że myszy T286A^{+/-} charakteryzuje specyficzne upośledzone wygaszanie późnej, lecz nie wczesnej, pamięci strachu zależnego od bodźców ogólnych. Upośledzeniu temu towarzyszy podwyższony poziom c-Fos w ośrodkach wzgórza przyśrodkowego, tj. RE, CM, MD oraz korze V1.

Przeprowadzone przeze mnie doświadczenia pokazały również, że zahamowanie aktywności MS i RE, oraz projekcji RE→MS, upośledza wygaszania późnej pamięci strachu zależnego od bodźców ogólnych. Ponadto, aktywność RE utrudnia wygaszanie wczesnej pamięci strachu zależnego od bodźców ogólnych, a aktywność komórek pobudzających tej struktury nie jest wystarczająca do skonsolidowania pamięci wygaszania, co najprawdopodobniej wymaga aktywności zarówno neuronów pobudzających jak i hamujących.

Podsumowując, przeprowadzone przeze mnie doświadczenia wykazały specyficzny udział wzgórza (RE→MS) w regulacji wygaszania pamięci późnej, lecz nie wczesnej.

5.1. Autofosforylacja α CaMKII w pozycji 286 upośledza wygaszanie późnej pamięci strachu

Myszy z mutacją T286A mają upośledzone nabywanie pamięci strachu zależnego od bodźców ogólnych po łagodnym treningu warunkowania strachu (1xUS) [185]. Natomiast po intensywnym treningu (5xUS) zwierzęta te mogą utworzyć zarówno wczesną (1 dzień) jak i późną (30 dni) pamięć strachu [216,217]. Potwierdzają to moje doświadczenia z heterozygotami T286A^{+/-}, które po intensywnym treningu nabywają zarówno krótko- jak i długotrwałą pamięć strachu. Ponadto, wcześniejsze prace pokazały, że wygaszanie wczesnej pamięci strachu jest upośledzone u myszy T286A [104,105]. W niniejszej rozprawie, po raz

pierwszy zademonstrowałem, że myszy T286A^{+/-} wygaszały wczesną pamięć strachu podobnie do zwierząt WT, lecz charakteryzowały się upośledzonym wygaszaniem późnej pamięci strachu. Doświadczenia te potwierdzają, że autofosforylacja α CaMKII jest zaangażowane zarówno w nabywanie jak i wygaszanie pamięci strachu, jednak intensywny trening może przewyciężyć deficyty poznawcze wynikające z obniżonej aktywności α CaMKII u myszy T286A^{+/-}. Ponadto aktywność α CaMKII koreluje z długością życia śladu pamięciowego.

Co ciekawe, w zaprezentowanym przeze mnie eksperymencie myszy WT i T286A^{+/-} podobnie wygaszały wczesną pamięć strachu, podczas gdy Kimura i in. (2008) zaobserwowali wyższą skuteczność wygaszania wczesnej pamięci przez myszy WT niż T286A^{+/-}. Ta rozbieżność prawdopodobnie wynika z różnic w intensywności przeprowadzanego treningu (1 vs 5 US).

5.2. Białko c-Fos jako marker plastyczności obszarów mózgu zaangażowanych w przetwarzanie pamięci

W celu scharakteryzowania obszarów mózgu aktywowanych podczas nabywania i wygaszania pamięci strachu zależnego od bodźców ogólnych wykorzystałem barwienie immunohistochemiczne wykrywające białko c-Fos. Jest to standardowa metoda badawcza pozwalająca na analizę aktywności obszarów mózgu z rozdzielczością komórkową. Analiz gęstości komórek c-Fos⁺ wielokrotnie była używana do identyfikacji obszarów mózgu zaangażowanych w przetwarzanie pamięci, w tym: kodowanie [33,94,218] i przywoływanie pamięci [35,219,220], a także wygaszania wczesnej [94,204] i późnej pamięci strachu [117]. Znakowanie komórek c-Fos⁺ używane także było po to, by zidentyfikować obszary mózgu zaangażowane w upośledzenie wygaszania pamięci strachu [93,94,221], a także wiele innych procesów poznawczych [222]. Jednak, żadna z tych prac nie badała roli autofosforylacji α CaMKII w wygaszaniu późnej pamięci strachu. Ponadto, żadna z nich nie mapowała aktywności mózgu związanej z deficytami wygaszania późnej pamięci strachu u tych mutantów.

5.3. Chemogenetyczna regulacja aktywności neuronów

Użyty przeze mnie system chemogenetycznej regulacji aktywności neuronów miał w założeniu opierać się o regulację aktywności egzogennych receptorów hM4Di przez agonistę CNO, który nie wykazuje powinowactwa do żadnego z endogennych receptorów [195]. Jak

pokazano jednak w pracy Jendryka i in. (2019), 30 minut po dootrzewnowym podaniu CNO (3,5 mg/kg masy ciała), obserwuje się bardzo niskie stężenie tego związku w mózgu (~20 nM) i jest ono około 100 razy mniejsze w mózgu niż we krwi. Niskie stężenie CNO w mózgu wynika z faktu, że podczas przejścia przez barierę krew-mózg CNO ulega przemianie metabolicznej do klozapiny [223]. Klozapina wykazuje zaś wysokie powinowactwo nie tylko do receptorów DREADD ale także receptorów muskarynowych, a zatem może modyfikować zachowanie zwierząt nie tylko poprzez oddziaływanie z egzogennymi receptorami [224]. Co ważne CNO podana dootrzewnowo w dawce 1 mg/kg masy ciała obniża poziom reakcji wzdrygnięć w odpowiedzi na bodziec awersyjny u szczurów [196]. W tej samej pracy, wykazano, że CNO w dawce 5 mg/kg masy ciała niweluje wzrost dopaminy w jądrze półleżącym, obserwowany po podaniu amfetaminy. Odkrycia te wpłynęły na przeprowadzenie przeze mnie doświadczeń pilotażowych, w których testowałem wpływ CNO na wygaszanie pamięci strachu. Nie zaobserwowałem istotnych statystycznie różnic w poziomach zamierania podczas treningu wygaszania pamięci strachu i testu pamięci wygaszania pomiędzy myszami C57BL/6J (bez receptorów DREADD), którym podano dootrzewnowo CNO w dawkach 0, 0,5, 3 lub 10 mg/kg masy ciała przed sesją wygaszania (**Rycina 12**). Podobnie, długotrwałe (>16 tygodni) podawanie CNO myszom nie wpływa na wygaszanie pamięci strachu [225]. Zauważyłem jednak, że dootrzewnowe podanie CNO obniża ekspresję c-Fos w neuronach wykazujących ekspresję receptora DREADD. Pokazuje to, że CNO podane obwodowo powoduje obniżenie aktywności neuronów wyrażających hamujący receptor DREADD (prawdopodobnie po konwersji do klozapiny), oraz nie wpływa na wygaszanie pamięci strachu, gdy w mózgu nie ma tych receptorów. Obserwacje te wskazują zatem, że chemogenetyczna manipulacja aktywnością neuronów jest adekwatną metodą badania neuronalnego podłoża wygaszania pamięci strachu.

5.4. Obszary mózgu zaangażowane w wygaszanie wczesnej pamięci strachu

W niniejszej rozprawie wykazałem, że konsolidacja pamięci strachu oraz wygaszanie wczesnej i późnej pamięci strachu zależnego od bodźców ogólnych indukują odmienne wzory ekspresji białka c-Fos w grzbietowym hipokampie, przegrodzie, korze mózgowej, wzgórzu i ciele migdałowatym. Obwody neuronalne zaangażowane w wygaszanie wczesnej pamięci strachu, a w szczególności hipokamp, kora przedczołowa i ciało migdałowate, były badane w wielu pracach [66,114,130,226]. Wykazano, że hipokamp i ciało migdałowate są niezbędne do nabywania, przywoływania i wygaszanie pamięci strachu, a kora przedczołowa do wygaszania pamięci strachu [227,228]. Całkiem niedawno udowodniono również rolę PV,

jako węzła komunikującego korę przedczołową z ciałem migdałowatym, w procesie przypominania zarówno wczesnej, jak i późnej pamięci strachu zależnego od bodźców dźwiękowych [159]. Wyniki mapowania komórek c-Fos⁺ przedstawione w niniejszej rozprawie potwierdzają wcześniejsze doniesienia. Odnotowałem wyższą aktywność ciała migdałowatego (CeM), kory (IL, V1) oraz wzgórza (PV, CM) w grupie myszy zabitych po sesji wygaszania wczesnej pamięci strachu w porównaniu ze zwierzętami zabitymi 24 godziny po treningu (**Rycina 7**). Zauważyłem również, że we wszystkich analizowanych strukturach, poza CeM, trening wygaszania wczesnej pamięci wywołał bardzo podobny wzór ekspresji c-Fos⁺ co ponowna ekspozycja na klatkę treningową (grupa Kontekst). Obserwacja ta sugeruje duże podobieństwo obwodów neuronalnych przetwarzających informację o neutralnych i awersyjnych (związanych z wygaszaniem pamięci strachu) bodźcach ogólnych [226]. Świadczyć to może również o tym, że aktywność żadnej z analizowanych struktur nie jest specyficzna dla wygaszania wczesnej pamięci strachu, lub że analiza ekspresji c-Fos nie pozwala na wykrycie różnic aktywności analizowanych struktur w czasie przetwarzania informacji o awersyjnych i neutralnych bodźcach.

Ponadto zauważyłem, że ekspresja białka c-Fos w grzbietowym hipokampie (pola CA1 i DG) jest niższa po sesji wygaszania wczesnej pamięci strachu w porównaniu z grupą Kontekst. Może wynikać to z faktu, iż wygaszanie pamięci strachu hamuje aktywność pola CA1 i DG. Teza ta znajduje potwierdzenie w pracy Lovett-Barron i in. (2014). Jej autorzy zaobserwowali obniżenie aktywności komórek piramidowych hipokampa wywołane wyższą aktywnością interneuronów w tym obszarze w czasie wygaszania pamięci strachu [229].

Ponadto, interesującą obserwacją jest to, iż u zwierząt T286A^{+/+}, w porównaniu z myszami WT, poziom ekspresji c-Fos w CeM jest niższy, a w V1 wyższy, w trakcie wygaszania wczesnej pamięci strachu (**Rycina 9B i D**). Wskazuje to na udział α CaMKII w tych strukturach podczas wczesnego wygaszania strachu. By zrozumieć rolę tej kinazy w CeM i V1 potrzebne są jednak kolejne badania.

5.5. Obszary mózgu zaangażowane w wygaszanie późnej pamięci strachu

5.5.1. Udział wzgórza w wygaszaniu późnej pamięci strachu

Udział wzgórza w przetwarzaniu pamięci strachu jest ciągle słabo poznany. Jednak liczba prac wykazujących jego rolę w tym procesie istotnie wzrosła w ostatnich latach (Patrz: podrozdział 1.5.). Dlatego zdecydowałem się zweryfikować jak wygaszanie późnej i wczesnej

pamięci strachu zmienia aktywność jąder wzgórza u myszy WT, oraz u myszy T286A^{+/-}, które mają upośledzone wygaszanie późnej pamięci strachu.

Zaobserwowałem, że u myszy WT wygaszanie późnej pamięci strachu, w porównaniu z wczesną pamięcią, podwyższa aktywność PV. Ponadto wygaszanie późnej pamięci strachu prowadzi do hiperaktywacji obszarów należących do wzgórza (RE, CM, i MD) u zwierząt T286A^{+/-} w porównaniu z myszami WT. Nie zaobserwowałem takich różnic między genotypami analizując ekspresję c-Fos po sesji wygaszania wczesnej pamięci. Sugeruje to, że aktywność przyśrodkowej części wzgórza w procesie wygaszania późnej pamięci strachu jest zależna od autofosforylacji α CaMKII-T286, i autofosforylacja tego enzymu jest konieczna do wygaszenia późnej pamięci strachu. Obserwacje te są w zgodzie z doniesieniami opisującymi udział RE w modulacji trwałych, awersyjnych wspomnień [35,176,205,230]. W szczególności połączenia mPFC→RE zaangażowane są w trakcie wygaszania wczesnej pamięci strachu [151], a IL→RE→BLA podczas wygaszania późnej pamięci strachu [51]. Pomimo hiperaktywacji RE, CM i MD u zwierząt T286^{+/-} w czasie wygaszania późnej pamięci strachu, nie zauważyłem różnic w poziomie c-Fos w tych obszarach u myszy WT podczas wygaszania późnej pamięci w porównaniu z wygaszaniem wczesnej pamięci strachu. Podobnie, wcześniejsze prace nie wykazały różnic w ekspresji c-Fos w RE podczas sesji przywoływania wczesnej i późnej pamięci strachu, w porównaniu z grupami zwierząt naiwnych, poddanych warunkowaniu (5US tutaj) i eksponowanej na nowy kontekst [230]. Wcześniejsza praca nie wykazała również podwyższonej ekspresji c-Fos w CM po wygaszaniu późnej pamięci strachu [117]. Podniesiona aktywność CM oraz MD podczas upośledzonego wygaszania sugeruje jednak, że są one zaangażowane w przetwarzanie późnej pamięci strachu. Hipoteza ta musi zostać jednak potwierdzona dodatkowymi eksperymentami.

Wcześniejsze prace pokazały, że przekaźnictwo synaptyczne w synapsach szlaku MD→mPFC rośnie 7 dnia po treningu wygaszania [231]. Jednak, gdy użyto muscymolu do zahamowania aktywności MD przed wygaszaniem pamięci strachu zależnej od bodźców dźwiękowych, zauważono jedynie obniżone zamieranie zwierząt w trakcie sesji wygaszania, lecz nie podczas testu pamięci wygaszania [177]. Może to sugerować, że aktywność MD, podobnie jak CM, jest zaangażowana w ekspresję pamięci strachu, a nie wygaszanie [232]. Wniosek ten został zakwestionowany w pracy z 2012 roku, w której naukowcy z Korei Południowej pokazali, że ciągła stymulacja MD ułatwia wygaszanie pamięci strachu, natomiast stymulacja paczką impulsów (ang. *burst stimulation*) je upośledza [233].

W niniejszej rozprawie, zaobserwowałem wyższą aktywność PV po sesji wygaszania późnej pamięci strachu u myszy WT, w porównaniu z grupą WT skrwawioną po wygaszaniu wczesnej pamięci strachu. Obszar ten był również bardziej aktywny po wygaszaniu wczesnej pamięci w porównaniu z grupą 5US, lecz nie w porównaniu z grupą Kontekst. Zatem moje obserwacje wskazują, że PV jest aktywowany zarówno w czasie wygaszania wczesnej jak i późnej pamięci strachu. Dane te są spójne z obserwacjami opisanymi w pracy Bianki Silva i współpracowników z 2018 roku [117]. Autorzy wykazali, że poziom ekspresji c-Fos jest podniesiony w PV zarówno po sesji wygaszania późnej pamięci strachu, jak i w grupie kontrolnej eksponowanej na neutralny kontekst, w porównaniu ze zwierzętami z grupy Naive. Ponadto, w pracy Tao i in. (2021), autorzy wykazali za pomocą mapowania c-Fos oraz manipulacji opto- i chemogenetycznych, że PV tworzy obwód $IL \rightarrow PV \rightarrow CeL$, który jest istotny do przywoływania wygaszania pamięci strachu. Potwierdza to wcześniejsze doniesienia o zaangażowaniu PV w przetwarzaniu późnej pamięci strachu [49].

5.5.2. Udział jądra łączącego w wygaszaniu pamięci strachu

Wcześniejsze prace wykazały, że RE bierze udział w nabywaniu, konsolidacji i wygaszaniu pamięci strachu u gryzoni [117,176,206,209,230,234,235,235]. W szczególności, cykl trzech prac dotyczących roli RE w wygaszaniu pamięci strachu, wykonanych w pracowni Stephena Marena, wykazał, że RE jest zaangażowane w wygaszanie wczesnej pamięci strachu zależnego od bodźców ogólnych i dźwiękowych [151,157,236]. Podanie muscimolu (agonista receptorów $GABA_A$) do RE podczas sesji wygaszania wczesnej pamięci strachu zależnego od bodźców ogólnych czy dźwiękowych, upośledza wygaszanie pamięci przez szczury Long Evans. W najnowszej pracy z 2022 r., naukowcy Ci pokazali jednak, że podanie szczurom muscimolu do RE tuż po treningu wygaszania pamięci strachu zależnego od bodźców dźwiękowych nie powoduje różnic w poziomie zamierania podczas testu pamięci wygaszania kolejnego dnia. Według autorów aktywność RE nie jest więc konieczna do skonsolidowania nabytej pamięci wygaszania, lecz raczej odpowiada za utrzymanie lub też stabilizację pamięci strachu [236].

Wykonane przeze mnie doświadczenia wskazują, że udział RE w wygaszaniu pamięci strachu zależy od długości przerwy między treningiem a sesją wygaszania. Chemogenetyczne zahamowanie neuronów RE podczas wygaszania wczesnej pamięci strachu powodowało wzmocnienie wygaszania (**Rycina 14 F-H**). Jest to efekt odwrotny do raportowanego w pracy Ramanathan. i wsp. (2019). Przyczyną tej rozbieżności mogą być różnice w lokalizacji inhibicji RE na osi przednio-tylnej i zastosowane metody hamowania

aktywności RE. Z powyższej pracy można wnioskować, że badacze hamowali przede wszystkim tylną część RE, podczas gdy ja, w swoich doświadczeniach transdukowałem wektorem wirusowym hM4Di przede wszystkim komórki przedniej części RE. Badania nad anatomią połączeń neuronalnych RE sugerują, że jego część przednia unerwia CA1 i ENT, a część tylna mPFC [207,208,237]. Ponadto, użyty w pracy Ramanathan. i wsp. (2019) muscimol pobudza hamujące receptory GABA_A i w konsekwencji silnie hamuje aktywność neuronów. Podczas gdy, użyty przeze mnie wektor wirusowy z genem receptora hM4Di, po podaniu CNO powodował raczej obniżenie, niż całkowite zahamowanie aktywności neuronów [238]. Zastosowanie muscimolu mogło również prowadzić do zahamowania większej liczby komórek w RE, niż w przypadku DREADD.

W innej pracy zauważono natomiast, że pobudzenie neuronów GABAergiczných warstwy niepewnej (gr. *zona incerta*, ZI), projektujących do RE wzmacnia wygaszanie pamięci strachu [239]. Zatem, podobnie jak w moich doświadczeniach, hamowanie RE ułatwiało wygaszanie wczesnej pamięci strachu. Sugeruje to, że RE jest strukturą heterogenną zarówno anatomicznie jak i funkcjonalnie, tj. różne populacje neuronów RE odpowiadają za odmienne efekty behawioralne związane z tym samym zadaniem. Hipotezę taką postawiono również w pracy autorstwa Silva i wsp. (2019) na podstawie obserwacji różnic w gęstości komórek c-Fos⁺ między przednią i tylną częścią RE po przywołaniu lub wygaszaniu późnej pamięci strachu. Heterogenność funkcji komórek RE powinna zostać zweryfikowana w przyszłych doświadczeniach.

Zaobserwowałem istotnie upośledzenie wygaszania późnej pamięci strachu przy zahamowaniu aktywności RE. Obserwacja ta zgadza się z publikowanymi doświadczeniami, w których autorzy użyli optogenetycznego hamowania RE podczas wygaszania późnej pamięci strachu [51]. Bazując na tej obserwacji, można założyć, że RE aktywnie promuje wygaszanie późnej pamięci strachu zależnego od bodźców ogólnych. W konsekwencji, przyczynia się do skutecznego wygaszenia strachu. Z niniejszych eksperymentów oraz z przytoczonej literatury wynika, że RE dwukierunkowo moduluje wygaszanie pamięci strachu w zależności od czasu.

Ponieważ komórki glutaminianergiczne stanowią dominującą część mozaiki komórek RE [237,239–241] w dalszych doświadczeniach weryfikowałem rolę neuronów glutaminianergicznych RE w wygaszaniu pamięci strachu używając wektorów wirusowych wyrażających receptory DREADD pod kontrolą promotora CaMKII. Z moich badań wynika, że neurony pobudzające w RE regulują wygaszanie zarówno wczesnej jak i późnej pamięci strachu w czasie sesji. Nie zauważyłem, natomiast wpływu chemogenetycznego hamowania

tych neuronów na konsolidację pamięci wygaszania w żadnym z badanych punktów czasowych (**Rycina 16L-R**).

Biorąc pod uwagę różne efekty chemogenetycznego hamowania neuronów pobudzających (CaMKII-hM4Di) i wszystkich komórek RE (hSyn-hM4Di) można wnioskować, że aktywność neuronów nie-glutaminianergicznycych, więc najprawdopodobniej hamujących, w RE jest niezbędna do prawidłowego wygaszania pamięci strachu. Co ciekawe funkcja komórek hamujących w wygaszaniu pamięci strachu została potwierdzona także w innych obszarach mózgu. Na przykład po podaniu bikukuliny (antagonisty receptorów GABA) do BLA podczas wygaszania pamięci strachu zależnego od bodźców ogólnych, zanotowano wzmocnienie konsolidacji pamięci wygaszania [242]. Ponadto, wykazano, że podanie agonisty presynaptycznych receptorów GABA_B (CGP 36216) przed treningiem wygaszania pamięci strachu zależnego od bodźców dźwiękowych wzmacniało nabywanie pamięci wygaszania [243]. Podsumowując, przeprowadzone przeze mnie doświadczenia sugerują, iż wygaszanie późnej i wczesnej pamięci strachu angażuje różne populacje neuronów RE. Skutkuje to odmiennymi efektami behawioralnymi hamowania neuronów RE podczas treningu wygaszania wczesnej i późnej pamięci. Ponadto, neurony glutaminianergiczne RE odpowiadają za wygaszanie pamięci strachu w czasie sesji, a więc pamięć roboczą, lecz nie za konsolidację pamięci wygaszania. Obserwacja ta sugeruje, że aktywność neuronów hamujących RE, lub interakcja tych neuronów z neuronami glutaminianergicznymi, jest konieczna do trwałego wygaszania pamięci strachu. Należałoby jednak wykonać odpowiednie eksperymenty walidujące tę hipotezę, np. hamując specyficznie aktywność neuronów GABAergicznycych w RE podczas wygaszania pamięci strachu.

5.5.3. Udział MS w wygaszaniu pamięci strachu

Istnieje wiele doniesień, w których wykazano udział MS w tworzeniu pamięci strachu zależnej od bodźców dźwiękowych [202] i ogólnych [203], a także w przetwarzaniu informacji przestrzennej w czasie wygaszania pamięci strachu [204]. W połączeniu z danymi anatomicznymi, wskazującymi na gęste połączenia MS z hipokampem [244–247] i korą śródwęczową [248], powyższe obserwacje sugerują udział MS w przetwarzaniu informacji przestrzennej dotyczącej zagrożeń w środowisku. Taka teza może również znajdować poparcie w obserwacji, iż połączenia neuronalne z MS do CA1 i ENT są zaangażowane w kodowanie przestrzeni [249,250]. Jednakże, dokładna rola MS w wygaszaniu reakcji związanej z późną pamięcią strachu nie została wcześniej opisana.

Zaangażowanie MS w procesy pamięciowe udokumentowano zarówno poprzez lezje, jak i bardziej precyzyjne manipulacje chemiczne i genetyczne [251]. Już ponad czterdzieści lat temu pokazano, że elektrolityczne lezje MS u szczurów poddanych uczeniu z ciągłym wzmocnieniem spowodowały upośledzenie wygaszania [252]. Lata później, używając chemicznych lezji, udowodniono, że MS jest niezbędne dla właściwego przetwarzania wskazówek z otoczenia, podczas klasycznego warunkowania strachu zależnego od bodźców dźwiękowych [203]. Do bardziej precyzyjnych lezji MS stosowano saporynę, tj. toksynę specyficzną dla neuronów cholinergicznyc (najliczniejszych wśród neuronów MS), połączoną ze swoistym przeciwciałem (przeciwko receptorowi p75 o niskim powinowactwie do neurotrofiny). Dzięki temu narzędziu, grupa naukowców z Northwestern University w Chicago wykazała, że neurony cholinergiczne MS regulują wygaszanie wczesnej pamięci strachu zależnej od bodźców ogólnych gdy trening wygaszania składa się z siedmiu sesji przeprowadzonych w ciągu siedmiu dni [164]. Lezje MS i przylegającego doń jądra prążka przekątnego Broca, za pomocą saporyny skoniugowanej z przeciwciałem 192-IgG również doprowadziły u szczurów do upośledzenia wygaszania wczesnej pamięci strachu zależnego od bodźców dźwiękowych [163].

W przeprowadzonych doświadczeniach zauważyłem, że poziom ekspresji c-Fos w MS jest wyższy po sesji wygaszania późnej pamięci niż po wygaszaniu wczesnej pamięci strachu. Obserwacje te sugerują, że zaangażowanie MS w wygaszanie pamięci strachu zmienia się w czasie. Dlatego też zdecydowałem się przetestować rolę MS w procesie wygaszania wczesnej i późnej pamięci strachu. Nie zaobserwowałem zaburzenia wygaszania wczesnej pamięci strachu przy chemogenetycznym zahamowaniu MS w czasie sesji wygaszania (**Rycina 15F-H**). Zauważyłem natomiast, że chemogenetyczna inaktywacja MS podczas wygaszania późnej pamięci strachu upośledza wygaszanie (**Rycina 15I-K**). Tak więc, zmiany ekspresji c-Fos w MS po wygaszaniu wczesnej i późnej pamięci oraz wyniki doświadczeń z wykorzystaniem manipulacji chemogenetycznych są spójne (**Rycina 8C**). Obserwacje te wydają się natomiast stać w opozycji do przytoczonych powyżej danych literaturowych. Możliwą tego przyczyną są różnice w protokole treningu warunkowania i wygaszania pamięci strachu; a także w sposobie i zakresie inaktywacji neuronów MS. Tronson i współpracownicy [164] zaobserwowali upośledzenie procesu wygaszania wczesnej pamięci strachu u myszy z lezjami MS względem zwierząt kontrolnych. Różnice te były jednak widoczne dopiero w czwartym dniu treningu wygaszania. Obserwacja ta jest zbliżona do wyników doświadczenia wykonanego przeze mnie, gdzie nie zauważyłem różnicy w poziomach zamierania pomiędzy myszami hM4Di i kontrolnymi po jednej sesji wygaszania wczesnej pamięci strachu. Co ciekawe, różnica ta prawdopodobnie nie zależy od długości

sesji wygaszania (3 min. u Tronson i wsp. [164], vs 30 min. tutaj), ponieważ w pracy D. Knox i SM. Keller (2016), w której zastosowano długi trening wygaszania, obserwuje się podobny wzór zmian w zachowaniu, co u Tronson i wsp. [164]. Kluczowy dla udziału MS w procesie wygaszania pamięci strachu wydaje się być więc czas od treningu do sesji wygaszania.

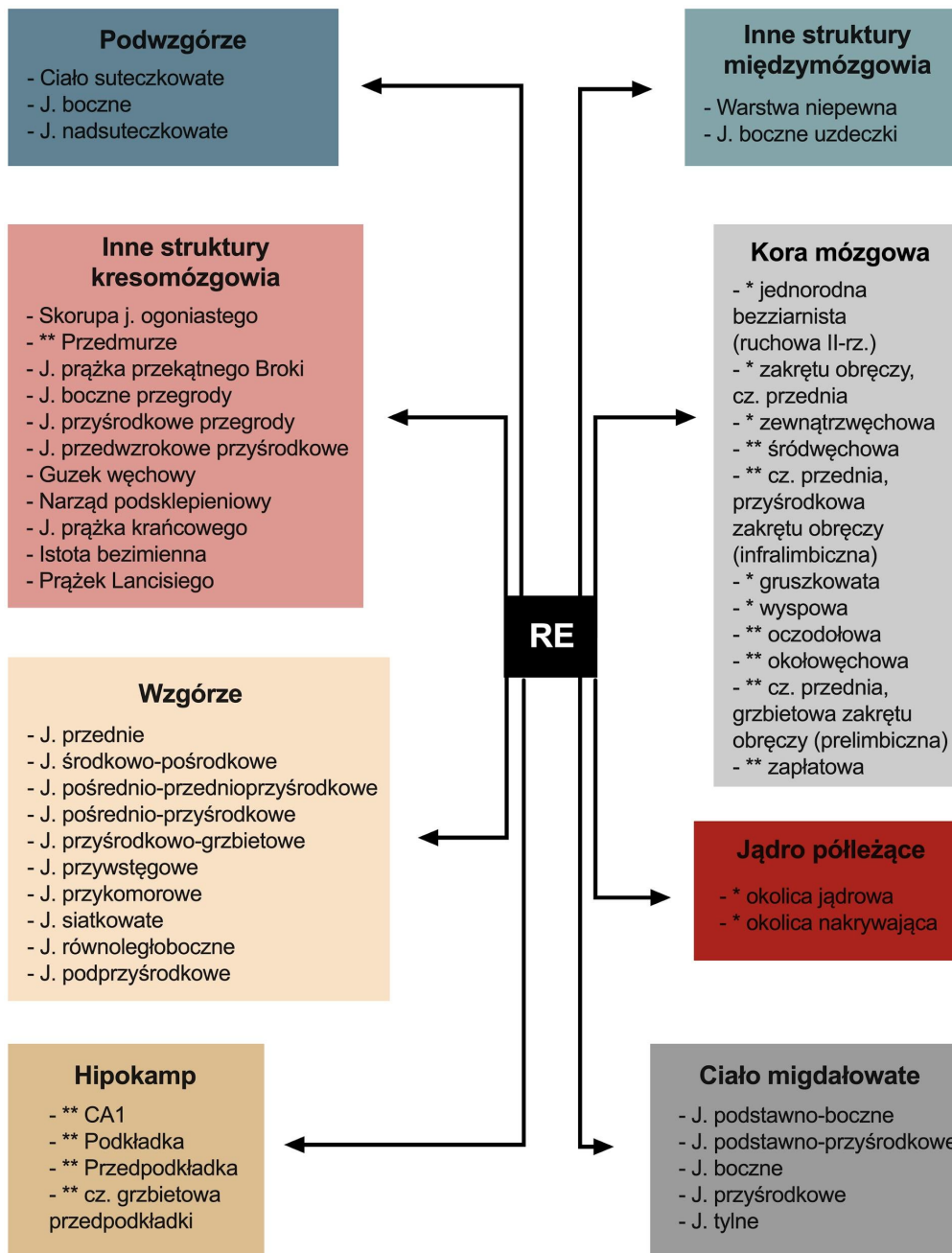
Przyczyną różnic między moimi wynikami a danymi literaturowymi może być również technika inaktywacji neuronów. Saporyna połączona z przeciwciałem skierowanym przeciwko receptorowi p75 dla neurotrofin pozwala na specyficzną manipulację i trwałe uszkodzenie neuronów cholinergicznym MS [164]. Użyte przeze mnie wektory wirusowe prowadziły zaś do ekspresji hSyn-hM4Di we wszystkich neuronach, lecz ich zahamowanie było tylko czasowe. A zatem możliwe, że trwała lezja MS wpływa na tworzenie, przechowywanie i wygaszanie wczesnej pamięci, podczas gdy chemogenetyczne zahamowanie MS ograniczone do sesji wygaszania nie ma takiego wpływu.

Ponadto, różnice pomiędzy moimi obserwacjami a obserwacjami badaczy, którzy pokazali zaburzenia wygaszania wczesnej pamięci przez inaktywację MS, mogą wiązać się z protokołem warunkowania strachu. Podczas gdy ja używałem warunkowanie na bodźce ogólne, Tronson et al. [164] użyli protokołu warunkowania na bodźce dźwiękowe.

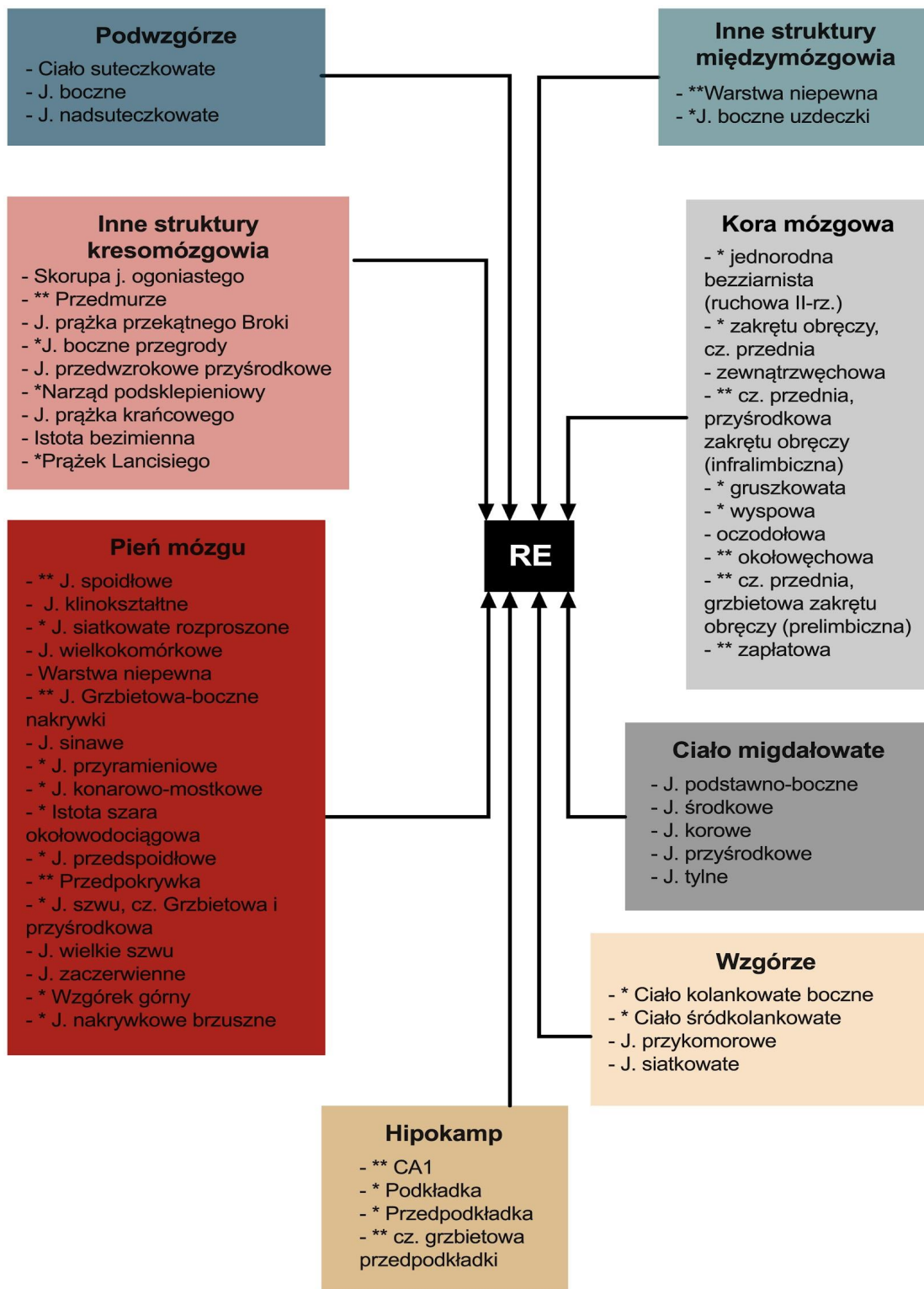
5.5.4. Udział projekcji RE→MS w wygaszaniu strachu

RE unerwia wiele struktur mózgu (**Ryc. 19**) i jest unerwiane przez ponad 30 obszarów (**Ryc. 20**) [253]. RE posiada także około 11% neuronów bifurkujących, które unerwiają zarówno korę zakrętu obręczy i przyśrodkową część kory przedczołowej, jak i korę zapłatową [254]. Jak dotąd najlepiej poznanym funkcjonalnie obwodem neuronalnym, w którym uczestniczy RE jest oś mPFC→RE→hipokamp. Projekcja mPFC→RE pośredniczy w procesie wygaszania strachu [151]. Inaktywacja zarówno RE, jak i projekcji mPFC→RE, powoduje deficyty wygaszania wczesnej pamięci strachu zależnego do bodźców dźwiękowych, a także jej przypominania. Chemogenetyczna, nieselektywna inhibicja gęstych projekcji do RE z IL, PL, jak i z obu tych struktur jednocześnie, skutkuje wyższym zamieraniem szczurów w trakcie wygaszania wczesnej pamięci strachu w porównaniu do grupy kontrolnej. Podobny efekt obserwowano także dzień później, podczas przypominania pamięci wygaszania. Ponadto farmakologiczne zahamowanie RE po sesji wygaszania powoduje upośledzenie konsolidacji pamięci wygaszania i obniżenie poziomu ekspresji c-Fos w mPFC i brzusznej części hipokampa [255]. W pracy autorstwa Venkataraman i wsp. (2021) zaprezentowano natomiast, że optogenetyczne pobudzenie komórek GABAergicznym lub dopaminergicznym ścieżki neuronalnej ZI→RE prowadzi do wzmocnienia wygaszania wczesnej pamięci strachu

zależnego od bodźców dźwiękowych [239]. Doniesienie to odkrywa coraz bardziej złożony obraz roli jaką pełni RE w obwodach neuronalnych wygaszania pamięci strachu.



Rycina 19. Obszary mózgu unerwiane przez RE. J. - jądro, II-rz. - drugorzędowa, cz. - część, ** gęste projekcje, * projekcje o średniej gęstości, do regionów bez oznaczenia gwiazdką docierają jedynie rzadkie zakończenia neuronalne z RE. Zaadaptowano z [253].



Rycina 20. Obszary mózgu unerwiające RE. J. - jądro, II-rz. - drugorzędowa, cz. - część, ** gęste projekcje, * projekcje o średniej gęstości, do regionów bez oznaczenia gwiazdką docierają jedynie rzadkie zakończenia neuronalne z RE. Zaadaptowano z [253].

Projekcja RE→BLA również bierze udział w wygaszaniu późnej pamięci strachu zależnego od bodźców ogólnych [51]. Wykazano, że zarówno aktywność pobudzających projekcji RE→BLA, jak i aktywność komórek RE, wzrasta krótko przed zakończeniem epizodu zamierania. Ponadto, chemogenetyczne zahamowanie tych projekcji w trakcie późnego wygaszania strachu powoduje upośledzenie wygaszania późnej pamięci strachu. Badania te sugerują, że RE odpowiada za przekazywanie do BLA informacji o bezpiecznym otoczeniu w czasie przetwarzania późnej pamięci strachu. Wyniki zahamowania aktywności projekcji pobudzających RE→MS podczas wygaszania pamięci strachu zaprezentowane w niniejszej dysertacji ukazują podobny efekt do uzyskanego w powyższej pracy - upośledzenie wygaszania późnej pamięci strachu zależnego od bodźców ogólnych (**Rycina 17**). Wynik ten znajduje również potwierdzenie w obserwacjach, które poczyniłem podczas manipulacji aktywnością MS oraz RE (**Rycina 15-16**).

Rozważając konsekwencje zahamowania projekcji RE→MS w kontekście połączeń anatomicznych, należy wspomnieć o polu CA1 hipokampa, które jest unerwiane zarówno przez MS jak i RE [208,255–257] i odpowiada za uczenie przestrzenne oraz za warunkowanie i wygaszanie pamięci strachu zależnego od bodźców ogólnych [92,198–200]. MS i RE synchronizują rytmy theta w hipokampie i wpływają na lokalne potencjały polowe w obwodzie hipokamp→RE→mPFC [258,259]. Wykazano, że zahamowanie projekcji RE→CA1 podczas przypominania wczesnej pamięci strachu, skutkuje upośledzonym wygaszaniem pamięci strachu w kolejnych dniach. Ponadto, aktywność tych połączeń jest bezpośrednio skorelowana z okresami zamierania zwierząt [158]. Jak dowiadujemy się z pracy Silva i in. (2021), pobudzenie aktywności RE u myszy nie zmienia aktywności grzbietowego pola CA1 (mierzonej jako poziom ekspresji c-Fos), podnosi natomiast aktywność BLA. W obliczu braku dowodów na bezpośredni wpływ aktywności projekcji RE→CA1 na wygaszanie późnej pamięci strachu, pozostaje jedynie spekulować o ich roli. Możliwym jest również scenariusz zaangażowania szerszej sieci obwodów neuronalnych i niebezpośredniego wpływu RE na CA1 podczas późnego wygaszania strachu. W takim ujęciu RE mogłoby przekazywać informację o bezpieczeństwie do CA1 poprzez ścieżkę RE→MS→CA1. Hipoteza ta musiałaby jednak zostać zweryfikowana eksperymentalnie.

Podsumowując, zaprezentowane przeze mnie wyniki zahamowania projekcji RE→MS odślaniają kolejny element obwodów neuronalnych odpowiedzialnych za wygaszanie późnej pamięci strachu i udowadnia, że wraz z upływem czasu, obwody neuronalne leżące u podstaw wygaszania strachu ulegają zmianie. W szczególności, przeprowadzone przeze

mnie doświadczenia wskazują, że z upływem czasu rośnie udział obszarów wzgórza w przetwarzaniu pamięci strachu.

5.5.5. Udział wzroku i V1 w wygaszaniu pamięci strachu kontekstu

Dane literaturowe pokazują, iż oświetlenie klatki skutkuje podwyższonym poziomem zamierania myszy C57BL/6 w trakcie klasycznego warunkowania zależnego od bodźców dźwiękowych oraz ponownej ekspozycji zwierząt na klatkę treningową [260]. Rolę informacji wzrokowej w wygaszaniu pamięci strachu sugeruje także przeprowadzona przeze mnie analiza ekspresji białka c-Fos. Zaobserwowałem wzrost gęstości komórek c-Fos⁺ w V1 po wygaszaniu późnej pamięci strachu. W kolejnych przeprowadzonym przeze mnie eksperymencie zauważyłem jednak, że oświetlenie klatki podczas treningu warunkowania klasycznego zależnego od bodźców ogólnych nie ma znacznego wpływu na wygaszanie. Wynik ten stoi w kontrze do przytaczanej powyżej pracy, a rozbieżność tę można wytłumaczyć innym rodzajem treningu warunkowania strachu (zależnego od bodźca dźwiękowego vs. od bodźców ogólnych), który aktywuje różne obszary mózgu, co może przełożyć się na zmianę w zachowaniu zwierząt. Inną przyczyną może być postępująca z czasem generalizacja strachu i utrata szczegółowości pamięci względem kształtów otoczenia [261].

Pierwszorzędowa kora wzrokowa jest podstawowym obszarem korowym dla sygnałów wizualnych pochodzących z otoczenia, ale jej rola w warunkowaniu strachu i jego wygaszaniu jest słabo poznana. Literatura naukowa dostarcza nam już od lat dowodów na wrażliwość kory wzrokowej na bodźce wzrokowe nacechowane emocjonalnie [262,263]. Okazuje się również, że w wyniku ablacji kory wzrokowej u szczurów, zanotowano upośledzenie wygaszania pamięci strachu zależnego od wizualnych bodźców warunkowych [264]. Jednak, od lat istnieje nierozwiązany dyskurs dotyczący roli V1 w wygaszaniu pamięci strachu, gdyż obserwacje LeDoux i in. (1989) zostawały podważane w późniejszych latach. Wykazano, że lezja kory wzrokowej nie zaburza wygaszania silnego strachu zależnego od wizualnych bodźców warunkowych [215]. Podobnie, przeprowadzona przeze mnie dwustronna inaktywacja chemogenetyczna V1, tuż przed treningiem późnego wygaszania pamięci strachu zależnego od bodźców ogólnych nie wywołała zaburzeń wygaszania (**Rycina 18**). Obserwacje zaprezentowane przeze mnie kwestionują zatem udział V1 podczas wygaszania. Możliwe jest także, że przy zahamowaniu aktywności V1, czy w ciemności, zwierzęta korzystają z innych kanałów informacji (np. dotyku) by wygasić pamięć strachu kontekstu.

5.5.6. Udział CA1 w wygaszaniu pamięci strachu

Literatura przedmiotu przedstawia, że warunkowanie klasyczne zależne od bodźców ogólnych, oraz wygaszanie wczesnej pamięci strachu, zależne są w dużej mierze od hipokampa [92,198–200,265]. Istnieje także wiele doniesień wykazujących, że pole CA1 jest zaangażowane w przywoływanie późnej pamięci strachu [29,41,52,266–268]. Jednocześnie w wielu badaniach wykorzystujących mapowanie aktywności, czy lezje hipokampa, wykazano, że przywoływanie późnej pamięci strachu nie wymaga udziału tej struktury [26,33,36,201]. Wydaje się więc, że udział hipokampa w przetwarzaniu późnej pamięci strachu jest możliwy, jednak nie konieczny, i zależy od wielu czynników. Wyniki zahamowania aktywności komórek glutaminianergicznych (CaMKII-hM4Di) grzbietowego pola CA1 hipokampa przedstawione w niniejszej rozprawie wskazują, że wygaszanie późnej pamięci strachu jest możliwe przy zahamowaniu aktywności dCA1. Obserwowany brak wpływu chemogenetycznego hamowania CA1 na wygaszanie późnej pamięci strachu może wynikać z wielu powodów. Po pierwsze, w przeciwieństwie do pobudzenia komórek GABAergicznycy, hamowanie komórek pobudzających hipokampa nie jest wystarczające do zaburzenia przypominania pamięci wczesnej strachu [269]. Po drugie, zastosowany intensywny trening warunkowania strachu (5US) mógł spowodować wyjątkową trwałość śladu pamięciowego [216,217], oraz mógł aktywować alternatywne obwody neuronalne [270]. Po trzecie, możliwe jest, że z czasem wspomnienia tracą precyzję (ulegają generalizacji) i mogą być przypominane bez udziału dCA1 [261]. Na koniec, przeprowadzone przeze mnie analizy ekspresji c-Fos wskazują, że wygaszanie pamięci strachu hamuje aktywność CA1. Możliwe zatem, że chemogenetyczne hamowanie komórek glutaminianergicznych dCA1 wspierało jedynie ten proces. W kolejnych doświadczeniach warto by zatem zahamować wszystkie neurony dCA1 lub specyficznie neurony hamujące.

5.5.7. Udział IL w wygaszaniu pamięci strachu

Uważa się, że aktywność kory infralimbicznej, będącej częścią przyśrodkowej kory przedczołowej, jest niezbędna do nabycia i konsolidacji pamięci wygaszania [118,139,140,142,143,271]. Reaktywacja komórek engramu późnej pamięci strachu znajdujących się w IL jest również wymagana do wygaszania pamięci strachu [272]. Wiadomo także, że znajdująca się powyżej IL, PrL pełni odmienną do niej rolę, stymulując ekspresję strachu [144,273]. W wykonanych przeze mnie doświadczeniach, chemogenetycznie hamowałem aktywność komórek IL trakcie wygaszania zarówno wczesnej jak i późnej pamięci strachu. Uzyskane przeze mnie wyniki pokazują, że inaktywacja IL nie wpływała na wygaszania pamięci strachu. Wyniki te przeczą danym

zawartym w przytoczonych powyżej publikacjach, a rozbieżność wyników moich doświadczeń i tych opisanych w literaturze może wynikać z niezamierzonej transdukcji komórek PrL, gdy celem była kora IL (**Rycina 14B-E**). Z przeprowadzonego przez Sierra-Mercado i współpracowników (2011) doświadczenia dowiadujemy się, że zahamowanie za pomocą muscimolu aktywności PrL tuż przed treningiem wygaszania poprawia wygaszanie w czasie sesji, lecz nie wpływa na zachowanie zwierząt podczas testu [144]. Dlatego, możliwym jest również efekt dysinhibicji komórek pobudzających w warstwie 5/6 PrL, których aktywność przyczynia się do wzmocnienia wygaszania strachu, a które są bezpośrednio unerwiane przez komórki warstwy 5/6 w IL [115,274].

6. Podsumowanie i wnioski

Badania przedstawione w niniejszej rozprawie dowodzą udziału wzgórza w wygaszaniu późnej pamięci strachu oraz, że proces ten zależy od aktywności α CaMKII. W szczególności wykazałem, że:

- obniżona autofosforylacja α CaMKII u myszy T286A^{+/-} upośledza wygaszanie późnej pamięci strachu. Obserwacja ta sugeruje, że aktywność α CaMKII jest zaangażowana w długotrwałe przechowywanie śladów pamięciowych.
- Wzorec ekspresji c-Fos w mózgu myszy T286A^{+/-} w trakcie wygaszania późnej pamięci strachu różni się od wzoru u myszy WT, sugerując udział α CaMKII w regulacji aktywności mózgu w czasie wygaszania późnej pamięci strachu.
- U myszy WT obserwuje się zwiększoną aktywność wzgórza (CM, PV), ciała migdałowatego (CeM) oraz kory mózgowej (IL i V1), podczas wygaszania wczesnej pamięci strachu, w porównaniu z grupą 5US. Ponadto, wygaszanie późnej pamięci strachu, silniej niż wygaszanie pamięci wczesnej, aktywuje wzgórze (PV) i przegrodę (MS).
- U myszy T286A^{+/-} zaobserwowałem podwyższoną względem myszy WT aktywności wzgórza (RE, MD, CM) oraz V1, sugerując zależność tych struktur od autofosforylacji α CaMKII w trakcie wygaszania pamięci strachu.
- Aktywność MS jest niezbędna do efektywnego wygaszania późnej, lecz nie wczesnej, pamięci strachu.
- Aktywność RE utrudnia wygaszanie wczesnej pamięci strachu i ułatwia wygaszanie późnej pamięci.
- Neurony glutaminianergiczne RE biorą udział w kontroli wygaszania pamięci strachu w czasie sesji (pamięć robocza) lecz nie w konsolidacji pamięci wygaszania. Obserwacja ta sugeruje rolę nielicznych neuronów hamujących RE w tym procesie.

- Aktywność pobudzających projekcji RE→MS jest kluczowa do wygaszenia późnej pamięci strachu.

Ograniczenia

Należy także wspomnieć o ograniczeniach przedstawionych tu badań. Ograniczenia te wynikają między innymi z różnej podstawowej aktywności promotora genu *c-fos* w różnych obszarach mózgu i typach komórek. Warto zatem być ostrożnym porównując międzyregionalne poziomy ekspresji tego białka. Ponadto, poziom ekspresji białka c-Fos w stanie podstawowym jest niski, a co za tym idzie niełatwo jest zmierzyć hamowanie obszarów mózgu stosując analizę ekspresji białka c-Fos.

Co ważne, w swoich badaniach wykorzystałem jedynie samce linii C57BL6. PTSD, jest natomiast częstszym schorzeniem u kobiet. Jak wykazano wcześniej istnieją międzypłciowe różnice w sposobie przetwarzania informacji o zagrożeniu u myszy [275,276], czy w zdolności do przypominania pamięci wygaszania u ludzi [277]. Dlatego też, w przyszłych badaniach należałoby zweryfikować czy obszary mózgu zaangażowane w wygaszanie późnej pamięci strachu u samców, odpowiadają za ten proces także u samic.

Należałoby także w przyszłości przeprowadzić testy weryfikujące udział obszarów wzgórza w regulacji odnowienia reakcji strachu, a także w generalizacji bodźca warunkowego.

7. Bibliografia

1. Ribot Th. Diseases of memory: Essays in the positive psychology. London, Great Britain: Kegan Paul, Trench & Co; 1882.
2. Müller GE, Pilzecker A. Experimentelle Beiträge zur Lehre vom Gedächtniss. J.A. Barth; 1900.
3. Lechner HA, Squire LR, Byrne JH. 100 years of consolidation--remembering Müller and Pilzecker. *Learn Mem Cold Spring Harb N.* 1999;6:77–87.
4. Hebb DO. The organization of behavior: a neuropsychological theory. New York: Wiley; 1949.
5. Lashley KS. In search of the engram. *Physiol. Mech. Anim. Behav. Soc. Symp. IV*, Oxford, England: Academic Press; 1950. p. 454–482.
6. Konorski J. Conditioned Reflexes and Neuron Organization. CUP Archive; 1948.
7. Bellfy L, Kwapis JL. Molecular Mechanisms of Reconsolidation-Dependent Memory Updating. *Int J Mol Sci.* 2020;21.
8. Zilles K. Neuronal plasticity as an adaptive property of the central nervous system. *Ann Anat - Anat Anz.* 1992;174:383–391.
9. Bailey CH, Kandel ER. Structural changes accompanying memory storage. *Annu Rev Physiol.* 1993;55:397–426.
10. Kandel ER. The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and CPEB. *Mol Brain.* 2012;5:14.
11. Bailey CH, Kandel ER, Harris KM. Structural components of synaptic plasticity and memory consolidation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015. 2015. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021758>.
12. Glazewski S, Giese KP, Silva A, Fox K. The role of α -CaMKII autophosphorylation in neocortical experience-dependent plasticity. 2000. 2000.
13. Coultrap SJ, Bayer KU. CaMKII regulation in information processing and storage. *Trends Neurosci.* 2012;35:607–618.
14. Silva AJ, Paylor R, Wehner JM, Tonegawa S. Impaired spatial learning in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science.* 1992;257:206–211.
15. Silva AJ, Stevens CF, Tonegawa S, Wang Y. Deficient hippocampal long-term potentiation in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science.* 1992;257:201–206.
16. Halt AR, Dallapiazza RF, Zhou Y, Stein IS, Qian H, Juntti S, et al. CaMKII binding to GluN2B is critical during memory consolidation. *EMBO J.* 2012;31:1203–1216.

17. Frankland PW, O'Brien C, Ohno M, Kirkwood A, Silva AJ. α -CaMKII-dependent plasticity in the cortex is required for permanent memory. *Nature*. 2001;411:309–313.
18. Maguire EA, Mullally SL. The Hippocampus: A Manifesto for Change. *J Exp Psychol Gen*. 2013;142:1180–1189.
19. Yassa MA, Reagh ZM. Competitive Trace Theory: A Role for the Hippocampus in Contextual Interference during Retrieval. *Front Behav Neurosci*. 2013;7:107.
20. Sutherland RJ, Lee JQ, McDonald RJ, Lehmann H. Has multiple trace theory been refuted? *Hippocampus*. 2020;30:842–850.
21. Moscovitch M, Nadel L, Winocur G, Gilboa A, Rosenbaum RS. The cognitive neuroscience of remote episodic, semantic and spatial memory. *Curr Opin Neurobiol*. 2006;16:179–190.
22. Moscovitch M, Gilboa A. Has the concept of systems consolidation outlived its usefulness? Identification and evaluation of premises underlying systems consolidation. *Fac Rev*. 2022;11:33.
23. Squire LR, Alvarez P. Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. *Curr Opin Neurobiol*. 1995;5:169–177.
24. McClelland JL, McNaughton BL, O'Reilly RC. Why there are complementary learning systems in the hippocampus and neocortex: insights from the successes and failures of connectionist models of learning and memory. *Psychol Rev*. 1995;102:419–457.
25. Nadel L, Moscovitch M. Memory consolidation, retrograde amnesia and the hippocampal complex. *Curr Opin Neurobiol*. 1997;7:217–227.
26. Frankland PW, Bontempi B. The organization of recent and remote memories. *Nat Rev Neurosci*. 2005;6:119–130.
27. Morris RGM. Elements of a neurobiological theory of hippocampal function: the role of synaptic plasticity, synaptic tagging and schemas. *Eur J Neurosci*. 2006;23:2829–2846.
28. Eichenbaum H. Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. *Neuron*. 2004;44:109–120.
29. Barry DN, Maguire EA. Remote Memory and the Hippocampus: A Constructive Critique. *Trends Cogn Sci*. 2019;23:128–142.
30. Josselyn SA, Köhler S, Frankland PW. Finding the engram. *Nat Rev Neurosci*. 2015;16:521–534.
31. Scoville WB, Milner B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1957;20:11–21.
32. Bontempi B, Laurent-Demir C, Destrade C, Jaffard R. Time-dependent reorganization of

- brain circuitry underlying long-term memory storage. *Nature*. 1999;400:671–675.
33. Frankland PW, Bontempi B, Talton LE, Kaczmarek L, Silva AJ. The Involvement of the Anterior Cingulate Cortex in Remote Contextual Fear Memory. 2004;304:881–883.
 34. Frankland PW, Ding H, Takahashi E, Suzuki A, Kida S, Silva AJ. Stability of recent and remote contextual fear memory. *Learn Mem Cold Spring Harb N*. 2006;13:451–457.
 35. Wheeler, Teixeira M, Wang AH, Xiong X, Kovacevic N. Identification of a Functional Connectome for Long-Term Fear Memory in Mice. 2013;9.
 36. Varela C, Weiss S, Meyer R, Halassa M, Biedenkapp J, Wilson MA, et al. Tracking the Time-Dependent Role of the Hippocampus in Memory Recall Using DREADDs. *PLoS One*. 2016;11:e0154374.
 37. Kitamura T, Ogawa SK, Roy DS, Okuyama T, Morrissey MD, Smith LM, et al. Engrams and circuits crucial for systems consolidation of a memory. *Science*. 2017;356:73–78.
 38. Winocur G, Moscovitch M. Memory transformation and systems consolidation. *J Int Neuropsychol Soc*. 2011;17:766–780.
 39. Nadel L, Winocur G, Ryan L, Moscovitch M. Systems consolidation and hippocampus: two views. *Debates Neurosci*. 2007;1:55–66.
 40. Tse D, Langston RF, Kakeyama M, Bethus I, Spooner PA, Wood ER, et al. Schemas and memory consolidation. *Science*. 2007;316:76–82.
 41. Goshen I, Brodsky M, Prakash R, Wallace J, Gradinaru V, Ramakrishnan C, et al. Dynamics of retrieval strategies for remote memories. *Cell*. 2011;147:678–689.
 42. Lehmann H, Lacanilao S, Sutherland RJ. Complete or partial hippocampal damage produces equivalent retrograde amnesia for remote contextual fear memories. *Eur J Neurosci*. 2007;25:1278–1286.
 43. Lee J-H, Kim WB, Park EH, Cho J-H. Neocortical synaptic engrams for remote contextual memories. *Nat Neurosci*. 2022. 23 December 2022. <https://doi.org/10.1038/s41593-022-01223-1>.
 44. Kwan D, Carson N, Addis DR, Rosenbaum RS. Deficits in past remembering extend to future imagining in a case of developmental amnesia. *Neuropsychologia*. 2010;48:3179–3186.
 45. Cho J, Rendall SD, Gray JM. Brain-wide maps of Fos expression during fear learning and recall. 2017. 2017.
 46. Cummings KA, Clem RL. Prefrontal somatostatin interneurons encode fear memory. *Nat Neurosci*. 2020;23:61–74.
 47. Tang J, Ko S, Ding H-K, Qiu C-S, Calejesan AA, Zhuo M. Pavlovian fear memory induced by activation in the anterior cingulate cortex. *Mol Pain*. 2005;1:6.

48. Zelikowsky M, Bissiere S, Hast TA, Bennett RZ, Abdipranoto A, Vissel B, et al. Prefrontal microcircuit underlies contextual learning after hippocampal loss. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:9938–9943.
49. Do-Monte FH, Quiñones-Laracuenta K, Quirk GJ. A temporal shift in the circuits mediating retrieval of fear memory. *Nature*. 2015;519:460–463.
50. Rajasethupathy P, Sankaran S, Marshel JH, Kim CK, Ferenczi E, Lee SY, et al. Projections from neocortex mediate top-down control of memory retrieval. *Nature*. 2015;526:653–659.
51. Silva BA, Astori S, Burns AM, Heiser H, van den Heuvel L, Santoni G, et al. A thalamo-amygdalar circuit underlying the extinction of remote fear memories. *Nat Neurosci*. 2021;24:964–974.
52. Vetere G, Xia F, Ramsaran AI, Tran LM, Josselyn SA, Frankland PW. An inhibitory hippocampal–thalamic pathway modulates remote memory retrieval. *Nat Neurosci*. 2021:1–9.
53. Gilboa A, Moscovitch M. No consolidation without representation: Correspondence between neural and psychological representations in recent and remote memory. *Neuron*. 2021;109:2239–2255.
54. Kol A, Adamsky A, Groysman M, Kreisel T, London M, Goshen I. Astrocytes contribute to remote memory formation by modulating hippocampal–cortical communication during learning. *Nat Neurosci*. 2020;23:1229–1239.
55. Adamsky A, Goshen I. Astrocytes in Memory Function: Pioneering Findings and Future Directions. *Neuroscience*. 2018;370:14–26.
56. Chen MB, Jiang X, Quake SR, Südhof TC. Persistent transcriptional programmes are associated with remote memory. *Nature*. 2020;587:437–442.
57. Pan S, Mayoral SR, Choi HS, Chan JR, Kheirbek MA. Preservation of a remote fear memory requires new myelin formation. *Nat Neurosci*. 2020;23:487–499.
58. LeDoux JE, Place W, York N, Kline N. Evolution of human emotion: a view through fear. 2012:431–442.
59. Atwoli L, Stein DJ, Koenen KC, McLaughlin KA. Epidemiology of posttraumatic stress disorder: Prevalence, correlates and consequences. *Curr Opin Psychiatry*. 2015;28:307–311.
60. Sareen J. Posttraumatic Stress Disorder in Adults: Impact, Comorbidity, Risk Factors, and Treatment. 2014;59:460–467.
61. Shalev A, Liberzon I, Marmar C. Post-Traumatic Stress Disorder. *N Engl J Med*. 2017;376:2459–2469.

62. Bouton ME, Mineka S, Barlow DH. A modern learning theory perspective on the etiology of panic disorder. *Psychol Rev.* 2001;108:4–32.
63. Pavlov IP. Conditioned reflexes. An investigation of the physiological activity of the cerebral cortex. Translated and edited by E. V. ANREP. *Cond Reflexes Investig Physiol Act Cereb Cortex Transl Ed E V ANREP.* 1927. 1927.
64. Konorski J. Integrative activity of the brain: an interdisciplinary approach. Chicago: University of Chicago Press; 1967.
65. Eisenberg M, Kobilko T, Berman DE, Dudai Y. Stability of retrieved memory: inverse correlation with trace dominance. *Science.* 2003;301:1102–1104.
66. Myers KM, Davis M. Mechanisms of fear extinction. *Mol Psychiatry.* 2007;12:120–150.
67. Quirk GJ, Mueller D. Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol.* 2008;33:56–72.
68. Pape H-C, Pare D. Plastic synaptic networks of the amygdala for the acquisition, expression, and extinction of conditioned fear. *Physiol Rev.* 2010;90:419–463.
69. Khalaf O, Resch S, Dixsaut L, Gorden V, Glauser L, Gräff J. Reactivation of recall-induced neurons contributes to remote fear memory attenuation. *Science.* 2018;360:1239–1242.
70. Dunsmoor JE, Niv Y, Daw N, Phelps EA. Rethinking Extinction. *Neuron.* 2015;88:47–63.
71. Clem RL, Schiller D. New learning and unlearning: strangers or accomplices in threat memory attenuation? *Trends Neurosci.* 2016;39:340–351.
72. Rescorla RA. Spontaneous Recovery. *Learn Mem.* 2004;11:501–509.
73. Bouton ME. Differential control by context in the inflation and reinstatement paradigms. *J Exp Psychol Anim Behav Process.* 1984;10:56–74.
74. Bouton ME, Bolles RC. Role of conditioned contextual stimuli in reinstatement of extinguished fear. *J Exp Psychol Anim Behav Process.* 1979;5:368–378.
75. Rescorla RA, Heth CD. Reinstatement of fear to an extinguished conditioned stimulus. *J Exp Psychol Anim Behav Process.* 1975;1:88–96.
76. Quirk GJ. Memory for Extinction of Conditioned Fear Is Long-lasting and Persists Following Spontaneous Recovery. *Learn Mem.* 2002;9:402–407.
77. Westbrook RF, Iordanova M, McNally G, Richardson R, Harris JA. Reinstatement of fear to an extinguished conditioned stimulus: Two roles for context. *J Exp Psychol Anim Behav Process.* 2002;28:97–110.
78. Bouton ME, King DA. Contextual control of the extinction of conditioned fear: Tests for the associative value of the context. *J Exp Psychol Anim Behav Process.* 1983;9:248–265.

79. Maren S, Phan KL, Liberzon I. The contextual brain: implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. *Nat Rev Neurosci*. 2013;14:417–428.
80. Li SH, Westbrook RF. Massed extinction trials produce better short-term but worse long-term loss of context conditioned fear responses than spaced trials. *J Exp Psychol Anim Behav Process*. 2008;34:336–351.
81. Laborda MA, Miller RR. Preventing Return of Fear in an Animal Model of Anxiety: Additive Effects of Massive Extinction and Extinction in Multiple Contexts. *Behav Ther*. 2013;44:249–261.
82. Monfils M-H, Cowansage KK, Klann E, LeDoux JE. Extinction-reconsolidation boundaries: key to persistent attenuation of fear memories. *Science*. 2009;324:951–955.
83. Costanzi M, Cannas S, Saraulli D, Rossi-Arnaud C, Cestari V. Extinction after retrieval: effects on the associative and nonassociative components of remote contextual fear memory. *Learn Mem Cold Spring Harb N*. 2011;18:508–518.
84. Milad MR, Pitman RK, Ellis CB, Gold AL, Shin LM, Lasko NB, et al. Failure extinction recall PTSD. *Biological Psychiatry*. 2009;66:1075–1082.
85. Jovanovic T, Norrholm SD, Blanding NQ, Davis M, Duncan E, Bradley B, et al. Impaired fear inhibition is a biomarker of PTSD but not depression. *Depress Anxiety*. 2010;27:244–251.
86. Lissek S, van Meurs B. Learning models of PTSD: Theoretical accounts and psychobiological evidence. *Int J Psychophysiol Off J Int Organ Psychophysiol*. 2015;98:594–605.
87. Alberini CM. The role of reconsolidation and the dynamic process of long - term memory formation and storage. 2011;5:1–10.
88. Gräff J, Joseph NF, Horn ME, Samiei A, Meng J, Seo J, et al. Epigenetic priming of memory updating during reconsolidation to attenuate remote fear memories. *Cell*. 2014;156:261–276.
89. Tsai L-H, Gräff J. On the resilience of remote traumatic memories against exposure therapy-mediated attenuation. *EMBO Rep*. 2014;15:853–861.
90. Wehner JM, Radcliffe RA. Cued and contextual fear conditioning in mice. *Curr Protoc Neurosci*. 2004;Chapter 8:Unit 8.5C.
91. Marschner A, Kalisch R, Vervliet B, Vansteenwegen D, Büchel C. Dissociable roles for the hippocampus and the amygdala in human cued versus context fear conditioning. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2008;28:9030–9036.
92. LeDoux JE, Phillips R. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued

- and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci.* 1992;106:274–285.
93. Hefner K, Whittle N, Juhasz J, Norcross M, Karlsson R-M, Saksida LM, et al. Impaired Fear Extinction Learning and Cortico-Amygdala Circuit Abnormalities in a Common Genetic Mouse Strain. *J Neurosci.* 2008;28:8074–8085.
 94. Park K, Chung C. Systemic Cellular Activation Mapping of an Extinction-Impaired Animal Model. *Front Cell Neurosci.* 2019;13:1–11.
 95. Muigg P, Hetzenauer A, Hauer G, Hauschild M, Gaburro S, Frank E, et al. Impaired extinction of learned fear in rats selectively bred for high anxiety – evidence of altered neuronal processing in prefrontal-amygdala pathways. *Eur J Neurosci.* 2008;28:2299–2309.
 96. Flandreau EI, Toth M. Animal Models of PTSD: A Critical Review. In: Vermetten E, Baker DG, Risbrough VB, editors. *Behav. Neurobiol. PTSD*, Cham: Springer International Publishing; 2018. p. 47–68.
 97. Martel G, Hevi C, Friebely O, Baybutt T, Shumyatsky GP. Zinc transporter 3 is involved in learned fear and extinction, but not in innate fear. *Learn Mem Cold Spring Harb N.* 2010;17:582–590.
 98. Meins M, Herry C, Müller C, Ciochi S, Moreno E, Lüthi A, et al. Impaired fear extinction in mice lacking protease nexin-1. *Eur J Neurosci.* 2010;31:2033–2042.
 99. Xu J, Zhu Y, Contractor A, Heinemann SF. mGluR5 has a critical role in inhibitory learning. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 2009;29:3676–3684.
 100. Goddyn H, Callaerts-Vegh Z, Stroobants S, Dirikx T, Vansteenwegen D, Hermans D, et al. Deficits in acquisition and extinction of conditioned responses in mGluR7 knockout mice. *Neurobiol Learn Mem.* 2008;90:103–111.
 101. Andero R, Ressler K j. Fear extinction and BDNF: translating animal models of PTSD to the clinic. *Genes Brain Behav.* 2012;11:503–512.
 102. Bueller JA, Aftab M, Sen S, Gomez-Hassan D, Burmeister M, Zubieta J-K. BDNF Val66Met allele is associated with reduced hippocampal volume in healthy subjects. *Biol Psychiatry.* 2006;59:812–815.
 103. Soliman F, Glatt CE, Bath KG, Levita L, Jones RM, Pattwell SS, et al. A genetic variant BDNF polymorphism alters extinction learning in both mouse and human. *Science.* 2010;327:863–866.
 104. Radwanska K, Schenatto-Pereira G, Ziólkowska M, Łukasiewicz K, Giese KP. Mapping fear memory consolidation and extinction-specific expression of JunB. *Neurobiol Learn Mem.* 2015;125:106–112.
 105. Radwanska K, Medvedev NI, Pereira GS, Engmann O, Thiede N, Moraes MFD, et al.

- Mechanism for long-term memory formation when synaptic strengthening is impaired. *Proc Natl Acad Sci*. 2011;108:18471–18475.
106. Kimura R, Silva AJ, Ohno M. Autophosphorylation of CaMKII is differentially involved in new learning and unlearning mechanisms of memory extinction. *Learn Mem*. 2008;15:837–843.
 107. Bell AH, Bultitude JH. Methods matter: A primer on permanent and reversible interference techniques in animals for investigators of human neuropsychology. *Neuropsychologia*. 2018;115:211–219.
 108. Vaidya AR, Pujara MS, Petrides M, Murray EA, Fellows LK. Lesion Studies in Contemporary Neuroscience. *Trends Cogn Sci*. 2019;23:653–671.
 109. Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci*. 2005;8:1263–1268.
 110. Fenno L, Yizhar O, Deisseroth K. The Development and Application of Optogenetics. *Annu Rev Neurosci*. 2011;34:389–412.
 111. Armbruster BN, Li X, Pausch MH, Herlitze S, Roth BL. 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*. 2007;104:5163–5168.
 112. Grienberger C, Konnerth A. Imaging Calcium in Neurons. *Neuron*. 2012;73:862–885.
 113. Ghosh KK, Burns LD, Cocker ED, Nimmerjahn A, Ziv Y, Gamal AE, et al. Miniaturized integration of a fluorescence microscope. *Nat Methods*. 2011;8:871–878.
 114. Herry C, Ferraguti F, Singewald N, Letzkus JJ, Ehrlich I, Lüthi A. Neuronal circuits of fear extinction. *Eur J Neurosci*. 2010;31:599–612.
 115. Marek R, Xu L, Sullivan RKP, Sah P. Excitatory connections between the prelimbic and infralimbic medial prefrontal cortex show a role for the prelimbic cortex in fear extinction. *Nat Neurosci*. 2018;21:654–658.
 116. Doron A, Goshen I. Investigating the transition from recent to remote memory using advanced tools. *Brain Res Bull*. 2018;141:35–43.
 117. Silva BA, Burns AM, Gräff J. A cFos activation map of remote fear memory attenuation. *Psychopharmacology (Berl)*. 2018:1–13.
 118. Awad W, Ferreira G, Maroun M. Dissociation of the Role of Infralimbic Cortex in Learning and Consolidation of Extinction of Recent and Remote Aversion Memory. *Neuropsychopharmacology*. 2015;40:2566–2575.
 119. Milad MR, Quirk GJ. Fear Extinction as a Model for Translational Neuroscience: Ten Years of Progress. *Annu Rev Psychol*. 2012;63:129–151.
 120. Bowers ME, Ressler KJ. An Overview of Translationally Informed Treatments for

- Posttraumatic Stress Disorder: Animal Models of Pavlovian Fear Conditioning to Human Clinical Trials. *Biol Psychiatry*. 2015;78:E15-27.
121. Johnson LR, McGuire J, Lazarus R, Palmer AA. Pavlovian fear memory circuits and phenotype models of PTSD. *Neuropharmacology*. 2012;62:638–646.
 122. Goode TD, Maren S. Animal Models of Fear Relapse. *ILAR J*. 2014;55:246–258.
 123. Bienvenu TCM, Dejean C, Jercog D, Aouizerate B, Lemoine M, Herry C. The advent of fear conditioning as an animal model of post-traumatic stress disorder: Learning from the past to shape the future of PTSD research. *Neuron*. 2021;109:2380–2397.
 124. Deslauriers J, Toth M, Der-Avakian A, Risbrough VB. Current Status of Animal Models of Posttraumatic Stress Disorder: Behavioral and Biological Phenotypes, and Future Challenges in Improving Translation. *Biol Psychiatry*. 2018;83:895–907.
 125. Tovote P, Fadok JP, Lüthi A. Neuronal circuits for fear and anxiety. *Nat Rev Neurosci*. 2015;16:317–331.
 126. Singewald N, Holmes A. Rodent models of impaired fear extinction. *Psychopharmacology (Berl)*. 2019;236:21–32.
 127. Lee S, Kim SJ, Kwon OB, Lee JH, Kim JH. Inhibitory networks of the amygdala for emotional memory. *Front Neural Circuits*. 2013;7:1–10.
 128. Orsini CA, Maren S. Neural and cellular mechanisms of fear and extinction memory formation. *Neurosci Biobehav Rev*. 2012;36:1773–1802.
 129. Ehrlich DE, Josselyn SA. Plasticity-related genes in brain development and amygdala-dependent learning. 2016.
 130. Ehrlich I, Humeau Y, Grenier F, Cioocchi S, Herry C, Lüthi A. Amygdala Inhibitory Circuits and the Control of Fear Memory. *Neuron*. 2009;62:757–771.
 131. Herry C, Mons N. Resistance to extinction is associated with impaired immediate early gene induction in medial prefrontal cortex and amygdala. 2004.
 132. Hobin JA, Goosens KA, Maren S. Context-dependent neuronal activity in the lateral amygdala represents fear memories after extinction. *J Neurosci*. 2003;23:8410–8416.
 133. Zhang X, Kim J, Tonegawa S. Amygdala Reward Neurons Form and Store Fear Extinction Memory. *Neuron*. 2020;105:1077-1093.e7.
 134. Laurent V, Westbrook RF. Distinct contributions of the basolateral amygdala and the medial prefrontal cortex to learning and relearning extinction of context conditioned fear. *Learn Mem*. 2008;15:657–666.
 135. Falls WA, Miserendino MJ, Davis M. Extinction of fear-potentiated startle: blockade by infusion of an NMDA antagonist into the amygdala. *J Neurosci*. 1992;12:854–863.
 136. Zimmerman JM, Maren S. NMDA receptor antagonism in the basolateral but not

- central amygdala blocks the extinction of Pavlovian fear conditioning in rats. *Eur J Neurosci*. 2010;31:1664–1670.
137. Knapska E, Maren S. Reciprocal patterns of c-Fos expression in the medial prefrontal cortex and amygdala after extinction and renewal of conditioned fear. *Learn Mem Cold Spring Harb N*. 2009;16:486–493.
 138. Knapska E, Macias M, Mikosz M, Nowak A, Owczarek D, Wawrzyniak M, et al. Functional anatomy of neural circuits regulating fear and extinction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012. 2012. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202087109>.
 139. Do-Monte FH, Manzano-Nieves G, Quiñones-Laracuente K, Ramos-Medina L, Quirk GJ. Revisiting the role of infralimbic cortex in fear extinction with optogenetics. *J Neurosci*. 2015;35:3607–3615.
 140. Rosas-Vidal LE, Do-Monte FH, Sotres-Bayon F, Quirk GJ. Hippocampal–Prefrontal BDNF and Memory for Fear Extinction. *Neuropsychopharmacology*. 2014;39:2161–2169.
 141. Thompson BM, Baratta MV, Biedenkapp JC, Rudy JW, Watkins LR, Maier SF. Activation of the infralimbic cortex in a fear context enhances extinction learning. *Learn Mem*. 2010;17:591–599.
 142. Laurent V, Westbrook RF. Inactivation of the infralimbic but not the prelimbic cortex impairs consolidation and retrieval of fear extinction. *Learn Mem*. 2009;16:520–529.
 143. Bayer H, Bertoglio LJ. Infralimbic cortex controls fear memory generalization and susceptibility to extinction during consolidation. *Sci Rep*. 2020;10:15827.
 144. Sierra-Mercado D, Padilla-Coreano N, Quirk GJ. Dissociable Roles of Prelimbic and Infralimbic Cortices, Ventral Hippocampus, and Basolateral Amygdala in the Expression and Extinction of Conditioned Fear. *Neuropsychopharmacology*. 2011;36:529–538.
 145. Bloodgood DW, Sugam JA, Holmes A, Kash TL. Fear extinction requires infralimbic cortex projections to the basolateral amygdala. *Transl Psychiatry*. 2018;8.
 146. Senn V, Wolff SBE, Herry C, Grenier F, Ehrlich I, Gründemann J, et al. Long-range connectivity defines behavioral specificity of amygdala neurons. *Neuron*. 2014;81:428–437.
 147. Bukalo O, Pinard CR, Silverstein S, Brehm C, Hartley ND, Whittle N, et al. Prefrontal inputs to the amygdala instruct fear extinction memory formation. *Sci Adv*. 2015;1:e1500251.
 148. Corcoran KA. Hippocampal Inactivation Disrupts the Acquisition and Contextual Encoding of Fear Extinction. *J Neurosci*. 2005;25:8978–8987.

149. Corcoran KA, Maren S. Hippocampal inactivation disrupts contextual retrieval of fear memory after extinction. *J Neurosci*. 2001;21:1720–1726.
150. Corcoran KA, Quirk GJ. Recalling safety: cooperative functions of the ventromedial prefrontal cortex and the hippocampus in extinction. *CNS Spectr*. 2007;12:200–206.
151. Ramanathan KR, Jin J, Giustino TF, Payne MR, Maren S. Prefrontal projections to the thalamic nucleus reuniens mediate fear extinction. *Nat Commun*. 2018;9:4527.
152. Ye X, Kapeller-Libermann D, Travaglia A, Inda MC, Alberini CM. Direct dorsal hippocampal-prelimbic cortex connections strengthen fear memories. *Nat Neurosci*. 2017;20:52–61.
153. Lee S, Ahmed T, Lee S, Kim H, Choi S, Kim D-S, et al. Bidirectional modulation of fear extinction by mediodorsal thalamic firing in mice. *Nat Neurosci*. 2011;15:308–314.
154. Herry C, Garcia R. Prefrontal cortex long-term potentiation, but not long-term depression, is associated with the maintenance of extinction of learned fear in mice. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2002;22:577–583.
155. Baek J, Lee S, Cho T, Kim S, Kim M, Yoon Y, et al. Neural circuits underlying a psychotherapeutic regimen for fear disorders. *Nature*. 2019. 2019. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0931-y>.
156. Lee J-H, Latchoumane C-FV, Park J, Kim J, Jeong J, Lee K-H, et al. The rostroventral part of the thalamic reticular nucleus modulates fear extinction. *Nat Commun*. 2019;10:4637.
157. Ramanathan KR, Maren S. Nucleus reuniens mediates the extinction of contextual fear conditioning. *Behav Brain Res*. 2019. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112114>.
158. Ratigan HC, Krishnan S, Smith S, Sheffield MEJ. Direct Thalamic Inputs to Hippocampal CA1 Transmit a Signal That Suppresses Ongoing Contextual Fear Memory Retrieval. *BioRxiv*. 2023:2023.03.27.534420.
159. Tao Y, Xian CCJ, Lin XKY. Projections from Infralimbic Cortex to Paraventricular Thalamus Mediate Fear Extinction Retrieval. *Neurosci Bull*. 2021;37:229–241.
160. Gabriel M, Lambert RW, Foster K, Orona E, Sparenborg S, Maiorca RR. Anterior thalamic lesions and neuronal activity in the cingulate and retrosplenial cortices during discriminative avoidance behavior in rabbits. *Behav Neurosci*. 1983;97:675–696.
161. Arico C, Bagley EE, Carrive P, Assareh N, McNally GP. Neurobiology of Learning and Memory Effects of chemogenetic excitation or inhibition of the ventrolateral periaqueductal gray on the acquisition and extinction of Pavlovian fear conditioning. *Neurobiol Learn Mem*. 2017;144:186–197.
162. Baldi E, Bucherelli C. Entorhinal cortex contribution to contextual fear conditioning

- extinction and reconsolidation in rats. *Neurobiol Learn Mem.* 2014;110:64–71.
163. Knox D, Keller SM. Cholinergic neuronal lesions in the medial septum and vertical limb of the diagonal bands of Broca induce contextual fear memory generalization and impair acquisition of fear extinction. *Hippocampus.* 2016. 2016. <https://doi.org/10.1002/hipo.22553>.
164. Tronson NC, Schrick C, Guzman YF, Huh KH, Srivastava DP, Penzes P, et al. Segregated populations of hippocampal principal CA1 neurons mediating conditioning and extinction of contextual fear. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 2009;29:3387–3394.
165. Maren S. Unrelenting Fear Under Stress: Neural Circuits and Mechanisms for the Immediate Extinction Deficit. *Front Syst Neurosci.* 2022;16:888461.
166. Shih C-C, Chang Y-H, Chiou R-J, Chang C-H. Analysis of lateral orbitofrontal cortex activation on acquisition of fear extinction and neuronal activities in fear circuit. *Brain Struct Funct.* 2022;227:2529–2541.
167. Chou X, Wang X, Zhang Z, Shen L, Zingg B, Huang J, et al. Inhibitory gain modulation of defense behaviors by zona incerta. *Nat Commun.* 2018;9:1151.
168. Velasco ER, Florido A, Flores Á, Senabre E, Gomez-Gomez A, Torres A, et al. PACAP-PAC1R modulates fear extinction via the ventromedial hypothalamus. *Nat Commun.* 2022;13:4374.
169. Maren S. Seeking a Spotless Mind: Extinction, Deconsolidation, and Erasure of Fear Memory. *Neuron.* 2011;70:830–845.
170. Cambiaghi M, Grosso A, Likhtik E, Mazziotti R, Concina G, Renna A, et al. Higher-order sensory cortex drives basolateral amygdala activity during the recall of remote, but not recently learned fearful memories. *J Neurosci.* 2016;36:1647–1659.
171. Gale GD, Anagnostaras SG, Godsil BP, Mitchell S, Nozawa T, Sage JR, et al. Role of the Basolateral Amygdala in the Storage of Fear Memories across the Adult Lifetime of Rats. *J Neurosci.* 2004;24:3810–3815.
172. Kitamura T, Ogawa SK, Roy DS, Okuyama T. Engrams and circuits crucial for systems consolidation of a memory. 2017;78:73–78.
173. Corcoran KA, Leaderbrand K, Radulovic J. Extinction of Remotely Acquired Fear Depends on an Inhibitory NR2B/PKA Pathway in the Retrosplenial Cortex. *J Neurosci.* 2013;33:19492–19498.
174. Qin C, Bian X-L, Wu H-Y, Xian J-Y, Cai C-Y, Lin Y-H, et al. Dorsal Hippocampus to Infralimbic Cortex Circuit is Essential for the Recall of Extinction Memory. *Cereb Cortex.* 2021;31:1707–1718.
175. Correia P, Demeter K, Varga J, Urbán E, Török B, Balázsfi D, et al. The effectiveness of

- extinction training in male rats: Temporal considerations and brain mechanisms. *Behav Brain Res.* 2023;441:114285.
176. Vetere, Kenney JW, Tran LM, Xia F, Steadman PE, Parkinson J, et al. Chemogenetic Interrogation of a Brain-wide Fear Memory Network in Mice. *Neuron.* 2017;94:363-374.e4.
 177. Padilla-Coreano N, Do-Monte FH, Quirk GJ. A time-dependent role of midline thalamic nuclei in the retrieval of fear memory. *Neuropharmacology.* 2012;62:457–463.
 178. Lane RD, Reiman EM, Ahern GL, Schwartz GE, Davidson RJ. Neuroanatomical correlates of happiness, sadness, and disgust. *Am J Psychiatry.* 1997;154:926–933.
 179. Etkin A, Wager TD. Functional Neuroimaging of Anxiety: A Meta-Analysis of Emotional Processing in PTSD, Social Anxiety Disorder, and Specific Phobia. *Am J Psychiatry.* 2007;164:1476–1488.
 180. Suarez-Jimenez B, Albajes-Eizagirre A, Lazarov A, Zhu X, Harrison BJ, Radua J, et al. Neural signatures of conditioning, extinction learning, and extinction recall in posttraumatic stress disorder: a meta-analysis of functional magnetic resonance imaging studies. *Psychol Med.* 2020;50:1442–1451.
 181. Lanius RA, Williamson PC, Bluhm RL, Densmore M, Boksman K, Neufeld RWJ, et al. Functional connectivity of dissociative responses in posttraumatic stress disorder: a functional magnetic resonance imaging investigation. *Biol Psychiatry.* 2005;57:873–884.
 182. Ramage AE, Laird AR, Eickhoff SB, Acheson A, Peterson AL, Williamson DE, et al. A coordinate-based meta-analytic model of trauma processing in posttraumatic stress disorder. *Hum Brain Mapp.* 2013;34:3392–3399.
 183. Ben-Zion Z, Zeevi Y, Keynan NJ, Admon R, Kozlovski T, Sharon H, et al. Multi-domain potential biomarkers for post-traumatic stress disorder (PTSD) severity in recent trauma survivors. *Transl Psychiatry.* 2020;10:208.
 184. Toader AC, Regalado JM, Li YR, Terceros A, Yadav N, Kumar S, et al. Anteromedial thalamus gates the selection and stabilization of long-term memories. *Cell.* 2023;186:1369-1381.e17.
 185. Giese KP. Autophosphorylation at Thr286 of the Ca^{2+} /Calmodulin Kinase II in LTP and Learning. *Science.* 1998;279:870–873.
 186. Feng G, Mellor RH, Bernstein M, Keller-Peck C, Nguyen QT, Wallace M, et al. Imaging Neuronal Subsets in Transgenic Mice Expressing Multiple Spectral Variants of GFP variants with altered spectral properties and improved translational efficiency, thermostability, and quantum yield. As a result of these favorabl. *Neuron.*

- 2000;28:41–51.
187. Perez BA, Shutterly A, Chan YK, Byrne BJ, Corti M. Management of Neuroinflammatory Responses to AAV-Mediated Gene Therapies for Neurodegenerative Diseases. *Brain Sci.* 2020;10:E119.
 188. Watakabe A, Ohtsuka M, Kinoshita M, Takaji M, Isa K, Mizukami H, et al. Comparative analyses of adeno-associated viral vector serotypes 1, 2, 5, 8 and 9 in marmoset, mouse and macaque cerebral cortex. *Neurosci Res.* 2015;93:144–157.
 189. Srivastava A. In vivo tissue-tropism of adeno-associated viral vectors. *Curr Opin Virol.* 2016;21:75–80.
 190. Paxinos G, Franklin K. Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Compact. 5th ed. Academic Press; 2019.
 191. Sagar SM, Sharp FR, Curran T. Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science.* 1988;240:1328–1331.
 192. Jaworski J, Kalita K, Knapska E. C-Fos and neuronal plasticity: The aftermath of kaczmarek's theory. *Acta Neurobiol Exp (Warsz).* 2018. 2018. <https://doi.org/10.21307/ane-2018-027>.
 193. Guzowski JF, Timlin JA, Roysam B, McNaughton BL, Worley PF, Barnes CA. Mapping behaviorally relevant neural circuits with immediate-early gene expression. *Curr Opin Neurobiol.* 2005;15:599–606.
 194. Kaczmarek L, Nikořajew E. c-fos protooncogene expression and neuronal plasticity. *Acta Neurobiol Exp (Warsz).* 1990;50:173–179.
 195. Roth BL. DREADDs for Neuroscientists. *Neuron.* 2016;89:683–694.
 196. MacLaren DAA, Browne RW, Shaw JK, Krishnan Radhakrishnan S, Khare P, España RA, et al. Clozapine N-Oxide Administration Produces Behavioral Effects in Long-Evans Rats: Implications for Designing DREADD Experiments. *ENeuro.* 2016;3:ENEURO.0219-16.2016.
 197. Manvich DF, Webster KA, Foster SL, Farrell MS, Ritchie JC, Porter JH, et al. The DREADD agonist clozapine N-oxide (CNO) is reverse-metabolized to clozapine and produces clozapine-like interoceptive stimulus effects in rats and mice. *Sci Rep.* 2018;8:3840.
 198. Bissiere S, Zelikowsky M, Ponnusamy R, Jacobs N, Blair H, Fanselow MS. Electrical Synapses Control Hippocampal Contributions to Fear Learning and Memory. 2011.
 199. Maren S, Holt W. The hippocampus and contextual memory retrieval in Pavlovian conditioning. *Behav Brain Res.* 2000;110:97–108.
 200. Maren S, Quirk GJ. Neuronal signalling of fear memory. *Nat Rev Neurosci.*

- 2004;5:844–852.
201. Albo Z, Gräff J. The mysteries of remote memory. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2018;373.
 202. Xiao C, Liu Y, Xu J, Gan X, Xiao Z. Septal and Hippocampal Neurons Contribute to Auditory Relay and Fear Conditioning. 2018;12:1–17.
 203. Calandreau L, Jaffard R, Desmedt A. Dissociated roles for the lateral and medial septum in elemental and contextual fear conditioning. 2007:422–429.
 204. Knox D, Stanfield BR, Staib JM, David NP, Keller SM, DePietro T. Neural circuits via which single prolonged stress exposure leads to fear extinction retention deficits. *Learn Mem.* 2016;23:689–698.
 205. Ferraris M, Cassel J-C, Pereira de Vasconcelos A, Stephan A, Quilichini PP. The nucleus reuniens, a thalamic relay for cortico-hippocampal interaction in recent and remote memory consolidation. *Neurosci Biobehav Rev.* 2021;125:339–354.
 206. Ramanathan KR, Ressler RL, Jin J, Maren S. Nucleus reuniens is required for encoding and retrieving precise, hippocampal-dependent contextual fear memories in rats. *J Neurosci.* 2018. 2018. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1429-18.2018>.
 207. Hoover WB, Vertes RP. Collateral projections from nucleus reuniens of thalamus to hippocampus and medial prefrontal cortex in the rat: a single and double retrograde fluorescent labeling study. *Brain Struct Funct.* 2012;217:191–209.
 208. Varela C, Kumar S, Yang JY, Wilson MA. Anatomical substrates for direct interactions between hippocampus, medial prefrontal cortex, and the thalamic nucleus reuniens. *Brain Struct Funct.* 2014;219:911–929.
 209. Xu W, Südhof TC. A Neural Circuit for Memory Specificity and Generalization. *Science.* 2013;339:1290–1295.
 210. Loureiro M, Cholvin T, Lopez J, Merienne N, Latreche A, Cosquer B, et al. The Ventral Midline Thalamus (Reuniens and Rhomboid Nuclei) Contributes to the Persistence of Spatial Memory in Rats. *J Neurosci.* 2012;32:9947–9959.
 211. Vertes RP, Hoover WB, Do Valle AC, Sherman A, Rodriguez JJ. Efferent projections of reuniens and rhomboid nuclei of the thalamus in the rat. *J Comp Neurol.* 2006;499:768–796.
 212. Bokor H, Csáki Á, Kocsis K, Kiss J. Cellular architecture of the nucleus reuniens thalami and its putative aspartatergic/glutamatergic projection to the hippocampus and medial septum in the rat. *Eur J Neurosci.* 2002. 2002. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02189.x>.
 213. McKenna JT, Vertes RP. Afferent projections to nucleus reuniens of the thalamus. *J*

- Comp Neurol. 2004;480:115–142.
214. Xie X, Gong S, Sun N, Zhu J, Xu X, Xu Y, et al. Contextual Fear Learning and Extinction in the Primary Visual Cortex of Mice. *Neurosci Bull.* 2022. 15 June 2022. <https://doi.org/10.1007/s12264-022-00889-8>.
215. Falls WA, Davis M. Visual cortex ablations do not prevent extinction of fear-potentiated startle using a visual conditioned stimulus. *Behav Neural Biol.* 1993;60:259–270.
216. Irvine EE, Vernon J, Giese KP. α CaMKII autophosphorylation contributes to rapid learning but is not necessary for memory. *Nat Neurosci.* 2005;8:411–412.
217. Irvine EE, Danhiez A, Radwanska K, Nassim C, Lucchesi W, Godaux E, et al. Properties of contextual memory formed in the absence of α CaMKII autophosphorylation. *Mol Brain.* 2011;4:8.
218. Lin X, Itoga CA, Taha S, Li MH, Chen R, Sami K, et al. Neurobiology of Stress c-Fos mapping of brain regions activated by multi-modal and electric foot shock stress. *Neurobiol Stress.* 2018;8:92–102.
219. Hall J, Thomas KL, Everitt BJ. Cellular imaging of zif268 expression in the hippocampus and amygdala during contextual and cued fear memory retrieval: selective activation of hippocampal CA1 neurons during the recall of contextual memories. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 2001;21:2186–2193.
220. Conejo NM, González-Pardo H, López M, Cantora R, Arias JL. Induction of c-Fos expression in the mammillary bodies, anterior thalamus and dorsal hippocampus after fear conditioning. *Brain Res Bull.* 2007;74:172–177.
221. Talukdar G, Inoue R, Yoshida T, Mori H. Impairment in extinction of cued fear memory in syntenin-1 knockout mice. *Neurobiol Learn Mem.* 2018;149:58–67.
222. Knapska E, Radwanska K, Werka T, Kaczmarek L. Functional Internal Complexity of Amygdala: Focus on Gene Activity Mapping After Behavioral Training and Drugs of Abuse. *Physiol Rev.* 2007;87:1113–1173.
223. Jendryka M, Palchadhuri M, Ursu D, van der Veen B, Liss B, Kätzel D, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic actions of clozapine-N-oxide, clozapine, and compound 21 in DREADD-based chemogenetics in mice. *Sci Rep.* 2019;9:4522.
224. Gomez JL, Bonaventura J, Lesniak W, Mathews WB, Sysa-Shah P, Rodriguez LA, et al. Chemogenetics revealed: DREADD occupancy and activation via converted clozapine. *Science.* 2017;357:503–507.
225. Tran FH, Spears SL, Ahn KJ, Eisch AJ, Yun S. Does chronic systemic injection of the DREADD agonists clozapine-N-oxide or compound 21 change behavior relevant to locomotion, exploration, anxiety, and depression in male non-DREADD-expressing

- mice? 2020:2020.05.17.100909.
226. Bouton ME. Context and behavioral processes in extinction. *Learn Mem Cold Spring Harb N.* 2004;11:485–494.
 227. Orsini CA, Maren S. NIH Public Access. *Brain Res.* 2012;135:769–787.
 228. Vetere G, Restivo L, Novembre G, Aceti M, Lumaca M, Ammassari-Teule M. Extinction partially reverts structural changes associated with remote fear memory. *Learn Mem.* 2011;18:554–557.
 229. Lovett-Barron M, Kaifosh P, Kheirbek M, Danielson N, Zaremba J, Reardon T, et al. Dendritic inhibition in the hippocampus supports fear learning. *Science.* 2014;343:857–863.
 230. Quet E, Majchrzak M, Cosquer B, Morvan T, Wolff M, Cassel J-C, et al. The reuniens and rhomboid nuclei are necessary for contextual fear memory persistence in rats. *Brain Struct Funct.* 2020;225:955–968.
 231. Hugues S, Garcia R. Reorganization of learning-associated prefrontal synaptic plasticity between the recall of recent and remote fear extinction memory. 2007:520–524.
 232. Li XB, Inoue T, Nakagawa S, Koyama T. Effect of mediodorsal thalamic nucleus lesion on contextual fear conditioning in rats. *Brain Res.* 2004;1008:261–272.
 233. Lee S, Ahmed T, Lee S, Kim H, Choi S, Kim DS, et al. Bidirectional modulation of fear extinction by mediodorsal thalamic firing in mice. *Nat Neurosci.* 2012;15:308–314.
 234. Sierra RO, Pedraza LK, Zanona QK, Santana F, Boos FZ, Crestani AP, et al. Reconsolidation-induced rescue of a remote fear memory blocked by an early cortical inhibition: Involvement of the anterior cingulate cortex and the mediation by the thalamic nucleus reuniens. *Hippocampus.* 2017;27:596–607.
 235. Troyner F, Bicca MA, Bertoglio LJ. Nucleus reuniens of the thalamus controls fear memory intensity, specificity and long-term maintenance during consolidation. *Hippocampus.* 2018;28:602–616.
 236. Vasudevan K, Ramanathan KR, Vierkant V, Maren S. Nucleus reuniens inactivation does not impair consolidation or reconsolidation of fear extinction. *Learn Mem Cold Spring Harb N.* 2022;29:216–222.
 237. Dolleman-van der Weel MJ, Griffin AL, Ito HT, Shapiro ML, Witter MP, Vertes RP, et al. The nucleus reuniens of the thalamus sits at the nexus of a hippocampus and medial prefrontal cortex circuit enabling memory and behavior. *Learn Mem.* 2019;26:191–205.
 238. Smith KS, Bucci DJ, Luikart BW, Mahler SV. DREADDs: Use and Application in

- Behavioral Neuroscience. *Behav Neurosci.* 2016;130:137–155.
239. Venkataraman A, Hunter SC, Dhinojwala M, Ghebrezadik D, Guo J, Inoue K, et al. Incerto-thalamic modulation of fear via GABA and dopamine. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol.* 2021;46:1658–1668.
 240. Ottersen OP, Storm-Mathisen J. GABA-containing neurons in the thalamus and pretectum of the rodent. An immunocytochemical study. *Anat Embryol (Berl).* 1984;170:197–207.
 241. Joyce MKP, Marshall LG, Banik SL, Wang J, Xiao D, Bunce JG, et al. Pathways for Memory, Cognition and Emotional Context: Hippocampal, Subgenual Area 25, and Amygdalar Axons Show Unique Interactions in the Primate Thalamic Reuniens Nucleus. *J Neurosci.* 2022;42:1068–1089.
 242. Berlau DJ, McGaugh JL. Enhancement of extinction memory consolidation: The role of the noradrenergic and GABAergic systems within the basolateral amygdala. *Neurobiol Learn Mem.* 2006;86:123–132.
 243. Adkins JM, Lynch J, Gray M, Jasnow AM. Presynaptic GABAB receptor inhibition sex dependently enhances fear extinction and attenuates fear renewal. *Psychopharmacology (Berl).* 2021;238:2059–2071.
 244. Amaral DG, Kurz J. An analysis of the origins of the cholinergic and noncholinergic septal projections to the hippocampal formation of the rat. *J Comp Neurol.* 1985;240:37–59.
 245. Nyakas C, Luiten PG, Spencer DG, Traber J. Detailed projection patterns of septal and diagonal band efferents to the hippocampus in the rat with emphasis on innervation of CA1 and dentate gyrus. *Brain Res Bull.* 1987;18:533–545.
 246. Müller C, Remy S. Septo – hippocampal interaction. 2018:565–575.
 247. Khakpai F, Nasehi M, Haeri-Rohani A, Eidi A, Zarrindast MR. Septo-hippocampo-septal loop and memory formation. *Basic Clin Neurosci.* 2013;4:5–23.
 248. Unal G, Joshi A, Viney TJ, Kis V, Somogyi P. Synaptic Targets of Medial Septal Projections in the Hippocampus and Extrahippocampal Cortices of the Mouse. 2015. 2015.
 249. Justus D, Dalügge D, Bothe S, Fuhrmann F, Hannes C, Kaneko H, et al. Glutamatergic synaptic integration of locomotion speed via septoentorhinal projections. 2017;20.
 250. Fuhrmann F, Justus D, Sosulina L, Kaneko H, Beutel T, Friedrichs D, et al. Locomotion, Theta Oscillations, and the Speed-Related Firing of Hippocampal Neurons Are Controlled by a Medial Septal Glutamatergic Circuit. *Neuron.* 2015;86:1253–1264.
 251. Sparks PD, LeDoux JE. The Septal Complex as Seen Through the Context of Fear. In:

- Numan R, editor. *Behav. Neurosci. Septal Reg.*, New York, NY: Springer; 2000. p. 234–269.
252. Feldon J, Gray JA. Effects of medial and lateral septal lesions on the partial reinforcement extinction effect at short inter-trial intervals. *Q J Exp Psychol.* 1979. 1979. <https://doi.org/10.1080/14640747908400757>.
253. Cassel J-C, Ferraris M, Quilichini P, Cholvin T, Boch L, Stephan A, et al. The reuniens and rhomboid nuclei of the thalamus: A crossroads for cognition-relevant information processing? *Neurosci Biobehav Rev.* 2021;126:338–360.
254. Yanakieva S, Mathiasen ML, Amin E, Nelson AJD, O'Mara SM, Aggleton JP. Collateral rostral thalamic projections to prelimbic, infralimbic, anterior cingulate and retrosplenial cortices in the rat brain. *Eur J Neurosci.* 2022;56:5869–5887.
255. Swanson LW, Cowan WM. The connections of the septal region in the rat. *J Comp Neurol.* 1979;186:621–655.
256. Vertes RP, Hoover WB, Szigeti-Buck K, Leranath C. Nucleus reuniens of the midline thalamus: link between the medial prefrontal cortex and the hippocampus. *Brain Res Bull.* 2007;71:601–609.
257. Numan R, editor. *The Behavioral Neuroscience of the Septal Region.* New York, NY: Springer; 2000.
258. Roy A, Svensson FP, Mazei A, Kocsis B. Prefrontal-hippocampal coupling by theta rhythm and by 2–5 Hz oscillation in the delta band: The role of the nucleus reuniens of the thalamus. *Brain Struct Funct.* 2017;222:2819–2830.
259. King C, Recce M, O'Keefe J. The rhythmicity of cells of the medial septum/diagonal band of Broca in the awake freely moving rat: relationships with behaviour and hippocampal theta. *Eur J Neurosci.* 1998;10:464–477.
260. Warthen DM, Wiltgen BJ, Provencio I. Light enhances learned fear. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:13788–13793.
261. Wiltgen BJ, Zhou M, Cai Y, Balaji J, Karlsson MG, Parivash SN, et al. The hippocampus plays a selective role in the retrieval of detailed contextual memories. *Curr Biol CB.* 2010;20:1336–1344.
262. Lang PJ, Bradley MM, Fitzsimmons JR, Cuthbert BN, Scott JD, Moulder B, et al. Emotional arousal and activation of the visual cortex: an fMRI analysis. *Psychophysiology.* 1998;35:199–210.
263. Li Z, Yan A, Guo K, Li W. Fear-Related Signals in the Primary Visual Cortex. *Curr Biol CB.* 2019;29:4078-4083.e2.
264. LeDoux JE, Romanski L, Xagoraris A. Indelibility of subcortical emotional memories. *J*

- Cogn Neurosci. 1989;1:238–243.
265. Kim JJ, Fanselow MS. Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science*. 1992;256:675–677.
 266. Tayler KK, Tanaka KZ, Reijmers LG, Wiltgen BJ. Reactivation of neural ensembles during the retrieval of recent and remote memory. *Curr Biol CB*. 2013;23:99–106.
 267. Oh J-P, Han J-H. A critical role of hippocampus for formation of remote cued fear memory. *Mol Brain*. 2020;13:112.
 268. Winocur G, Sekeres MJ, Binns MA, Moscovitch M. Hippocampal lesions produce both nongraded and temporally graded retrograde amnesia in the same rat. *Hippocampus*. 2013;23:330–341.
 269. Krueger JN, Wilmot JH, Teratani-Ota Y, Puhger KR, Nemes SE, Crestani AP, et al. Amnesia for context fear is caused by widespread disruption of hippocampal activity. *Neurobiol Learn Mem*. 2020;175:107295.
 270. dos Santos Corrêa M, Grisanti GDV, Franciscatto IAF, Tarumoto TSA, Tiba PA, Ferreira TL, et al. Remote contextual fear retrieval engages activity from salience network regions in rats. *Neurobiol Stress*. 2022;18:100459.
 271. Milad MR, Quirk GJ. Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction. *Nature*. 2002;420:70–74.
 272. Khalaf O, Gräff J. Reactivation of recall-induced neurons in the infralimbic cortex and the basolateral amygdala after remote fear memory attenuation. *Front Mol Neurosci*. 2019. 2019. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00070>.
 273. Giustino TF, Maren S. The Role of the Medial Prefrontal Cortex in the Conditioning and Extinction of Fear. *Front Behav Neurosci*. 2015;9:298.
 274. Mukherjee A, Caroni P. Infralimbic cortex is required for learning alternatives to prelimbic promoted associations through reciprocal connectivity. *Nat Commun*. 2018;9:2727.
 275. Clark JW, Drummond SPA, Hoyer D, Jacobson LH. Sex differences in mouse models of fear inhibition: Fear extinction, safety learning, and fear–safety discrimination. *Br J Pharmacol*. 2019;176:4149–4158.
 276. Perry CJ, Ganella DE, Nguyen LD, Du X, Drummond KD, Whittle S, et al. Assessment of conditioned fear extinction in male and female adolescent rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2020;116:104670.
 277. Milad MR, Goldstein JM, Orr SP, Wedig MM, Klibanski A, Pitman RK, et al. Fear conditioning and extinction: Influence of sex and menstrual cycle in healthy humans. *Behav Neurosci*. 2006;120:1196–1203.

8. Supplement

Kod źródłowy makra dla analizy c-Fos na mikrofotografiach:

```
path_name=getDirectory("image");
filename=getInfo("image.filename")
im_title=getTitle();
run("Split Channels");
selectWindow("C1-"+im_title);
    run("Smooth");
    run("8-bit");
selectWindow("C2-"+im_title);
    run("Smooth");
    run("8-bit");
selectWindow("C2-"+im_title);
imageCalculator("Add", "C2-"+im_title, "C2-"+im_title);
selectWindow("C2-"+im_title);
imageCalculator("Add", "C2-"+im_title,"C2-"+im_title);
selectWindow("C2-"+im_title);
run("Duplicate...", "title=1");
selectWindow("1");
run("Remove Outliers...", "radius=5 threshold=10 which=Bright");
imageCalculator("Subtract create", "C2-"+im_title,"1");
selectWindow("C2-"+im_title);
    run("Measure");
selectWindow("Result of C2-"+im_title);
run("Threshold...");
waitForUser("set threshold range");
selectWindow("C1-"+im_title);
run("Sync Windows");
selectWindow("Threshold");
    run ("Close");
setTool("polygon");
waitForUser("select structure");
selectWindow("Result of C2-"+im_title);
run("Analyze Particles...", "size=5-160 circularity=0,00-1.00 show=Nothing display
```

```
summarize");
selectWindow("Results");
    saveAs("Results", path_name+"\\ "+im_title+" structure_results_C2.csv");
    run("Clear Results");
selectWindow("Result of C2-"+im_title);
    run("Measure");
selectWindow("Results");
    saveAs("Results", path_name+"\\ "+im_title+" structure_results.csv");
selectWindow("Summary");
    saveAs("Text", path_name+"\\ "+im_title+" structure_summary.txt");
selectWindow("Results");
    run("Close");
selectWindow(im_title+" ms_summary.txt");
    run("Close");
selectWindow(im_title+" structure_summary.csv");
    run("Close");
print ("Previous image:")
print (im_title);
selectWindow("Log");
selectWindow("1");
    run("Close");
selectWindow("Result of C2-"+im_title);
    run("Close");
selectWindow("C2-"+im_title);
    run("Close");
selectWindow("C1-"+im_title);
    run("Close");
```

9. Spis publikacji własnych

- Ziółkowska M, Borczyk M, Cały A, **Tomaszewski KF**, Nowacka A, Nalberczak-Skóra M, Śliwińska MA, Łukasiewicz K, Skonieczna E, Wójtowicz T, Włodarczyk J, Bernaś T, Salamian A, Radwanska K., Phosphorylation of PSD-95 at serine 73 in dCA1 is required for extinction of contextual fear. PLoS Biol. 2023;8;21(5)
- Pranke IM, Chevalier B, Premchandrar A, Baatallah N, **Tomaszewski KF**, Bitam S, Tondelier D, Golec A, Stolk A, Lukacs GL, Hiemstra PS, Dadlez M, Lomas DA, Irving JA, Delaunay-Moisan A, van Anken E, Hinzpeter A, Sermet-Gaudelus I, Edelman A, Keratin 8 is a scaffolding and regulatory protein of ERAD complexes, Cell Mol Life Sci. 2022;79(9):503.
- Marcinkowska-Swojak M, Handschuh L, Wojciechowski P, Goralski M, **Tomaszewski K**, Kazmierczak M, Lewandowski K, Komarnicki M, Blazewicz J, Figlerowicz M, Kozłowski P. Simultaneous detection of mutations and copy number variation of NPM1 in the acute myeloid leukemia using multiplex ligation-dependent probe amplification, Mutat Res. 2016;786:14-26.